11-15430
00-00318
2-01

스마트팜
안개재배법을
이용한
땅콩새싹으로
부터 혈액순환
건강식품 개발

최
종
보
고
서

2020

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

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

기술사업화지원 사업 제3차연도 최종 보고서

발간등록번호
11-1543000-003182-01

스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발

최종보고서

2020.04.03.

주관연구기관 / (주)리본인터내셔널
협동연구기관 / 한국한의학연구원
대전대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "기술사업화지원사업"(개발기간 : 2017. 08. 30 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2020 . 04 . 03 .

주관연구기관명 : (주)리본인터내셔널 (대표자) 안 종 식 (인)
협동연구기관명 : 한국한의학연구원 (대표자) 김 종 렬 (인)
참여기관명 : 대전대학교 산학협력단 (대표자) 황 석 연 (인)

주관연구책임자 : 안 종 식
협동연구책임자 : 이 윤 미
참여기관책임자 : 김 승 형

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>817036-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>28개월</td><td>단 계 구 분</td><td>(해당단계)/
(총 단 계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">기술사업화 지원 사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">안 종 식</td><td>해당단계
참여연구원 수</td><td>총: 13 명
내부: 4 명
외부: 9 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부:225,000천원
민간: 75,000천원
계: 300,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원 수</td><td>총: 14 명
내부: 5 명
외부: 9 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:525,000천원
민간:175,000천원
계: 700,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">(주)리본인터내셔널
기업부설연구소</td><td colspan="2">참여기업명
한국한의학연구원
대전대학교 산학협력단</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수
1. 안개재배법을 통한 땅콩새싹으로부터 식물성단백질 음료/오일 개발 완료 2. 안개재배법을 통한 땅콩새싹으로부터 혈행개선 효과 및 식품알러지 반응 테스트 완료 3. 논문 투고 2편, 특허 출원 3편, 등록 상표 2건, 학술발표 4건	

<요약문>

연구의 목적 및 내용	스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹의 추출물로부터(레스베라트롤 등이 포함된) 혈액순환 건강식품 개발 -땅콩새싹 Semi-pilot 및 Large scale 규모의 생산 -안전성이 확보된 추출물 혈액순환 원료(식품) 및 소재 확보 -각 소재 추출물 과학적 성분분석 -임상 및 전임상 자료 확보 -소재가공 특성에 따라 다양한 혈액순환 건강식품 제제·제형의 프리미엄급 제품화 개발				
연구개발성과	- 스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹의 추출물로부터(레스베라트롤 등이 포함된) 혈액순환 건강식품 2건 개발 - 국제 SCI급 논문 2편 (1편 published, 1편 revision중) - 국내 KCI 및 국제 KCI급 학술발표 4편 - 특허 3편 출원, 상표 2편 등록				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	• 농가소득 향상 기여 : -약용/특용 작물의 다양화 및 활용 분야 확대기여 -땅콩새싹 재배 및 활용 분야 확대로 농가 부가가치 향상 • 시장 활성화 : -안전성과 강력한 효과를 바탕으로 한 즉각적인 상품화로 건강식품 시장 활성화 향상 • 제품적용 확대 : -강력한 효능을 바탕으로 한 개별인정형 원료소재화 및 천연물 신약으로의 제품 확대 • 예방식의약품 산업 질 향상 : -전적으로 의약품에 의존하고 있는 질환 치료제 시장에 효과적인 기능식품 제시 가능 및 성인병 경계성 조기 예방 기여 • 국민의 건강 및 삶의 질 향상 : -안전성이 확보된 원료로부터 장기복용 시에도 부작용 우려 없는 제품 제시				
국문핵심어 (5개 이내)	안개농업	땅콩새싹	혈액순환	기능성소재	레스베라트롤
영문핵심어 (5개 이내)	fog farm	peanut sprout	blood circulation	functional material	resveratrol

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ·····
2. 연구수행 내용 및 결과 ·····
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ·····
4. 연구결과의 활용 계획 등 ·····
붙임. 참고 문헌 ·····

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

- 땅콩새싹의 경우 재배의 어려움으로 대량재배의 시도 및 가능성 자체가 미흡한 상태
- 땅콩새싹의 재배업체가 존재하나 화학양액 사용 및 잔존폐수 처리 등의 문제점들이 발생함
- 재배농가의 경우 생산 작물을 생체 위주의 판매로 진행함에 따라 소득변동성이 크고 부가가치 또한 미비한 상태

1-3. 연구 범위

- 땅콩새싹 Semi-pilot 및 Large scale 규모의 재배생산 구축
- 땅콩새싹을 활용한 혈행개선 식품 개발 / 안전성 확보

① 개발 목표

- 주관연구기관 1 (기관명칭) : (주)리본인터내셔널

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1+3차 년도 (2017+2019) **1세부**	스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로 부터 혈액순환 건강식품 개발	1세부 : 시제품 및 제품화, 매출액 증진	1. 땅콩새싹 Semi-pilot 및 Large scale 규모의 대량 생산 -재배주기에 따른 땅콩새싹의 **Semi-pilot** 및 Large scale의 생산 - 장비 모듈화 및 세척, 건조 라인을 통한 대량생산 체계 확립 2. 기존재배시스템 개량화 3. 생산공장 운영 4. 학술발표 2건 5. 특허출원 3건, 상표등록 2건 6. 교육이수 3건 7. 일본유통업체와 MOU 체결 8. 원물확보를 위한 MOU체결 9. 사업화 관련 영업등록증 신고완료 10. 치매환자 대상 전임상 MMSE 테스트 완료	**Semi-pilot 및 Large scale의 생산** 1. 채반개수 및 원물 투입 무게 증가 2. 모듈별 수확가능 및 ICT적용 3. 땅콩새싹 세척 및 건조라인 및 새싹가공 방법 확립 4. 중소기업진흥공단 수출인큐베이터(태국) 선정 5. 화장품 제조판매업 등록 6. 한국약용작물학회 학술발표 1건 7. 1) 식물성단백질 음료 및 그 제조방법 특허출원 2) 발아땅콩을 이용한 오일 제조방법 국내 출원 및 국제출원 완료 3) 새싹이든 상표 등록 완료 4) Reborn&Delight 상표 등록 완료 8. From J 일본 유통업체와 MOU체결 9. 전남 고창 땅콩 원물공급처와 MOU체결 10. 건강기능식품판매업, 수입식품 판매업, 유통전문판매업 11. 1) 새싹이든 밀 및 발포정 FGI진행 2) 스마트포그팜 사업설명회

				진행 3) 리본인터내셔널 경영자협회 사업설명회 진행 4) 소통강화모니터링 실시 5) 새싹이든 오일 제품 블로그 체험단 진행 6) 새싹이든 밀 치매환자 대상 MMSE 테스트 결과 20.23% 개선 효과 확인
			1. 프리미엄 슈퍼 고급 땅콩새싹 추출물(용매추출물 및 오일)로부터 파이토케미칼 활성을 갖는 추출물 확보 -실험 기초실험(**용매추출, 냉압착 추출**) 2. 새싹음료 시제품 생산 및 기존 새싹땅콩 오일 및 비타민음료 제품 개선	**용매추출, 냉압착 추출** 1. 충남부여 굿뚜레 농산물가공센터에서 용매 추출 완료 및 소재가공 2. 충남보령시 ㈜에프앤바이오에서 건강기능성식품 비타민음료 시제품 사업화 진행중 3. 경기도 화성시 ㈜감로정에서 땅콩새싹프리미엄급 오일 시제품 사업화 진행중 4. 새싹땅콩오일 : OEM 에버그린 새싹땅콩 두유 : OEM 논산딸기랜드 새싹땅콩 비타민음료 : OEM 에프앤바이오
			3. 안전성이 확보된 원천가공기술 원료 및 소재 확보 -**재배주기에 따른 가공방법**(증숙, 동결건조, 열풍건조 등) 소재 확보	**재배주기에 따른 가공방법**(증숙, 동결건조, 열풍건조 등) 소재 확보 1. ㈜리본인터내셔널 기술연구소에서 진행중이며, 충남 부여 굿뚜레 농산물가공센터에서 장비활용 진행 중
			4. 안전성이 확보된 **일반유용 영양성분, 폴리페놀류/과학적 분석** -공인인증기관/주관기관	**일반유용 영양성분, 폴리페놀류/과학적 분석** 1. 한국식품과학연구원(공인인증기관) 의뢰 계속 진행중 2. 과학적 성분분석(2세부 협력) 3. 제품성분분석(협력기업제시)
			5. 안전성이 확보된 땅콩새싹 **원물/시료 공급 시제품** -위탁공동기관(2세부, 3세부 공급)	**원물/시료 공급 시제품** 1. 시제품 2건 생산기반 확보 -(주)감로정/협조 -(주)에프앤바이오/협조

- 참여기관 2 (기관명칭) : (연)한국한의학연구원

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
생리활성 평가	-혈소판 응집 억제 효능평가	- 정상 10주령 흰쥐(SD rat) 혈소판 준비 - Collagen 7.0 μg/m - 혈소판 응집 억제능에 사용한 세척 혈소판

		(washed platelet)은 세포수 측정기(cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 계측
	- nitric oxide (NO) 생성 저해 활성	- 대식 세포인 Raw 264.7 세포의 NO 생성 억제 확인 - 96 well plate에 2×10^5 cell로 분주하고, 24시간 배양 - Serum free 배지로 바꿔주고 2시간 starvation 후, 시험용액과 LPS를 0.5 μg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양한 후, MTT 세포 생존율과 NO 생성양을 측정함.
	- histamine 유리 억제 활성	- 비만 세포인 MC9 세포의 Histamine 유리 억제 활성 확인 - 48 well plate에 1×10^5 cell로 분주하고, 24시간 배양 - 시험용액과 PMA 50nM과 A23189 1uM 농도로 처리하여 24시간 배양한 후, CCK-8 세포 생존율과 Histamine 유리 억제능을 측정함.
	- 땅콩새싹 추출물 및 주요성분의 항산화능 평가	- DPPH법에 의해 시료의 free radical 소거능을 측정
유용성분의 기능성 규명	- 안개분무 땅콩새싹/오일의 차별적인 성분 분석 (땅콩새싹의 유효성분 추적)	- HPLC를 이용한 성분 비교 분석 - HPLC를 이용한 지표성분 함량 분석 - LS-MS profiling을 통한 땅콩 새싹 유래 성분 연구 - 땅콩 새싹 제조 방법에 따른 지표 성분 패턴 분석 - 혈소판 응집 억제 효능에 따른 땅콩 새싹 유효성분 추적 - 땅콩 새싹 오일의 성분 분석 - 땅콩 새싹 추출물의 지표성분 추적
스마트팜 재배 작물의 유통 및 소비 모델 연구	- 자료 조사	- 스마트팜 재배 새싹 및 오일 관련 유통 및 메뉴 현황 조사 - 스마트팜 재배 땅콩 새싹 및 땅콩 오일을 이용한 레시피 연구(1, 2년차)
원물/시료 공급	- 정제된 원물/시료 공급	-주관기관, 위탁공동기관 소재공급, 세포, 동물실험용 땅콩 새싹 70% 에탄올 추출물 제작 및 공급
표준화 및 제조공정 개발	- 땅콩새싹 추출물의 표준화 및 제조공정 개발	- 유효 및 지표성분 함량 기준설정 - 원물 생산 조건에 따른 지표 및 유효성분 변이 연구 - 지표 및 유효성분의 제조 기준 설정 - 경제성, 효율성, 유효성에 기반한 땅콩새싹 추출물 제조 공정 개발

- 참여기관 3 (기관명칭) : (학)대전대학교 산학협력단 동서생명과학연구원

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
안전성이 확보된 추출로부터 파이토케미칼 활성을 갖는 생리활성 평가, 과학적 성분분석- 재배(시간)주기에 따른 동물실험 (ex. vitro, in vitro 혈액순환 효능평가)	인삼새싹 및 땅콩새싹의 혈소판 응집 억제율	- SD rat의 혈소판 응집 억제능은 측정계를 이용한 탁도 측정법으로 측정. - 세척 혈소판 (Washed platelet, PRP)을 37℃에서 3분간 인큐베이션 시킨 후, Platelet-poor plasma (PPP) 400 ㎕과 Platelet Rich Plasma (PRP) 400 ㎕을 각각 quartz에 분주하고 stirr bar를 넣은 후 프로그램을 실행 - 시료sample를 넣고 2분간 배양한 후 ADP 또는 collagen 을 첨가하여 혈소판 응집반응을 5분간 측정한 후 억제정도 (inhibition, %)를 계산. - 억제정도(inhibition, %)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여, 분석.
	Carrageenan 유도 mouse tail thrombosis 억제율 효능 평가하여 실험동물별, 시간별, 투여방법별 tail thrombosis 비교	- 생쥐의 꼬리에 혈전을 유도하는 carragenan 모델은 8주령 ICR mice와 SD rat에 1% carrageenan (type I)을 생리식염수와 PEG400에 녹여 약 40㎕를 생쥐 오른쪽뒷다리 발가락 사이에 주사하고, 24시간, 48시간, 72시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 디지털버니아 캘리퍼스 (Mitutoyo, japan)로 측정 및 사진을 기록함. - 시료와 양성대조군 aspirin (50 mg/kg), 그리고 vehicle은 carrageenan 주사 3일전부터 매일 오전 11시에 경구투여 하였고, 혈전 유도 당일은 carrageenan 주사 1시간 전에 경구투여, 그 이후는 carrageenan 주사 후 23시간, 47시간, 71시간에 경구투여함.
	High fat diet 중성지방 효능평가	- 60% HFD로 C57bl/6J에 고지방 식이 비만 (DIO))유도 유발 동물모델 - C57bl/6J 고지방 식이 비만 (DIO) 유발 생쥐의 체중 및 식이섭취량 - 항비만 복합물소재 추출물의 조제 및 매일 1회 12주간 경구투여 - C57bl/6J 고지방 식이 비만 (DIO) 유발 생쥐의 혈장 중 지질생화학적 분석 (ALT, AST, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, glucose, FFA, ɣ-GPT, LDH) - C57bl/6J 고지방 식이 비만 (DIO) 유발 생쥐의 ELISA kit 이용한 혈중 렙틴 (leptin), 인슐린 (insulin), 아디포넥틴 (Adiponectin) 측정 - 항고지방 식이 비만 (DIO) 효과에 의한 liver와 viceral fat에서 real-time PCR이용 유전자 발현 분석 (Leptin, adiponectin, PPAR-ɣ, UCP-2, AMPK-a1 & AMPK-a2) 및 WB 분석 - Liver와 Viceral adipocyte 병리조직분석 (H&E, Oil red 염색)

안전성이 확보된 추출(용매추출물 및 오일)로부터 파이토케미칼 활성을 갖는 생리활성 평가/과학적 성분분석	땅콩새싹의 유효성분 및 생리활성물질의 생리활성평가 (ex vivo, in vivo 혈액순환 효능평가)	*Ex-vivo* 혈소판응집 반응 억제 평가 - 산업화를 위한 대량생산 가능한 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가 - 흰쥐에 3일간 땅콩새싹의 유효성분을 경구투여 후 채혈하여 세척 혈소판(washed platelet)을 세포수 측정기(cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 준비 - ADP 10 μM, Collagen 7.0 μg/m, Thrombin 0.1U/ml, AAA 0.5 mM 등 유도를 다양하게 적용 - 혈소판 응집 억제능은 측정계 (Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA를 이용한 탁도 측정법으로 측정하여 억제정도 (inhibition,%)를 계산 Inhibition (%) = (A-B/A) x 100 A : control의 응집능 (%), B :시료처리시 응집능 (%)
	땅콩 알레르기의 동물모델 확립	• 땅콩 알레르기의 동물모델 확립 -C3H/HeJ mouse를 이용한 땅콩 알레르기의 동물모델확립 - 땅콩(peanut, PN)을 갈아서 경구 면역 강화제인 Cholera toxin과 함께 gavage feeding에 의하여 감작 - 식이단백에 대한 항체반응, 특히 IgE 항체 생성이 용이로운 strain의 하나인 BN rat은 food allergy 연구의 좋은 동물모델로 인정. - 경구유발시험을 시행하여 알레르기 증상 점수 비교 - 혈청을 이용한 항원 특이 IgE 반응을 확인 - 경구 감작 및 경부유발시험에 의하여 임상 증상이 유발된 좋은 food allergy 모델로 예상 - 경구 감작 뿐 아니라 복강내 주사를 통한 감작을 함께 시행함으로서 감작 경로가 다는 경우 반응의 차이 판단 - 5주된 C3H/HeJ mice를 사용하였으며, 미국에서 가장 흔히 시판되는 땅콩(peanut,PN)을 갈아서 경구 면역 강화제인 Cholera toxin (CT)과 함께 gavage feeding에 의하여 감작 즉 low dose (5mg/mouse)+CT, high dose(25mg/mouse)+CT, CT 단독, 및 Naive 군으로 나누어 실험, PN을 day 0, 1, 2에 연속 3일간 경구 감작 시킨 후 day 7과 21에 추가 경구 투여, 실험 5주째 경구유발시험을 시행 - 모델을 이용하여 면역조절제의 작용기전, 해당 항원의 처리에 의한 저알레르기 항원성 획득여부, 다른 항원들과의 교차항원성 여부 등에 관한 추가적인 연구를 시행할 수 있으며, allergy의 병인 규명과 면역 반응의 차단 혹은 면역관용 획득 방법의 개발에 도움을 줄 수 있다고 사료됨.
땅콩새싹 추출물을 이용한 혈액순환 건강식품 소재 개발	대량생산을 위한 땅콩새싹의 유효성분 및 생리활성물질의	*in vivo* Arterio-Venous(A-V) Shunt model을 이용한 유효성 평가 - 유효한 재배주기의 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효

	생리활성평가 (ex vivo, in vivo 혈액 순환 효능평가)	능을 평가 - 생성되는 Thrombosis 무게 측정 - 흰쥐에 3일간 땅콩새싹의 유효성분을 경구투여 후, 좌측경동맥(Left carotid artery)과 우측경맥(Right jugular vein)에 카테터를 삽입하여, 혈액을 흐르게 하여 전단응력(shear-stress)을도, 혈전을 생성, 건조시켜 무게를 측정하여 항응혈효과를 평가
	혈소판 활성화 기전연구	혈소판 활성화 기전연구 - TXA2 (Aspirin^{TM} Effect-Detection) 측정 - intracellular calcium ion 농도($[Ca2+]_i$ 측정) - ATP release 측정 - Serotonin 측정 - Fibrinogen Binding to Interin $\alpha_{IIb}\beta3$ 분석 - cAMP와 cGMP 수준 측정
	in vivo/ex vivo Carageenan 유도 혈전 생쥐모델을 이용한 유효성 평가	*in vivo/ex vivo* Carageenan 유도 혈전 생쥐모델을 이용한 유효성 평가 - 유효한 재배주기의 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가 - 흰쥐에 1% Carageenan 유도모델로 꼬리혈전 길이 측정 - 전혈응집억제 효능평가 (ADP 10 μM, Collagen 7.0 μg/ml)

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구 내용

1. 건강식품 개발 : 치매환자 대상 MMSE 테스트(공주 소재 주은라파스 병원과 MOU 협약을 통한 치매 예방 식품 개발 with 김기옥 전 한의학연구원 원장)

<그룹분류>

- 투약

1) 치매의 원인과 쓰인 약재의 효능추정

(1) 새싹이든 밀 : B군

㈜ 리본인터내셔널에서 개발한 '새싹이든 밀(땅콩새싹 밀크)'은 성분 중 레스베라트롤 등의 성분이 있어 중성지방을 분해하는 효과가 있는 것으로 추정된다. 그래서 B군(밀크 투여군) 치매와 경도인지장애 환자들에게 18명에게 1일 1봉(190 cc 씩 포장 됨)씩 3개월간(2019년 1월 7일부터 4월 6일까지) 1일 1회 여하여 MMSE를 측정으로 before와 after로 측정하였다.

(2) 총명탕 : C군

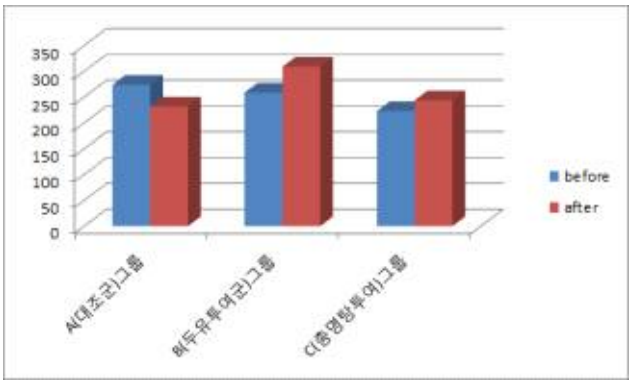
한약재중 총명탕 즉 백복신, 용안육, 석창포, 인삼 원지는 뇌의 기억력을 증가시키며 스트레스를 완화시키고 치매를 예방하는 약으로 알려져 있다. 특히 개지총명탕은 뇌의 해마손상을 회복시키고 뇌 내 TAU단백질이 증가하여 치매가 온다고 보아 이 두 가지 원인에 효과가 있는 것으로 보아 이를 C군(총명탕 한약 투여군) 17명의 치매와 경도인지장애 환자들에게 3개월간 1

일 1회 약 40cc씩 투여하여 MMSE 측정으로 before와 after로 측정하였다.

(3) 대조군 : A군

3개월간 19명의 치매와 경도인지장애 환자들에게 두유나 한약을 투여하지 않고 MMSE를 측정으로 before와 after로 측정하였다.

<MMSE 합산 전과 후 점수 비교>



[최종 고찰]

이상 3개월간 C군, B군, A군의 MMSE 검사를 전과 후로 비교하여 본 결과

한약투여군(C군)은 9.4 % 호전되었으며,

새싹이든밀 투여군(B군)은 20.23 % 호전되었으며,

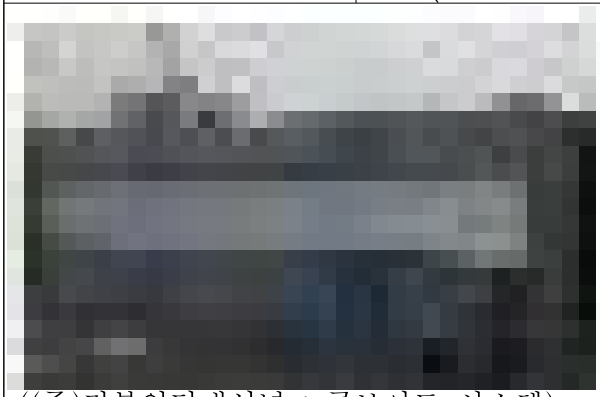
대조군 (A군)은 15.33% 악화된 것으로 결론이 나왔다.

식물성 단백질 음료 "새싹이든 밀"

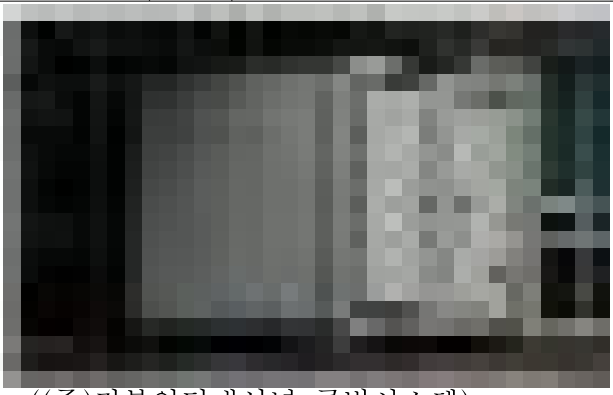
<건강식품 개발 完 제품군>

2. 땅콩새싹 Semi-pilot 및 Large scale 규모의 대량 생산, 재배주기에 따른 땅콩새싹의 Semi-pilot 및 Large scale(도입 시운전)의 생산(1)

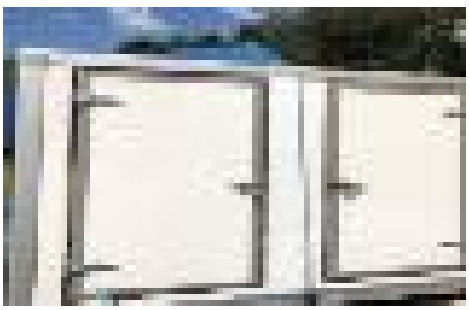
연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용



((주)리본인터내셔널 : 큐보이드 시스템)



((주)리본인터내셔널 큐빅시스템)



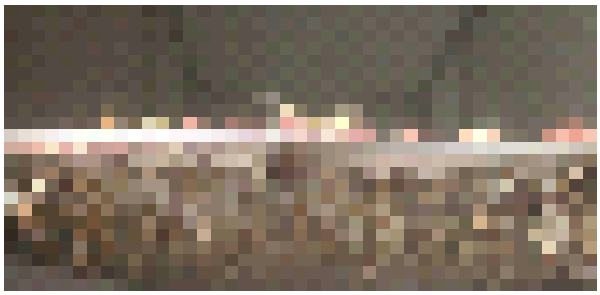
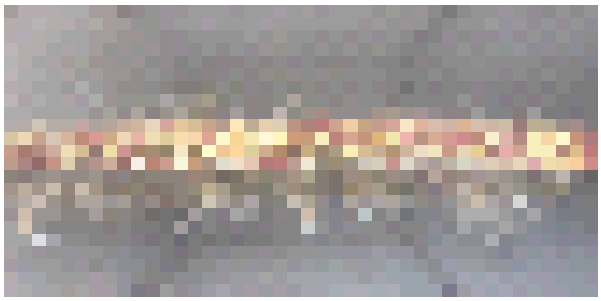
<특징> 1. 채반 수 : 16 채반 2. 컨트롤러 : 없음(각각 장치 제어) 3. 수확 용이성 : 각 채반 별 수거로 어려움 4. 실험용 pilot 장비	<특징> 1. 채반 수 : 30 채반 2. 컨트롤러 : 있음(장치 통합 제어) 3. 수확 용이성 : 단위 별 수거로 용이 4. 양산용 장비

-채반 별 수확 -재배시스템 세척 어려움	-단위 별 수확 -시스템 내부 구조 개선을 통한 세척 용이

2. 땅콩새싹 Semi-pilot 및 Large scale 규모의 대량 생산, 재배주기에 따른 땅콩새싹의 Semi-pilot 및 Large scale(도입 시운전)의 생산(2)

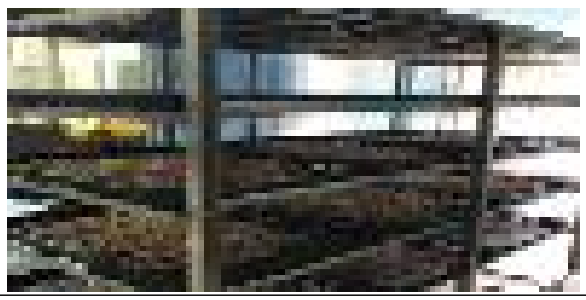
연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[기술요약정보; 땅콩새싹 재배 배경] 땅콩새싹 재배 과정(기존 장비와 신규 장비의 땅콩새싹 재배 과정은 동일함. 다만, 통합컨트롤러, 단위별 수확 용이성, 내부 구조 개선을 통한 세척용이 등 효율성이 더해졌음)

(신규장비 시험재배 운영중)

(신규장비 시험재배 운영중)



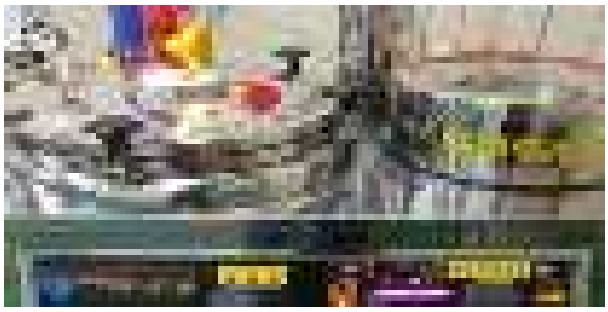
3. 프리미엄 슈퍼 고급 땅콩새싹 추출물(용매추출물 및 오일)로부터 파이토케미칼 활성을 갖는

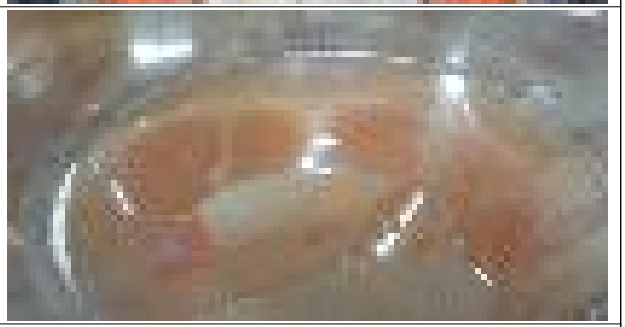
추출물 확보

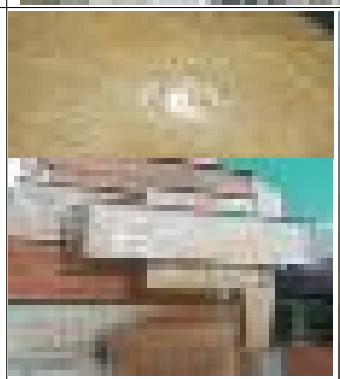
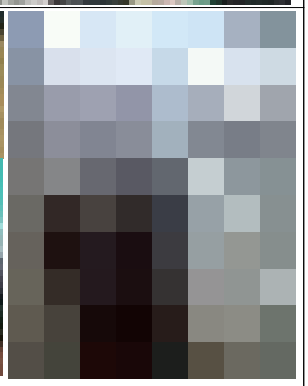
연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[기술요약정보; 시제품/제품화 초기 제작 배경]

• 땅콩새싹 추출공정 (1) : 100% 물 추출, 정제, 미분쇄, 동결건조 시료 제조





-실험 기초실험(**<u>용매추출 정제, 미분쇄, 동결건조</u>**) 시료제조

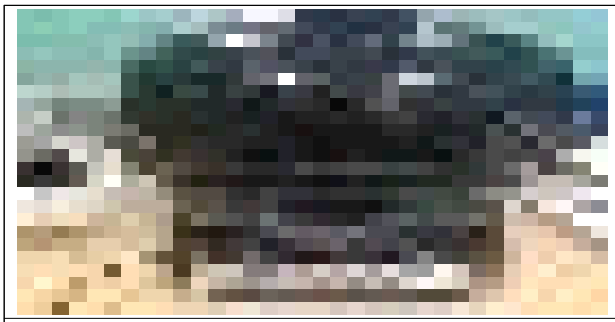
4. 안전성이 확보된 원천가공기술 원료 및 소재 확보

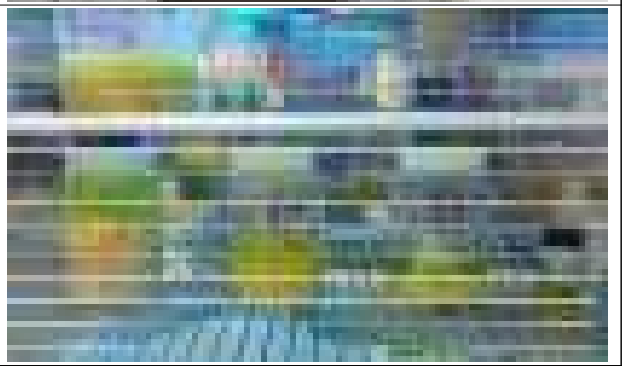
-**재배주기에 따른 가공방법**(증숙, 착즙, 저온 오일추출, 열풍건조, 멸균) 소재 확보

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[기술요약정보; 시제품/제품화 초기 제작 배경]

• 땅콩새싹 추출공정 (2) : 땅콩새싹 가공공정 증숙, 착즙, 저온착유, 열풍건조, 멸균(**실험실 스케일**)





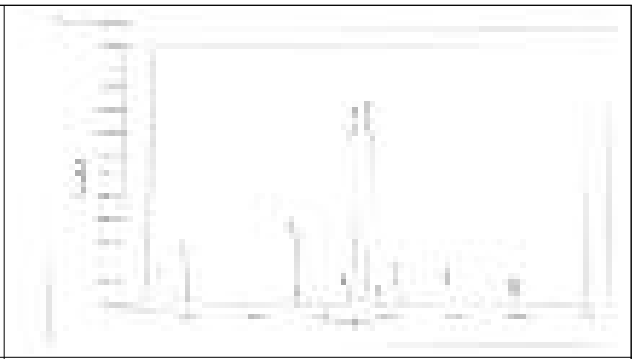
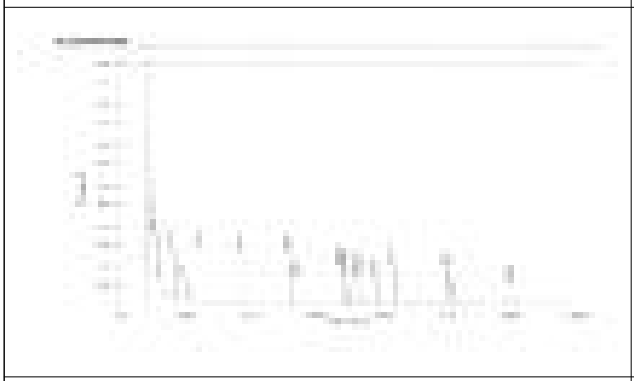
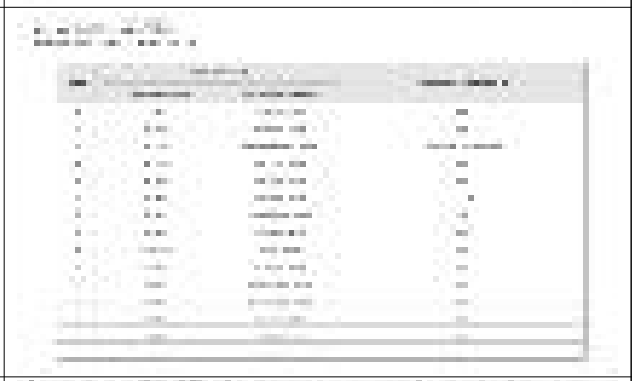
5. 안전성이 확보된 **일반유용 영양성분, 폴리페놀류/과학적 분석**

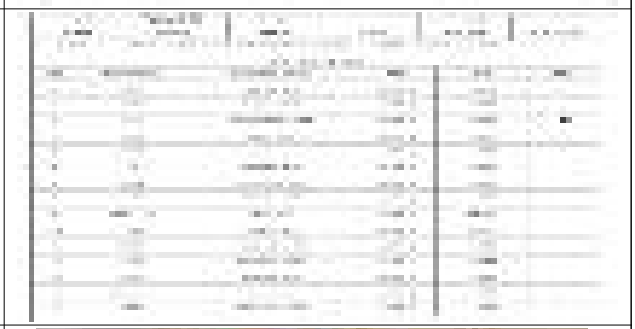
-제품화 유용성분 분석 의뢰(1)

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[기술요약정보; 시제품/제품화 초기 제작 배경]

• 이화학분석 및 유용성분 과학적 분석 (1)



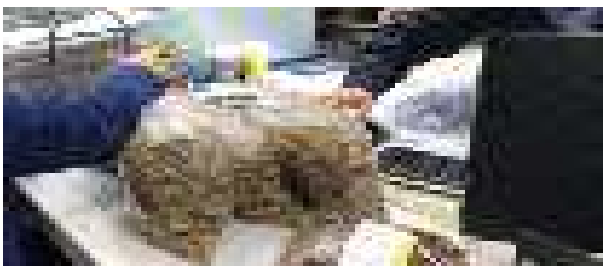
5. 안전성이 확보된 **일반유용 영양성분, 폴리페놀류/과학적 분석**

-공인인증기관/(한국식품과학연구원)(2)

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[기술요약정보; 시제품/제품화 초기 제작 배경]

• 이화학분석 및 유용성분 과학적 분석 (2)



6. 안전성이 확보된 원천가공기술 원료 및 소재 확보

- 시제품 제작 (㈜감로정 ; 저온 오일추출, ㈜에프앤바이오 ; 건강기능식품 비타민 음료) 확보

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[기술요약정보; 시제품/제품화 초기 제작 배경]

• 시제품 제작 (㈜감로정 ; 저온 오일추출, ㈜에프앤바이오 ; 건강기능식품 비타민 음료, 부여군 굿뚜레 식품가공센터 소재) 확보

〈기초 시제품 개발 성과〉

시제품 1 (생산 준비중)

시제품 2 (생산 준비중)

시제품 3

시제품 4

시제품 5

시제품 6

7. 기타 연구개발성과(1)

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

[논문게재 성과 ; 2017년 추계학술발표회에서 우수논문발표 수상]

논문제목 : 안개재배법으로부터 땅콩새싹 추출물을 이용한 혈액순환 건강식품 소재개발

7. 기타 연구개발성과(2)

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

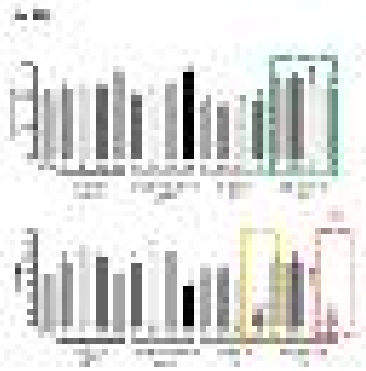
○ 연구개발성과

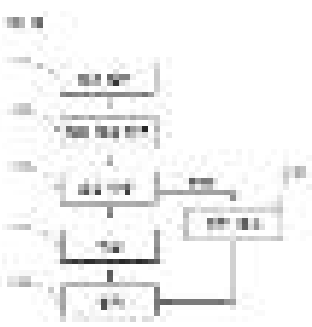
[특허 출원 성과]

출원번호	출원일	등록번호	발명의 명칭
10-2017-0158136	2017.11.24	출원	발아 땅콩 오일의 추출방법, 오일, 및 캡슐 담은 오일

(특허출원)

(발명내용)





7. 기타 연구개발성과(3)

연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

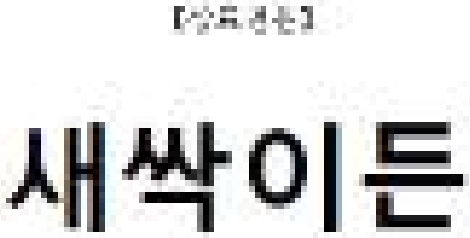
○ 연구개발성과

[상표 출원 성과]

출원번호	출원일	등록번호	상표의 명칭
40-2017-0156240	2017.12.06	출원	새싹이든
40-2017-0156196	2017.12.06	출원	Reborn & Delight

(새싹이든-상표출원)

(Reborn & Delight-상표출원)



7. 기타 연구개발성과(4)

2. 연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

○ 연구개발성과

[마케팅 홍보성과]

리본 인터내셔널 제품 마케팅 홍보 진행 현황 : 천연오일 시장중 코코넛오일, 아보카도오일, 아마씨유 등 이색원료를 사용한 식용유와 유기농 원료로 만든 식용유 및 원산지를 강조한 제품이 소비자들이 선호하는 식용유 제품으로 시장은 빠르게 변화하고 있다. ㈜리본인터내셔널 만의 보다 특화된 땅콩새싹 오일 제품은 해외에서도 제품 경쟁력과 차별성을 바탕으로 글로벌 경쟁력을 갖출 것으로 전망된다.

■ 온라인 기반 마케팅 홍보 채널 운영중

㈜리본인터내셔널(당사)은 식용유에 대한 언급이 가장 빈번하고 많은 블로그를 홍보 및 마케팅의 베이스 및 중심 컨텐츠 채널로 설정, 다양한 SNS 채널(페이스북, 인스타그램, 유튜브, 트위터, 구글플러스 등)로 확장해 나가면서 당사가 다루는 제품과 브랜드가 지속해 노출될 수 있도록 정보를 생성, 확장 시키며 소통의 채널로 강화시켜 나가고 있다.

1. **Naver Blog URL** : http://blog.naver.com/rebornfood
2. **InstagramURL**:https://www.instagram.com/rebornintl/
3. **Facebook URL** : https://goo.gl/QBRxru
4. **YouTube URL** : https://www.youtube.com/channel/UCgw7TUtuRPl9xx38Sj0aD9w
5. **Google Plus URL** : https://plus.google.com/u/1/

■ 건강 전문 사이트 개설 및 정보 제공

자사보유 미디어 채널(Owned Media)와 제 3자 획득 채널(Owned Meda)가 유기적으로 활용되어 검색 결과에 반영될 수 있도록 최적화 작업을 병행하고 있는 중이다. 온라인을 마케팅 및 홍보 채널을 통해 오프라인 매장을 통한 판매채널 확보도 준비중에 있다.

6. **땅콩새싹 연구소** : http://sesak.co.kr/

■ 소비자 참여 유도를 이끌어 내는 버즈화(Buzz) 전략

당사는 2주간의 짧은 <땅콩새싹 오일 제품명 네이밍 공모전 개최>를 **통해 약 900여 건의 제품명 후보 안을 접수** 받는 동시에, 온/오프라인 상의 회사 및 제품에 대한 사전 언급량(Buzz)를 높이는데 기여를 했다. (**업계에 따르면 네이밍 공모의 경우 평균적으로 3~4백건 정도의 후보안이 접수 되는 것에 비해 그 두배에 가까운 관심을 보여 준 것으로 평가하고 있음**)

http://brandcontest.kr/?p=3921

7. 기타 연구개발성과(5)

2. 연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

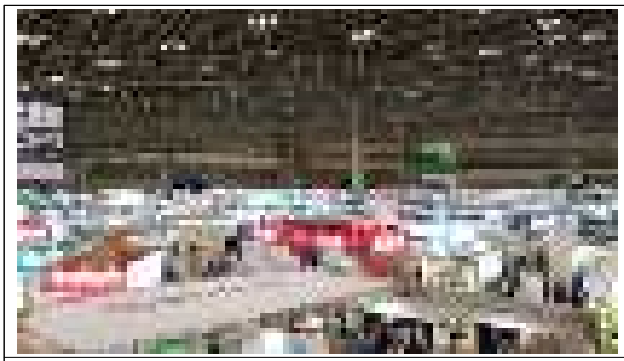
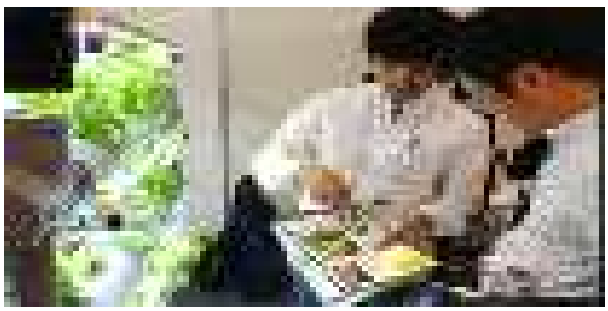
○ 연구개발성과

[2017년 1차년도 해외출장 성과]

출장지 : 일본 동경 출장

출장기간 : 2017년 10월12일-14일(2박3일)

출장목적 : MOU 및 전시회 참가 및 기술상담

<table>
<tr><td>  </td><td> </td></tr>
<tr><td>농업식품 박람회 전시회 참가(1)</td><td>농업식품 박람회 전시회 기술상담 담당자(2)</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td>농업식품 박람회 전시회 참가(3)</td><td>농업식품 박람회 전시회 /
시스템미팅내용(4)</td></tr>
<tr><td>  </td><td> </td></tr>
<tr><td>농업식품 박람회 전시회 /
시스템미팅내용(5)</td><td>MOU 체결 / 일본</td></tr>
</table>

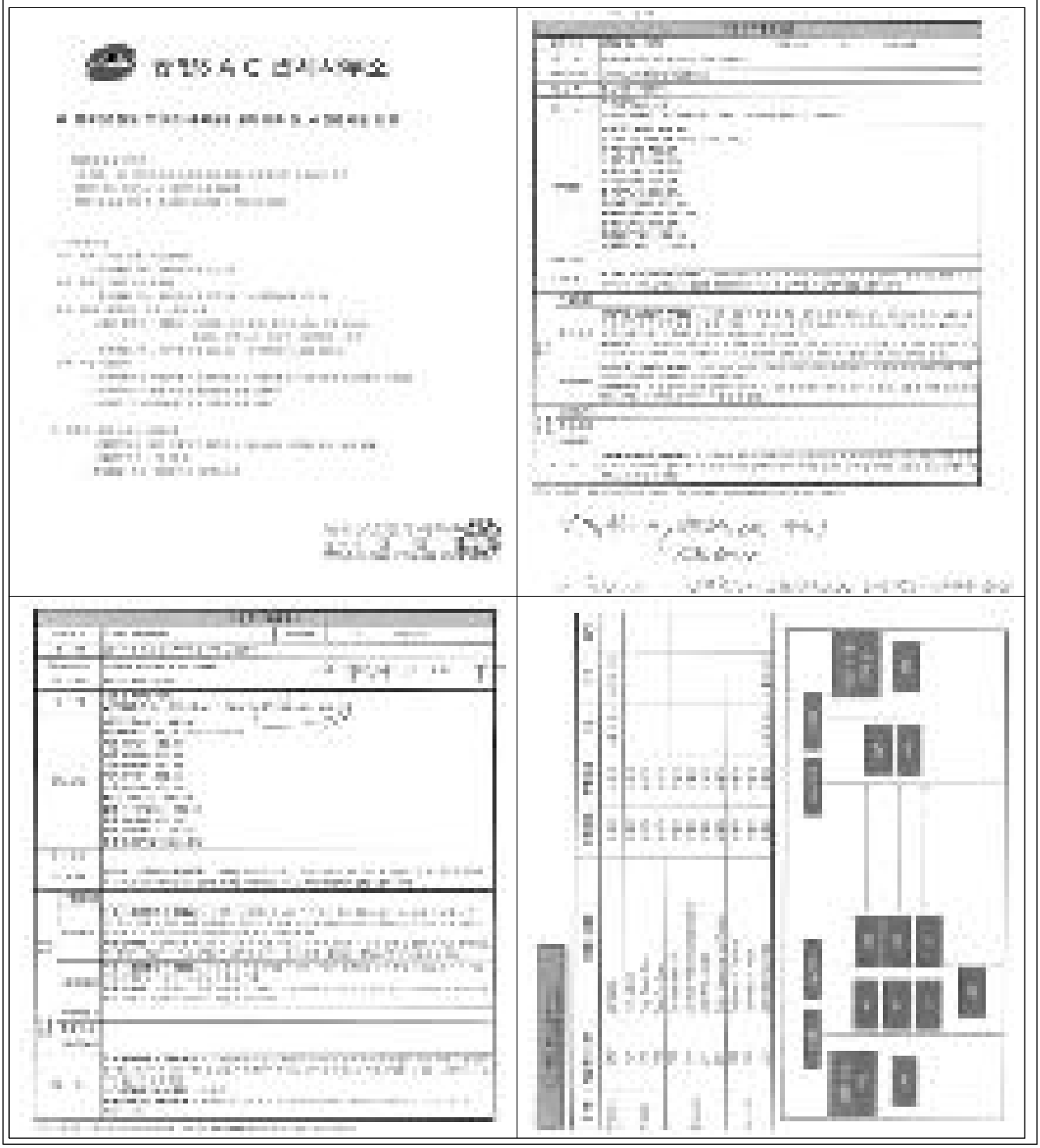
7. 기타 연구개발성과(6)

2. 연 구 범 위	연구수행방법	구체적인 내용

○ 연구개발성과

[관세 및 무역상담 성과]

상담내용 : 무역거래 및 기술상담



8. 세포 배양

- 마우스 대식세포 (macrophage) RAW 264.7 세포(American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, 미국)를 5.5% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 units/㎖ penicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin을 첨가한 DMEM 배지로 37℃ 및 5% CO_2 환경에서 배양
- 마우스 비만세포(mast cell) MC/9 세포를(American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, 미국) 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 units/㎖ penicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin을 첨가한 DMEM 배지로 37℃ 및 5% CO_2 환경에서 배양하였다.

9. 세포 독성 실험

- 땅콩새싹 발아 일자별 시료의 세포 독성을 확인하고자 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay를 실시
- 96 웰 플레이트 (well plate)에서 마우스 대식세포와 MC/9 비만세포에 각각 시료를 농도별 처리하고 24시간 동안 배양
- CCK-8을 10% 농도로 첨가한 다음 2시간 동안 37℃에서 반응시킨 후, microplate reader((Molecular Devices, Hercules, 미국)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포 생존율(%)을 계산

다가가다. NO 분비 억제 효능평가

- RAW 264.7 세포에 땅콩새싹 발아 일자별 시료를 농도별로 처리하여 2시간 후 LPS (0.5㎍/mL) 처리 후 24시간 동안 배양
- 상등액의 nitrite는 Griess reagent를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하여 NO생성 억제 효과를 확인

라나. Histamine 분비 억제 효능평가

- 배양된 MC/9 마우스 비만 세포를 96웰 플레이트에 접종하여 25㎍/㎖의 compound 48/80(Sigma, USA)과 땅콩새싹 발아 일자별 시료를 30분 동안 처리
- 배지에 분비된 알러지성 히스타민(Histamine)의 분비량을 ELISA kit (Oxford Biomedical Research Inc., USA)로 측정

10. 인삼새싹 및 땅콩새싹의 혈소판 응집 억제율

- SD rat의 혈소판 응집 억제능은 측정계를 이용한 탁도 측정법으로 측정.
- 세척 혈소판 (Washed platelet, PRP)을 37℃에서 3분간 인큐베이션 시킨 후, Platelet-poor plasma (PPP) 400 ㎕과 Platelet Rich Plasma (PRP) 400 ㎕을 각각 quartz에 분주하고 stirr bar를 넣은 후 프로그램을 실행
- 시료sample를 넣고 2분간 배양한 후 ADP 또는 collagen 을 첨가하여 혈소판 응집반응을 5분간 측정한 후 억제정도 (inhibition, %)를 계산.
- 억제정도(inhibition, %)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여, 분석

11. carrageenan 유도 mouse tail thrombosis 억제율 효능 평가하여 실험동물별, 시간별, 투여 방법별 tail thrombosis 실험

- 생쥐의 꼬리에 혈전을 유도하는 carragenan 모델은 8주령 ICR mice와 SD rat에 1% carrageenan (type I)을 생리식염수와 PEG400에 녹여 약 40㎕를 생쥐 오른쪽뒷다리 발가락 사이에 주사하고, 24시간, 48시간, 72시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 디지털버니아 캘리퍼스 (Mitutoyo, japan)로 측정 및 사진을 기록함.
- 시료와 양성대조군 aspirin (50 mg/kg), 그리고 vehicle은 carrageenan 주사 3일전부터 매일 오전 11시에 경구투여 하였고, 혈전 유도 당일은 carrageenan 주사 1시간 전에 경구투여, 그 이후는 carrageenan 주사 후 23시간, 47시간, 71시간에 경구투여함.

12. 고지방식이에 의해 유도된 비만 (HFD)유도 동물모델에서의 효능평가 (항비만 3HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물)

(가)재료 및 시험물질

① 시험대상물질: HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물

② 공급자 : 한국한의학연구원

③ 성상 : 추출물/분말

④ 대전대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받는다.

(2) 동물 시험군 분류 ; C57bl/6Jj 생쥐 100수

(1) 실험동물

수컷 7주령의 C57bl/6Jj 생쥐 (웅성 8주령 24g 생쥐)는 대한바이오링크사 (Eumsung, Korea)에서 공급받았고, 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간 light-dark cycle의 환경을 유지하며 1 주간 적응시킨 후 실험에 사용한다. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인을 받는다.

(2) 비알콜성 지방간(NAFLD)유도 동물모델에서의 효능평가

- 60% HFD로 C57bl/6J에 고지방식이 (HFD)유도 유발 비만 동물모델
- C57bl/6J에 고지방식이 (HFD)유도 유발 생쥐의 체중 및 식이섭취량
- HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 조제 및 매일 14주간 경구투여
- C57bl/6J에 고지방식이 (HFD)유도 유발 생쥐의 혈장 중 지질생화학적 분석

(ALT, AST, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, glucose, FFA, γ-GPT, LDH)

- C57bl/6J에 고지방식이 (HFD)유도 유발 동물모델의 Liver와 viceral adipocyte 병리조직분석 (H&E, Oil red 염색)

(나) 연구 방법

⊙ 고지방식이 (HFD)유도 유발 동물모델의 효능평가

(1) 고지방식이 (HFD)유도 유발 모델동물 실험설계

본 실험을 위하여 사용된 7주령 숫컷 C57bl/6J 생쥐동물은 대한바이오링크사 (Eumsung, Korea)에서 분양받아 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하며, 이를 위하여 고지방식이로 유도한 비만병태모델을 다 같이 제작했다. 8 주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐 (대한바이오링크)를 항온 (25±2℃), 항습 (50±5%) 및 12시간 간격의 광주기 (light on 07:00 ~ 19:00)로 조절되는 SPF환경에서 2 주간 기본사료와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용한다. 물을 자유롭게 공급하면서 적응시킨 후, 체중이 약 24g 이상 되는 10 주령부터 고지방식이 (#D12492 60 kcal fat, Research Diets Inc, USA)를 투여하여 비만 (HFD) 병태모델을 제작했다.

(2) 항비만 후보시료

- 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (200 mg/kg)
- 비만 개선 HFD_PNS_E 9day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 9day (200 mg/kg)

(3) 고지방식이 (HFD)유도 유발 동물모델에서의 효능평가

① C57bl/6J생쥐에 HFD 고지방식이에 의해 비만병태 동물모델

고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 항비만 효과를 검증하고자 정상대조군(C57BL/6J-vehicle, ND), 고지방식이 비만유도대조군 (HFD_HFD_CTL), 양성대조군 HFD_HCA (245 mg/kg) 실험군, 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (200 mg/kg), HFD_PNS_E 9day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 9day (200 mg/kg)들을 비교 검증했다. 이를 위하여 고지방식이로 유도한 비만병태모델을 다음과 같이 제작했다. 8 주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐 (대한바이오링크)를 항온 (25±2℃), 항습 (50±5%) 및 12시간 간격의 광주기 (light on 07:00 ~ 19:00)로 조절되는 SPF환경에서 2 주간 기본사료(AIN-76A diet)와 물을 자유롭게 공급하면서 적응시킨 후, 체중이 약 24g 이상 되는 10 주령부터 고지방식이 (#D12492 60 kcal fat, Research Diets Inc, USA)를 투여하여 비만 (HFD) 병태모델을 제작했다.

② 항비만 HFD_PNS_E 추출물 시험물질 제조 및 검액 투여

실험군은 정상대조군(C57BL/6J-vehicle,ND), 고지방식이 비만유도대조군 (HFD_HFD_CTL), 양성대조군 HFD_HCA (245 mg/kg) 실험군, 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (200 mg/kg), HFD_PNS_E 9day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 9day (200 mg/kg)로 분리하여, 각각 0.5%CMC (carboxymethyl cellulose)에 혼탁하여 0.2ml 용량으로 투여하고, 약물투여는 경구투여용 금속제 존대(Zonde)를 이용하여 위내로 강제 경구투여 한다.

(4) 고지방식이 (HFD)유도 유발 동물모델 제작, HFD_PNS_E 3day, 9day 추출물 투여 및 혈액생화학 검사

C57bl/6J 마우스를 2주간 기본사료(AIN-76A diet)로 적응시킨 후 10주령부터 HFD식이섭취와 항비만 HFD_PNS_E 3day, 9day 추출물 투여를 14주간 병행한다. 식이섭취량 및 체중은

매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였으며, 최종 실험 종료 후 심장천자법으로 채혈하여 혈액생화학적 검사를 실시하기 위하여 채혈 후 30분 이내에 3,000 rpm, 4 ℃에서 15분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하여 -70 ℃에 보관한다가 분석한다. 각 실험동물로부터 분리한 혈장 (plasma)에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST를, 신장기능 지표인 BUN, creatinine을, 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤, HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), 중성지방(triglyceride), 혈당, γ-GPT, LDH의 함량을 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정한다.

(5) 부검 및 detection 계획

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 6시간 동안 절식시킨 후 혈액을 채취하여 동일한 방법으로 처리하고, 각 실험동물의 장기조직(간, 지방조직)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 칭량 후, RNA 실험용은 RNA 안정액 (RNAsol^{B})에 보관하여 일주일 안에 RNA을 뽑고, 나머지 부분은 액체질소로 급냉시켜 -70 ℃ 냉동고에 보관한다.

(6) C57bl/6J 고지방식이 (HFD)유도 유발 동물모델 생쥐의 체중 및 식이섭취량

C57bl/6J 고지방식이 (HFD)유도 유발 생쥐를 2주간 기본사료(AIN-76A diet)로 적응시킨 후 10주령부터 식이섭취하여 평균체중이 28g~29g사이에 도달하면, 항비만 HFD_PNS_E 3day, 9day 추출물을 14주간 투여한다. 식이섭취량 및 체중은 매주 일정한 시간에 측정하여 기록함.

(7) 체중 (body weight)

① 체중변화 : 매주 수요일 9 시에 측정/기록

② 총 체중 증가량 : Final body wt - initial body wt

③ 1 일 평균 체중 증가량 = Total body wt gain / days

(8) 식이섭취량 (food intake)

1 일 평균 식이 섭취량 - Total food intake / days

(9) 식이효율 (food efficiency ratio, FER)

FER = [Total weight gain / Total food intake] x 100

(10) C57bl/6J 고지방식이 (HFD)유도 유발 생쥐의 지방조직 중량 측정

항비만 HFD_PNS_E 3day, 9day 추출물을 14주간 투여 후 각 실험동물을 피하지방 (abdominal subcutaneous fat), 부고환주변 복부지방량 (epididymal adipose tissue), 그리고 신장후 복막 지방조직(retroperitoneal adipose tissue), 내장지방량 (VISCERAL FAT AMOUNT)으로 구분하여 적출 후 지방조직의 중량을 산출한다.

(11) C57bl/6J 고지방식이 (HFD)유도 유발 생쥐의 혈장중 지질생화학적 분석

항비만 HFD_PNS_E 3day, 9day 추출물을 14주간 투여 후 각 실험동물로부터 분리한 혈장 (plasma)에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST를, 혈장 및 간의 지질함량의 지표인 총콜레스테롤, HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), 중성지방 (triglyceride), FFA, 혈당, γ-GPT, LDH의 함량을 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi

Medical, Japan)를 이용하여 측정한다.

(12) 병리조직분석

항비만 HFD_PNS_E 3day, 9day 추출물을 14주간 투여 후 주요 장기들에 대한 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 간과 지방조직등을 절취하여 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정 시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4㎛두께의 조직절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 및 오일-레드 O 염색을 시행한 뒤 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경위에서 조직 또는 장기별 특이 병변의 유무를 관찰한다.

(13) 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, $p<0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시한다.

13. 땅콩새싹의 유효성분 및 생리활성물질의 생리활성평가 (*ex vivo, in vivo* 혈액 순환 효능평가)

- *Ex-vivo* 혈소판응집 반응 억제 평가
- 유효한 재배주기의 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가
- 혈소판 응집 억제능에 사용한 세척 혈소판 (washed platelet)은 세포수 측정기 (cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 계측하고 완충액 (buffer, 37 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1mM MgCl2, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO3, 0.34 mM Na2HPO4, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)으로 희석하여 혈소판이 3×10^8 platelet/mL이 되도록 조정함.
- 흰쥐에 3일간 땅콩새싹의 유효성분을 경구투여 후 채혈하여 세척 혈소판(washed platelet)을 세포수 측정기(cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 준비
- 흰쥐 (SD rat)의 혈소판 응집 억제능은 측정계 (Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정한다. 세척 혈소판 (Washed platelet, PRP)을 37℃에서 3분간 인큐베이션 (incubation) 시킨 후, Platelet-poor plasma (PPP) 400 ㎕과 Platelet Rich Plasma (PRP) 400 ㎕을 각각 quartz에 분주하고 stirr bar를 넣은 후 프로그램을 실행시킨다. 시료sample (200, 100, 50 ㎍/ml)을 넣고 2분간 배양한 후 응집유도물질을 첨가하여 혈소판 응집반응을 5분간 측정한 후 억제정도 (inhibition, %)를 계산한다. 억제정도(inhibition, %)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여 분석함.
- ADP 10 μM, Collagen 7 μg/m, Thrombin 0.1U/ml, AA 0.5 mM 등 유도를 다양하게 적용
- 혈소판 응집 억제능은 측정계 (Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA를 이용한 탁도 측정법으로 측정하여 억제정도 (inhibition,%)를 계산

$$\text{Inhibition (\%)} = (A-B/A) \times 100$$

A : control의 응집능 (%), B :시료처리시 응집능 (%)

14. *in vivo* Arterio-Venous(A-V) Shunt model을 이용한 유효성 평가

- 유효한 재배주기의 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가
- Arterio-Venous(A-V) Shunt model 및 약물 투여 2시간 전에 천연물 유래 혈액개선 후보물을 DDW에 잘 녹인 후 350g의 SD 흰쥐에 500mg/kg씩 경구 투여함.
- 1시간 후 SD rat의 복강에 2ml 씩 urethane 1.25g/kg을 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 Left carotid artery와 Right jugular vein에 PE50 tube로 cannulation 함.
- 5cm silicon tube에 cotton thread을 넣고 saline을 채운 후 artery와 vein에 연결된 tube로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 thrombus를 생성시킨다.
- 생성된 thrombus를 건조시켜 무게를 측정하여 antiplatelet efficacy를 평가함
- 흰쥐에 3일간 땅콩새싹의 유효성분을 경구투여 후, 좌측경동맥(Left carotid artery)과 우측경 맥(Right jugular vein)에 카테터를 삽입하여, 혈액을 흐르게 하여 전단응력(shear-stress)을 유도, 혈전을 생성, 건조시켜 무게를 측정하여 항응혈효과를 평가

15. *in vivo/ex vivo* Carageenan 유도 혈전 생쥐모델을 이용한 유효성 평가
- 유효한 재배주기의 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가
- 생쥐의 꼬리에 혈전을 유도하는 carragenan 모델은 8주령 ICR mice에 1% carrageenan (type I)을 생리식염수에 녹여 약 40㎕를 생쥐 오른쪽뒷다리 발가락 사이에 주사함.
- 24시간, 48시간, 72시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 디지털버니아 캘리퍼스 (Mitutoyo, japan)로 측정 및 사진을 기록함.
- 시료 및 양성대조군 aspirin (50 mg/kg), 그리고 vehicle은 carrageenan 주사 3일전부터 매일 오전 11시에 경구투여 하였고, 혈전 유도 당일은 carrageenan 주사 1시간 전에 경구투여, 그 이후는 carrageenan 주사 후 23시간, 47시간, 71시간에 경구투여함.
- 흰쥐에 1% Carageenan 유도모델로 꼬리혈전 길이 측정
- 전혈응집억제 효능평가 (ADP 10 μM, Collagen 7.0 μg/ml)

16. 땅콩 알레르기의 동물모델 확립

-C3H/HeJ mouse를 이용한 땅콩 알레르기의 동물모델확립
- 땅콩(peanut, PN)을 갈아서 경구 면역 강화제인 Cholera toxin과 함께 gavage feeding에 의하여 감작
- 식이단백에 대한 항체반응, 특히 IgE 항체 생성이 용이로운 strain의 하나인 BN rat은 food allergy 연구의 좋은 동물모델로 인정.
- 경구유발시험을 시행하여 알레르기 증상 점수 비교
- 혈청을 이용한 항원 특이 IgE 반응을 확인
- 경구 감작 및 경부유발시험에 의하여 임상 증상이 유발된 좋은 food allergy 모델로 예상
- 경구 감작 뿐 아니라 복강내 주사를 통한 감작을 함께 시행함으로서 감작 경로가 다는 경우 반응의 차이 판단
- 5주된 C3H/HeJ mice를 사용하였으며, 미국에서 가장 흔히 시판되는 땅콩(peanut,PN)을

갈아서 경구 면역 강화제인 Cholera toxin (CT)과 함께 gavage feeding에 의하여 감작 즉 low dose(5mg/mouse)+CT, high dose(25mg/mouse)+CT, CT 단독, 및 Naive 군으로 나누어 실험, PN을 day 0, 1, 2에 연속 3일간 경구 감작 시킨 후 day 7과 21에 추가 경구 투여, 실험 5주째 경구유발시험을 시행

- 모델을 이용하여 면역조절제의 작용기전, 해당 항원의 처리에 의한 저알레르기 항원성 획득여부, 다른 항원들과의 교차 항원성 여부 등에 관한 추가적인 연구를 시행할 수 있으며, allergy의 병인 규명과 면역 반응의 차단 혹은 면역관용 획득 방법의 개발에 도움을 줄 수 있다고 사료됨.

17. *Ex-vivo* 혈소판응집 반응 억제 평가

- 산업화를 위한 대량생산 가능한 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가
- 흰쥐에 3일간 땅콩새싹의 유효성분을 경구투여 후 채혈하여 세척 혈소판(washed platelet)을 세포수 측정기(cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 준비
- ADP 10 μM, Collagen 7.0 μg/m, Thrombin 0.1U/ml, AAA 0.5 mM 등 유도를 다양하게 적용
- 혈소판 응집 억제능은 측정계 (Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA를 이용한 탁도 측정법으로 측정하여 억제정도 (inhibition,%)를 계산

Inhibition (%) = (A-B/A) x 100 (A : control의 응집능 (%), B :시료처리시 응집능 (%))

- *in vivo* Arterio-Venous(A-V) Shunt model을 이용한 유효성 평가
- 산업화를 위한 대량생산 가능한 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가
- 생성되는 Thrombosis 무게 측정
- 흰쥐에 3일간 땅콩새싹의 유효성분을 경구투여 후, 좌측경동맥(Left carotid artery)과 우측경맥(Right jugular vein)에 카테터를 삽입하여, 혈액을 흐르게 하여 전단응력(shear-stress)을 전도, 혈전을 생성, 건조시켜 무게를 측정하여 항응혈효과를 평가

18. in vivo / ex. vivo Carageenan 유도 혈전 생쥐모델을 이용한 유효성 평가

- 산업화를 위한 대량생산 가능한 땅콩새싹의 유효 및 생리활성물질에 대한 효능을 평가
- 흰쥐에 1% Carageenan 유도모델로 꼬리혈전 길이 측정
- 전혈응집억제 효능평가 (ADP 10 μM, Collagen 7.0 μg/ml)

19. 기능식품 후보소재 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days의 collagen에 의한 혈소판 활성화 기전연구

- *EX-vivo* 혈전억제 효능평가

• 8주령 SD rat을 군당 10마리로 구분하여 1주간 사육실에서 순화 후 생땅콩추출물(PN_E, 200 mg/kg), 땅콩새싹 3일 추출물 (PNS_E_3 days) 그리고 땅콩새싹 9일 추출물 (PNS_E_9 days) 투여농도 (200, 400 mg/kg), 양성대조군 aspirin (50 mg/kg), 그리고 vehicle은 혈소판분리를 위한 채혈 3일전부터 매일 오전 11시에 경구투여 하였고, 혈소판분

리를 위한 채혈 1시간 전에 경구투여함.

① 흰쥐 혈소판 준비

준비된 rat을 에틸에테르 (ethyl ether)로 마취하고, 미리 항응고제로서 0.15M의 구연산나트륨 (sodium citrate) 2ml을 주사기에 넣고 심장천좌법으로부터 11ml을 채혈한다. 5.5ml의 혈액에 2ml의 세척완충액 (tyroid washing buffer, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl2, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO3, 0.34 mM Na2HPO4, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)로 2회 세척한 후 2회 반복했다. 모두 모아진 상층액을 500 rpm에서 7분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전된 혈소판을 7.7ml의 현탁완충액 (Hepes-tyroid suspension buffer, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl2, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO3, 0.34 mM Na2HPO4, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)에 현탁시켜서 세척 혈소판(washed platelet)으로 한다.

② 혈소판응집능 측정

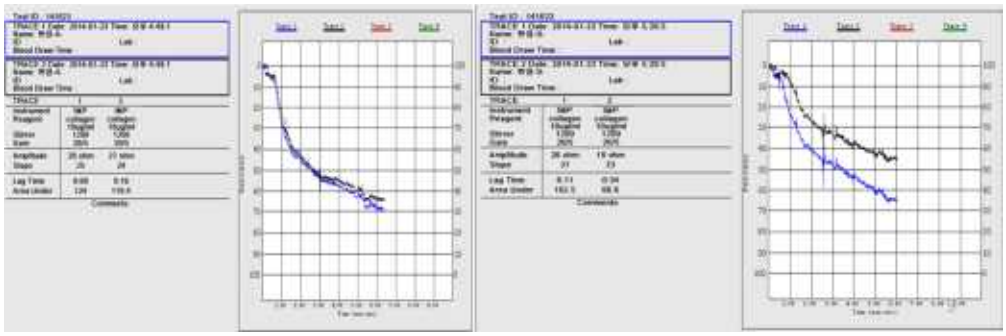
혈소판 응집 억제능에 사용한 세척 혈소판 (washed platelet)은 세포수 측정기 (cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 계측하고 완충액 (buffer, 37 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1mM MgCl2, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO3, 0.34 mM Na2HPO4, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)으로 희석하여 혈소판이 3×10^8 platelet/mL이 되도록 조정한다.

③ 혈소판 응집 억제능 측정

흰쥐 (SD rat)의 혈소판 응집 억제능은 측정계 (Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정한다. 세척 혈소판 (Washed platelet, PRP)을 37℃에서 3분간 인큐베이션 (incubation) 시킨 후, Platelet-poor plasma (PPP) 400 ㎕과 Platelet Rich Plasma (PRP) 400 ㎕을 각각 quartz에 분주하고 stirr bar를 넣은 후 프로그램을 실행시킨다. Collagen (5 ㎍/ml)을 첨가하여 혈소판 응집반응을 5분간 측정한 후 억제정도 (inhibition, %)를 계산한다. 억제정도(inhibition, %)는 시료를 처리하지 않은 것을 control로 하여, 다음 수학식과 같은 방법으로 구한다.

Inhibition (%) = (A-B/A) x 100

A : control의 응집능 (%), B :시료처리시 응집능 (%)



A : control의 응집능 (%), B :시료처리시 응집능 (%)

④ ATP release 측정

혈소판의 활성화를 통해서 여러 활성인자 들이 dense granule에서 분비되게 되는데 그 중에서 대표적인 활성인자이며 이로 인해서 다른 혈소판이나 염증 세포의 활성화를 유도하는 인자이다.

(2) TXA2 (Aspirin^{TM} Effect-Detection) 측정

혈소판이 활성화되면, phospholipid membrane으로부터 archidonic acid를 기질로 cyclooxygenase에 의해 생성되는 PGH_2로부터 thromboxane A2 (TxA_2)가 만들어진다. 이 TxA_2는 불안정한 물질로서 반감기가 짧기 때문에 안정한 대사체인 thromboxane TXA_2를 정량을 통해 측정하며, 또한 다른 혈소판의 활성화를 유도하는 대표적인 활성 인자이다.

(3) intracellular calcium ion 농도($[Ca2+]_i$ 측정)

세포 내 Ca^{2+}은 혈소판이 활성화 및 응집되는 과정에서 없어서는 안 되는 활성 인자로 여러 agonist에 의해서 Ca^{2+}를 통해 유입되거나 Ca^{2+} mobilization 과정을 통해 분비가 일어나기 때문에 혈소판의 활성화 및 억제하는 정도를 측정하는데 있어서 중요한 지표인자이다.

(4) Serotonin 측정

혈액의 혈소판 등은 활성화되면 혈액 내 serotonin을 분비하며 이는 인접세포를 자극하여 혈행을 저하시킨다. 따라서 serotonin을 측정하는 원리는 o-phthalaldehyde (OPT)와 반응해서 fluorophore를 형성한다. 최적의 fluorimetric condition에서 22 pmol 이하를 검출할 수 있다. 혈소판의 serotonin 함량은 300 nmol/10 humal platelets 부터 6930ìmol/10 rabbit platelets까지 종에 따라 다양하며 공통적으로 일어나는 중요한 인자이다.

(5) Fibrinogen Binding to Interin $\alpha_{IIb}\beta3$ 분석

$A_{IIb}\beta3$ recptor는 혈소판의 활성화 과정으로 외부로 노출되는 활성화를 이루게 되는데, 이때 $\alpha_{IIb}\beta3$ receptor는 fibrinogen과 결합을 통해서 혈소판간의 응집을 형성하게 된다. 그래서 최근에는 강한 응집을 억제하여 혈전 형성을 막기 위해서 $\alpha_{IIb}\beta3$ receptor의 활성 억제를 target으로 연구가 진행이 되기도 한다.

(6) cAMP와 cGMP 수준 측정

혈소판의 활성화 과정에서 억제되는 signal 로서 반대로 cAMPs나 cGMP level의 상승은 혈소판의 reactivation 과정으로 억제는 signal로서 PKC 활성화나 dense tubular system의 활성화 억제를 통해 Ca^{2+} 분비를 억제하는 것으로 알려져 있는 인자이다.

20. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, $p<0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

<연구 결과>

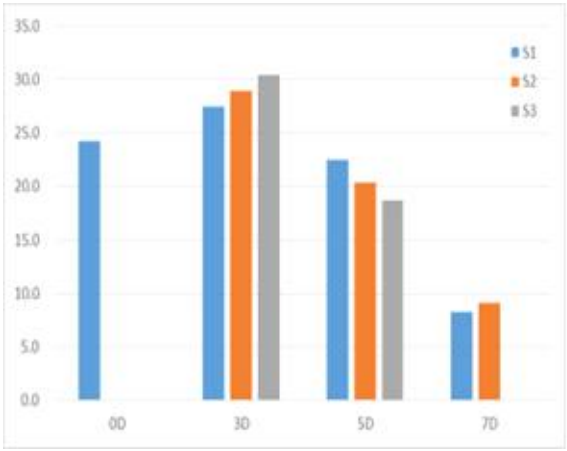
1. 땅콩새싹의 발아 기간에 따른 땅콩 새싹의 비극성 및 극성 용매 추출 수율 비교함.

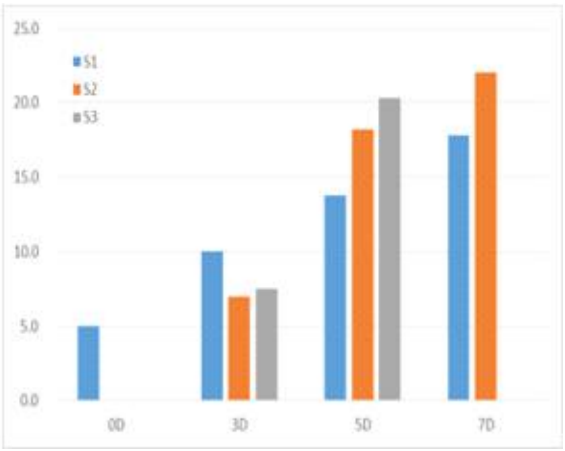
비극성 용매(hexane) 추출 수율

(%)	S1	S2	S3
0 Day	24.2	24.2	
3 Day	27.5	29.0	30.4
5 Day	22.5	20.4	18.7
7 Day	8.3	9.1	

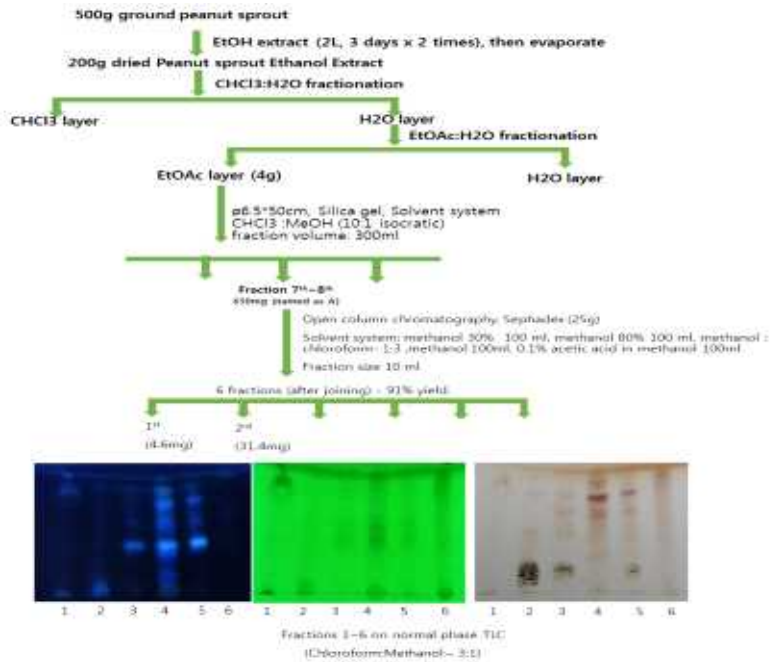
극성 용매(70% ethanol) 추출 수율

(%)	S1	S2	S3
0 Day	5.0	5.0	
3 Day	10.0	7.0	7.5
5 Day	13.8	18.2	20.3
7 Day	17.8	22.0	

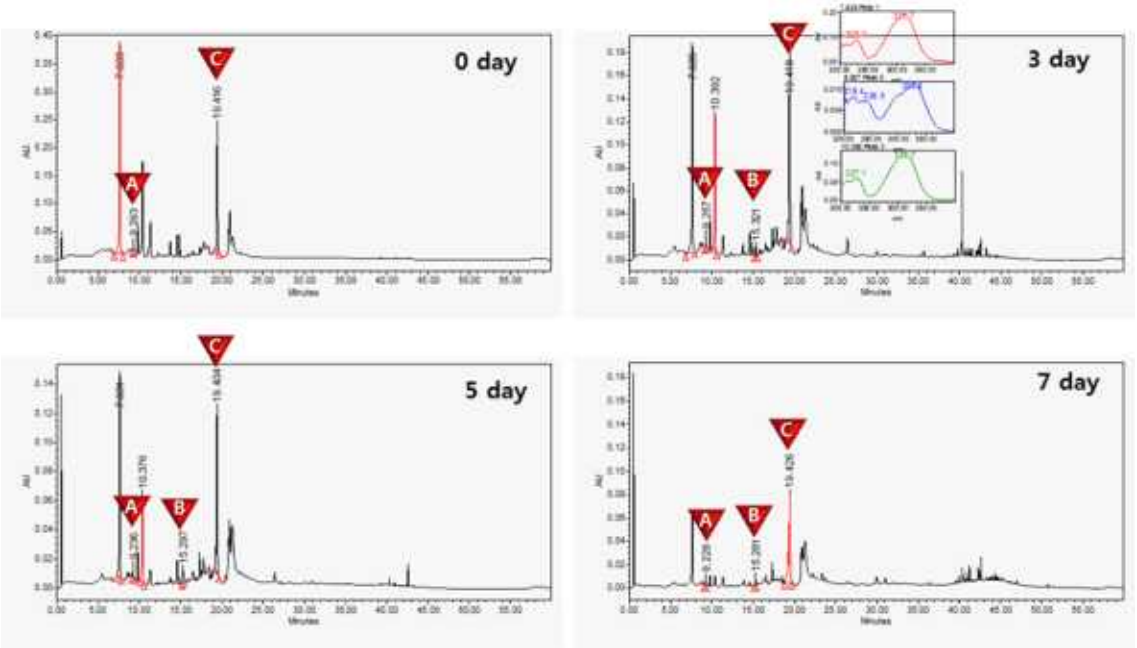




2. 땅콩 새싹 추출물의 지표성분 추적 및 효능 평가를 위해 용매 분획을 수행함. 땅콩 3일차 새싹 추출물의 활성성분 추적을 위한 Solvent distribution에 의한 분획물 (헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물) 시료 제조, 땅콩 3일차 새싹 물추출물의 활성성분 추적을 위한 D101 column 분획물 (0%, 10%, 30%, 50%, 100%) 시료 제조함.



3. 극성 용매 추출물의 HPLC 프로파일링 결과 Chlorogenic acid, cichoric acid, resveratrol 이 함유되어 있는 것을 확인하였고, UV spectrum 확인을 통하여 chlorogenic acid derivatives 가 확인됨.



4. 땅콩새싹 발아 일자별 추출물 시료 400ug/ml 농도와 주요성분인 Resveratrol, Chlorogenic acid, Chichoric acid의 50ug/ml 혈소판 응집 억제 효능을 평가한 결과 5d 시료가 가장 우수하였으며, Chlorogenic acid, Chichoric acid, Resveratrol 혈소판 응집 억제율이 각각 14.9, 16.9, 51.3% 감소함을 확인함.

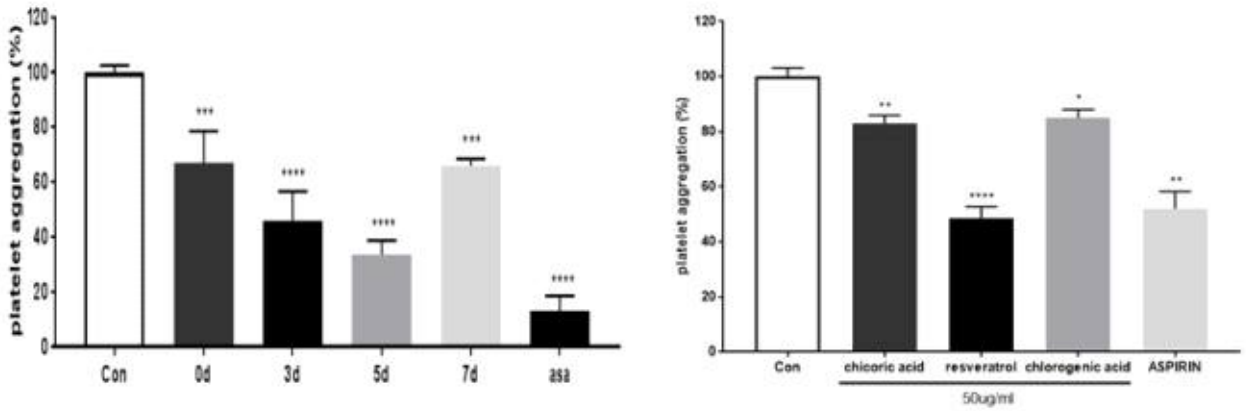


그림. 땅콩새싹 발아 일자별 시료와 주요성분인 Resveratrol, Chlorogenic acid, Chichoric acid의 in-*vitro* 혈소판 응집 억제 효능 비교

5. 땅콩새싹 발아 일자별 추출물 (50, 100, 200 및 400㎍/㎖)과 땅콩새싹 추출물의 주요성분인 Resveratrol, Chlorogenic acid, Chichoric acid (2.5㎍/㎖) 농도에서는 세포 독성이 관찰되지

않음. 동일한 농도에서 비교한 결과 발아하지 않은 땅콩(0d)와 비교하여 3d와 7d의 순으로 NO생성 억제 효능이 우수하였고, Resveratrol의 NO 생성량이 23.45% 감소됨을 확인함.

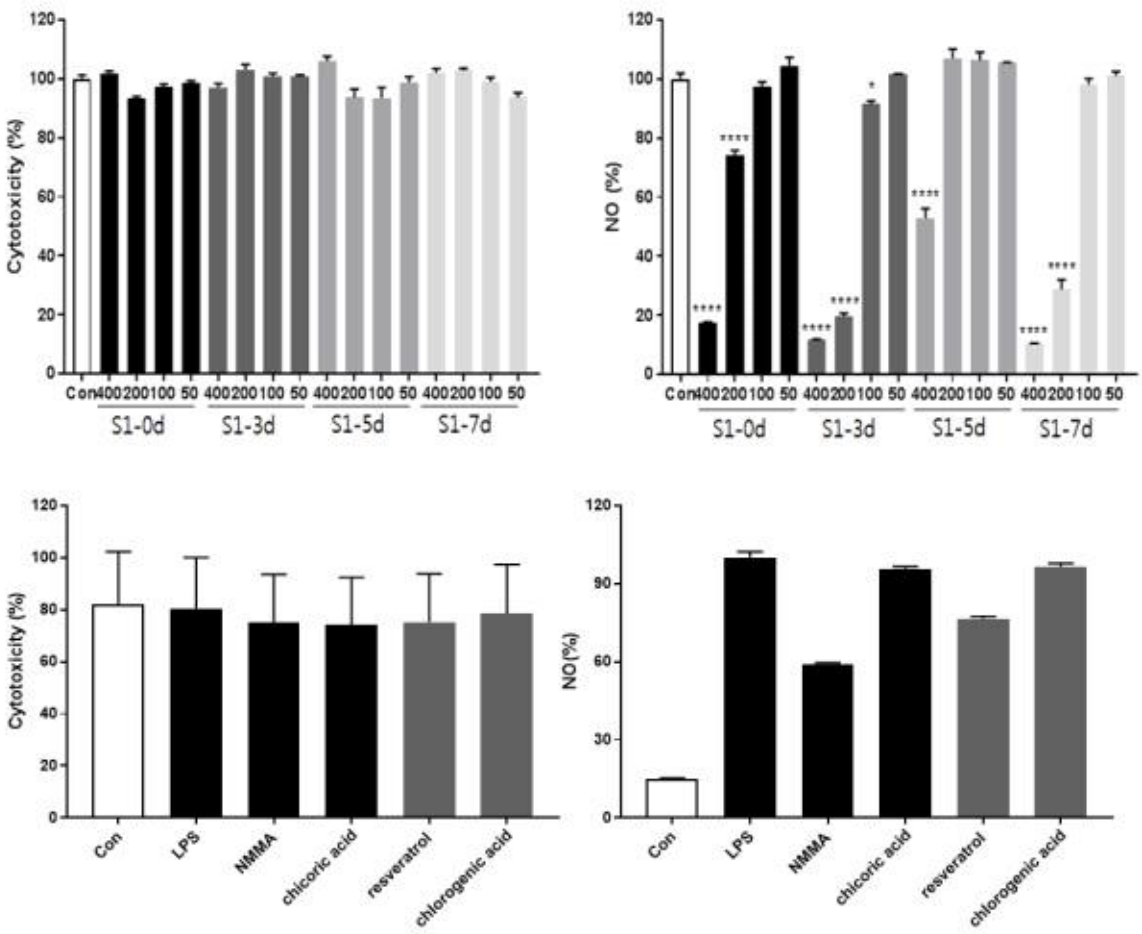


그림. 땅콩새싹 발아 일자별 시료와 주요성분인 Resveratrol, Chlorogenic acid, Chichoric acid의 NO 생성 억제효능 비교

6. 땅콩새싹 발아별 시료의 전체 부위와 발아할수록 증가하는 뿌리 부분의 효능을 비교한 결과 발아 9일차의 뿌리 부분의 NO 생성 억제 효능이 우수하여 뿌리 부분의 항염 효능과 기전 연구를 수행하였음.

땅콩새싹 추출물의 지표성분 3종에 대한 정량분석을 수행한 결과 caffeic acid는 3일차부터 검출되었으며, 각각 3일차 0.045mg/g, 9일차 0.108mg/g이 존재하였으며, cichoric acid는 0일차 0.068mg/g, 3일차 0.056mg/g, 9일차 0.998mg/g으로 정량되었고, resveratrol은 9일차 추출물에서만 0.011mg/g 존재함이 확인되었음.

표. 발아일에 따른 땅콩새싹 추출물의 지표성분 함량

	Content (mg/g)		
	0day	3day	9day
Caffeic acid	-	0.045	0.108
Cichoric acid	0.068	0.056	0.998
Resveratrol	-	-	0.011

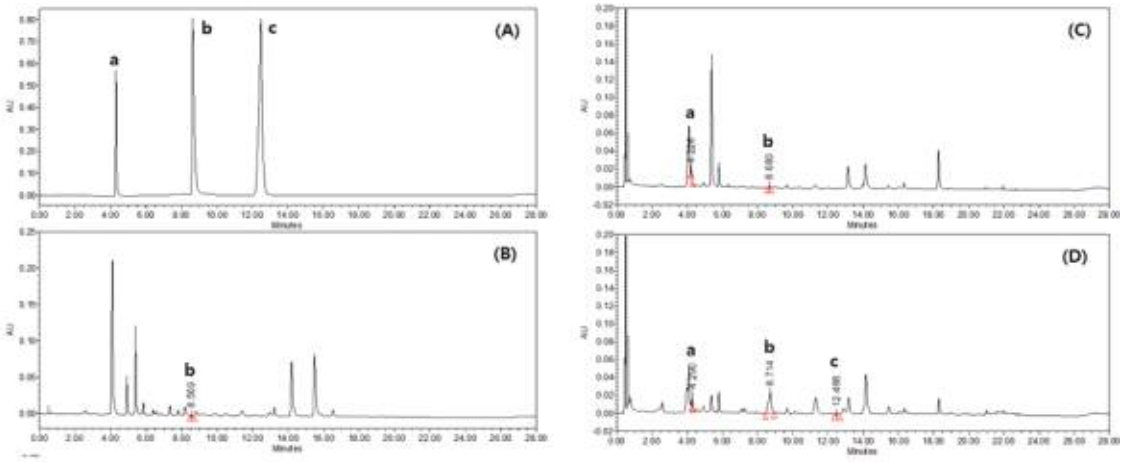


그림. 발아일에 따른 땅콩새싹 추출물의 UPLC chromatogram. a: caffeic acid, b: cichoric acid, c: resveratrol, (A) 표준용액 chromatogram, (B) 0day 땅콩새싹 추출물의 chromatogram, (C) 3day 땅콩새싹 추출물의 chromatogram, (D) 9 day 땅콩새싹 추출물의 chromatogram

땅콩새싹 발아 9일차 뿌리에서 세포 독성을 확인한 결과 최고 농도인 200㎍/㎖에서도 세포 독성이 나타나지 않았으며, NO 생성도 처리 농도인 50, 100, 200㎍/㎖에서 모두 농도 의존적으로 유의성있게 억제함을 확인함. LPS처리에 의해서 염증이 유도되어 증가되는 사이토카인인 TNF-α, IL-6, IL-1β의 발현과 염증매개 조절인자인 NO와 PEG2가 생성이 땅콩새싹 발아 9일차 뿌리 추출물을 처리시 유의성 있게 감소하는 것을 확인함.

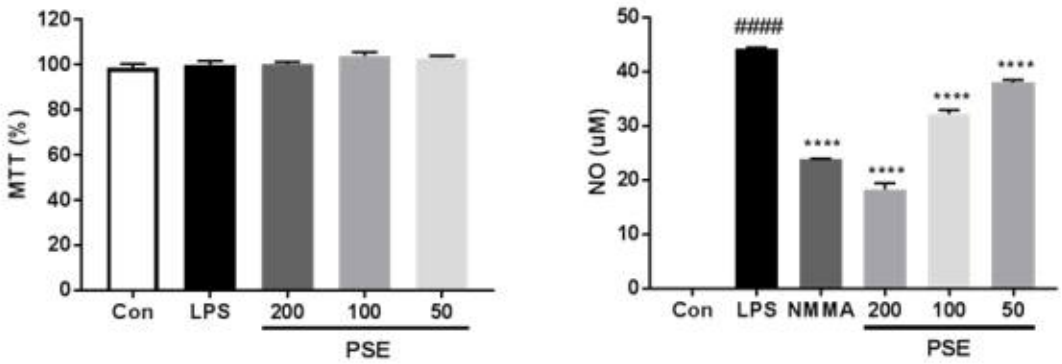


그림. 땅콩새싹 발아 9일차의 세포독성과 NO 생성 억제효능

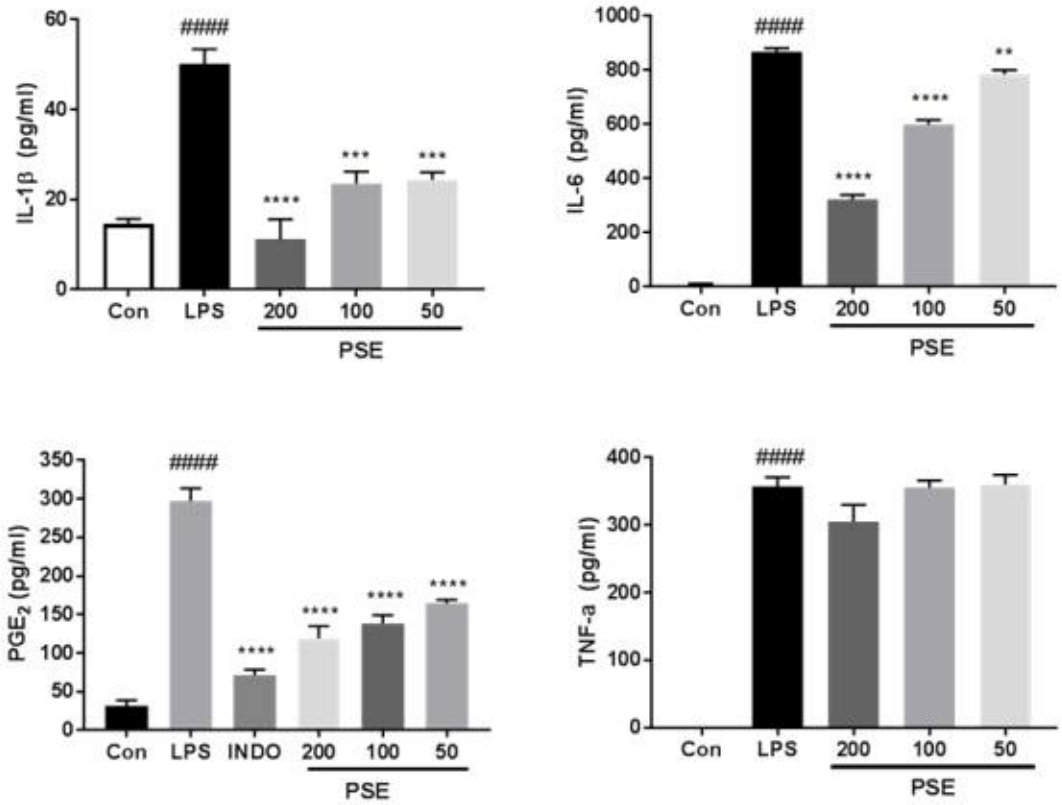


그림. 땅콩새싹 발아 9일차의 사이토카인과 염증 매개조절인자 생성 억제 효능

LPS처리에 의해서 증가된 사이토카인에 의해 현저히 증가되는 전구염증매개 효소인 inducible nitric oxide(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 단백질 발현을 땅콩새싹 발아 9일차 뿌리 추출물을 처리시 유의성 있게 발현을 억제함. 또한 MAPK 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LPS로 자극한 세포에서 ERK1/2, JNK1/2와 p38의 인산화가 현저히 증가하였고, 땅콩새싹 발아 9일차 뿌리 추출물을 처리한 세포에서 유의성 있게 RK1/2, JNK1/2와 p38의 인산화를 억제하는 것을 확인함. 땅콩새싹 발아 9일차 뿌리 추출물이 LPS처리에의해 자극된 ERK1/2, JNK1/2와 p38의 활성화와 관련된 MAPK 신호전달경로의 억제하고 전구 염증 매개인자의 단백질 발현을 억제함으로써 전구 염증 매개인자와 사이토카인을 생성을 억제함을 확인함.

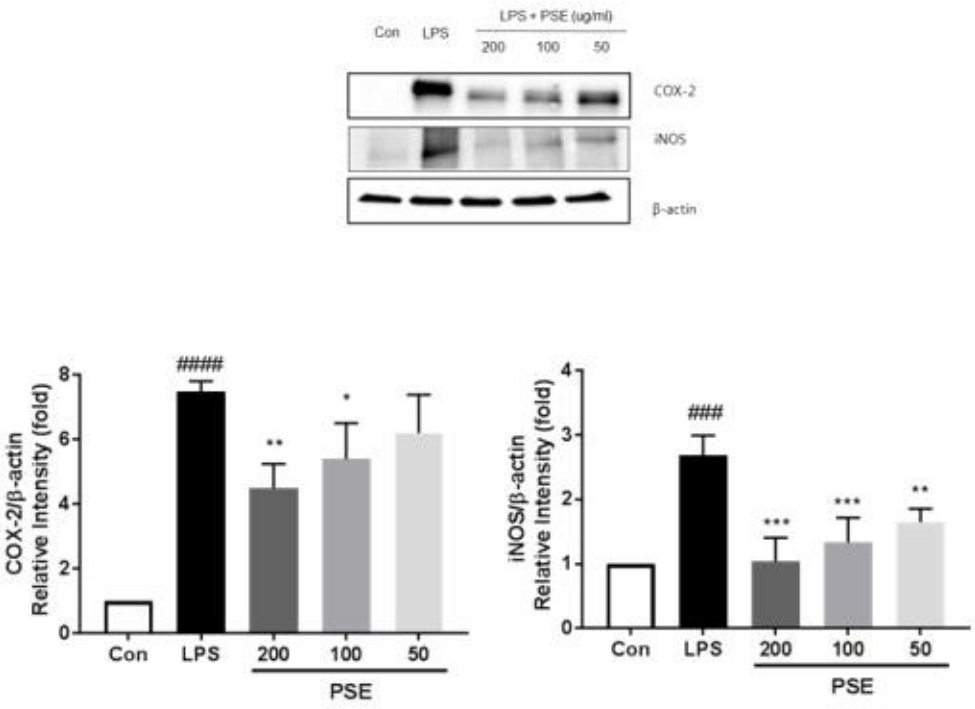


그림. 땅콩새싹 발아 9일차의 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 효능

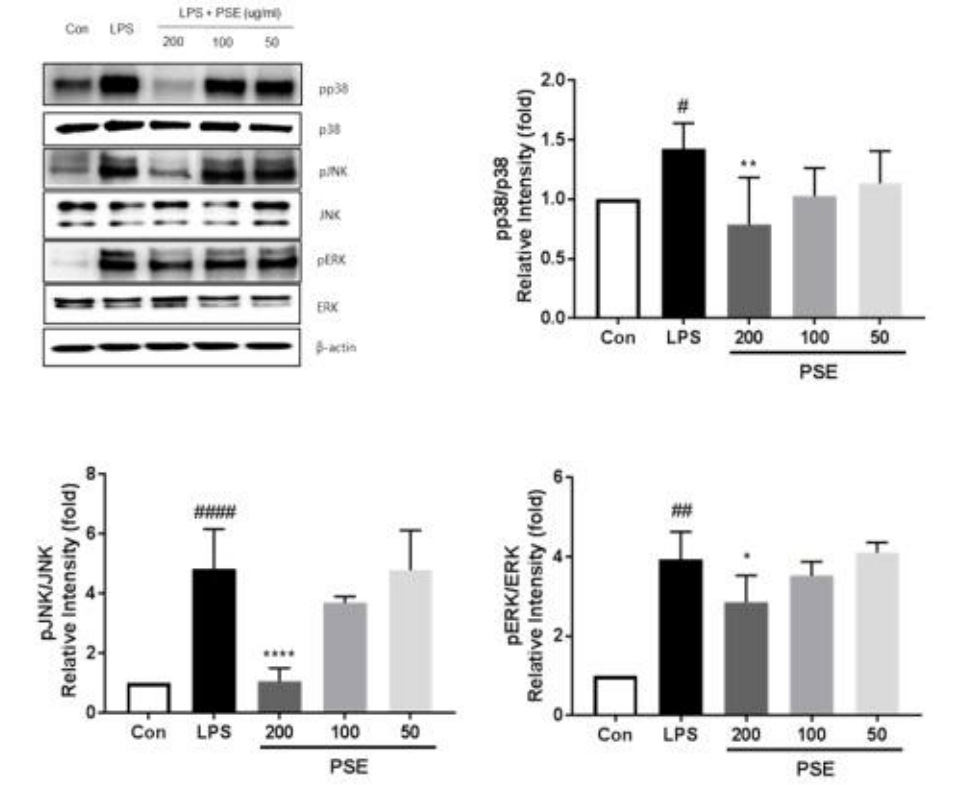


그림. 땅콩새싹 발아 9일차의 ERK1/2, JNK1/2와 p38의 인산화 억제 효능

7. 땅콩새싹 발아 일자별 추출물 (50, 100, 200 및 400㎍/㎖)의 농도에서는 세포 독성이 관찰되지 않았으며, 동일한 농도에서 비교한 결과 땅콩새싹 추출물의 히스타민 생성 억제 효능은 낮고 유의성이 없었음.

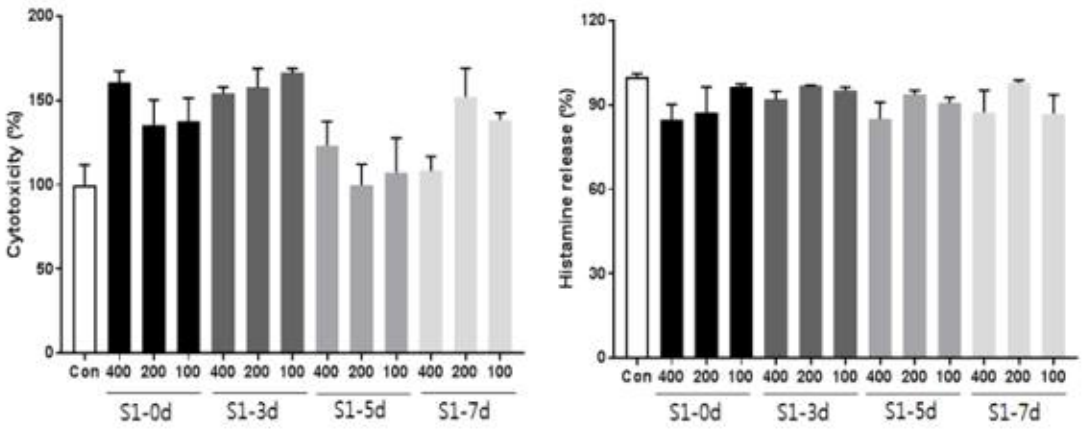


그림. 땅콩새싹 발아 일자별 히스타민 생성 억제효능 비교

8. 스마트팜 재배 작물의 미래성장산업화를 위한 유통 및 소비 모델 연구를 위하여 스마트팜 재배 새싹 및 오일 관련 유통 및 메뉴 현황 조사하고, 스마트팜 재배 땅콩 새싹 및 땅콩 오일을 이용한 레시피 연구를 수행함.

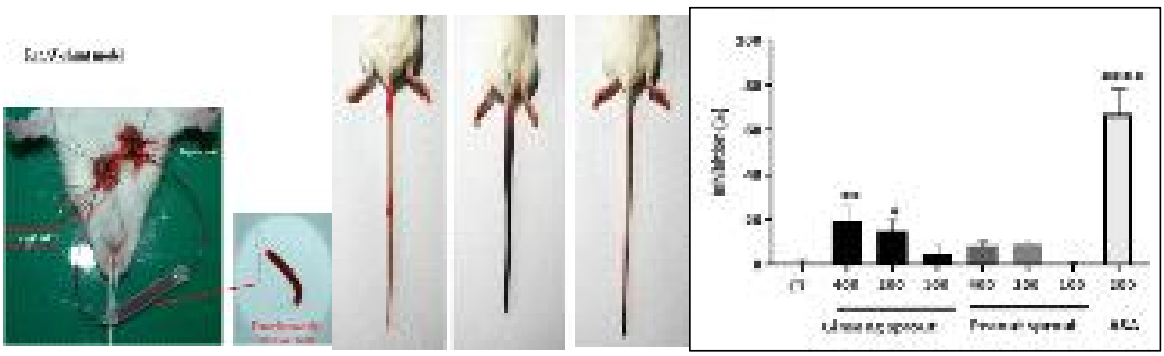
9. 땅콩새싹 추출물 및 땅콩새싹 추출물의 주요성분인 resveratrol, Chichoric acid의 DPPH radical scavenging activity를 평가한 결과 resveratrol과 chichoric acid 모두 각각 0.021 ± 0.00 mg/g, 0.042 ± 0.02 mg/g의 IC50를 보여 땅콩새싹추출물의 항산화활성의 주요 성분임을

확인하였음.

	IC50
땅콩 새싹 추출물	0.823 ± 0.03 mg/g
Resveratrol	0.021 ± 0.00 mg/g
Chichoric acid	0.042 ± 0.02 mg/g
Ascorbic acid	0.016 ± 0.00 mg/g

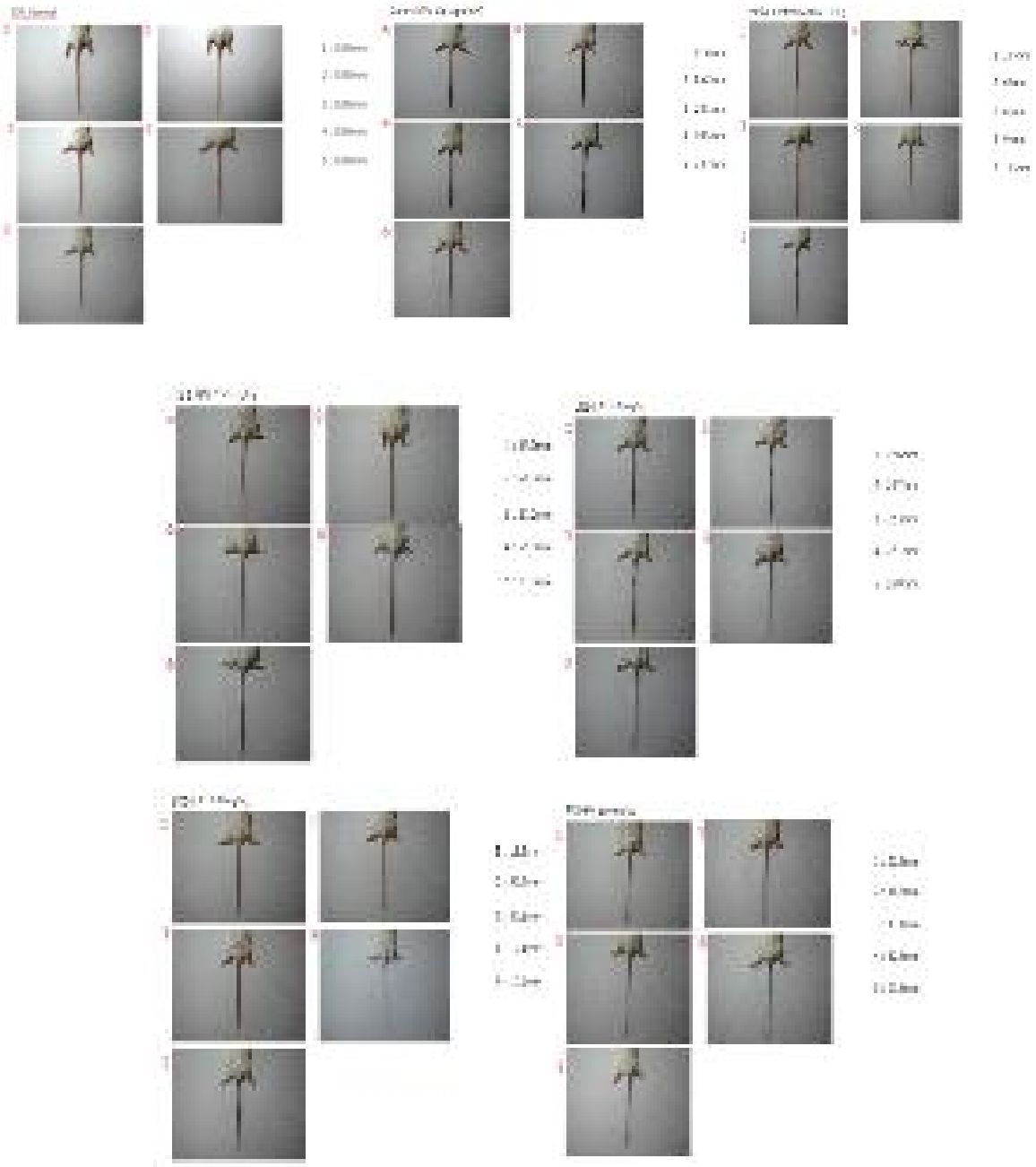
10. 알레르기 유발 확인 시험을 위해 재배 기간별 4종 70% 에탄올 추출물 제조 및 공급하였으며, 동물모델에서 항혈전 평가를 위한 추출물 제조하여 공급함. 동물모델에서 땅콩 3일차 새싹 추출물의 활성성분 추적을 위한 Solvent distribution에 의한 분획물 (헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물)과 땅콩 3일차 새싹 물추출물의 활성성분 추적을 위한 D101 column 분획물 (0%, 10%, 30%, 50%, 100%) 시료 제조하여 공급함.

11. Carrageenan 유도 mouse tail thrombosis 억제율 효능 평가



〈인삼새싹 및 땅콩새싹의 혈소판 응집 억제율〉

SD rat을 군당 구분하여 1주간 사육실에서 순화 후 인삼새싹과 땅콩새싹을 400 mg/kg, 200 g/kg, 100 mg/kg을, 양성대조군으로 aspirin을 각각 200 mg/kg을 경구투여하였다. 투여 2시간 후 심장천자로 채혈하여 sodium citrate를 처리 후 원심분리하고 PRP혈소판을 분리하여 Chrono-log aggregometer를 사용하여 collagen에 의한 혈소판응집능을 측정했다. 인삼새싹의 혈소판응집 반응은 collagen 응집유도에서 400 mg/kg에서 가장 크게 응집억제능을 나타내었고, 농도의존적인 억제능을 나타냈다. 땅콩새싹을 투여한 군에서는 400과 200 mg/kg모두 비슷한 수준의 응집억제능을 보였다. 양성대조군인 aspirin투여군에서 혈소판억제기전을 확인하였다.



〈인삼새싹 및 땅콩새싹의 꼬리혈전유도 혈전형성길이비교〉

carrageenan유도 48시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 측정한 결과로 대조군 (control)에 비하여 양성대조군인 Heparin투여군은 대조군에 비하여 현저하게 감소를 나타내었고 , 인삼새싹과 땅콩새싹을 투여한 실험군에서는 대조군 (control)에 비하여 300 mg/kg, 150 mg/kg에서 감소를 나타내었다.

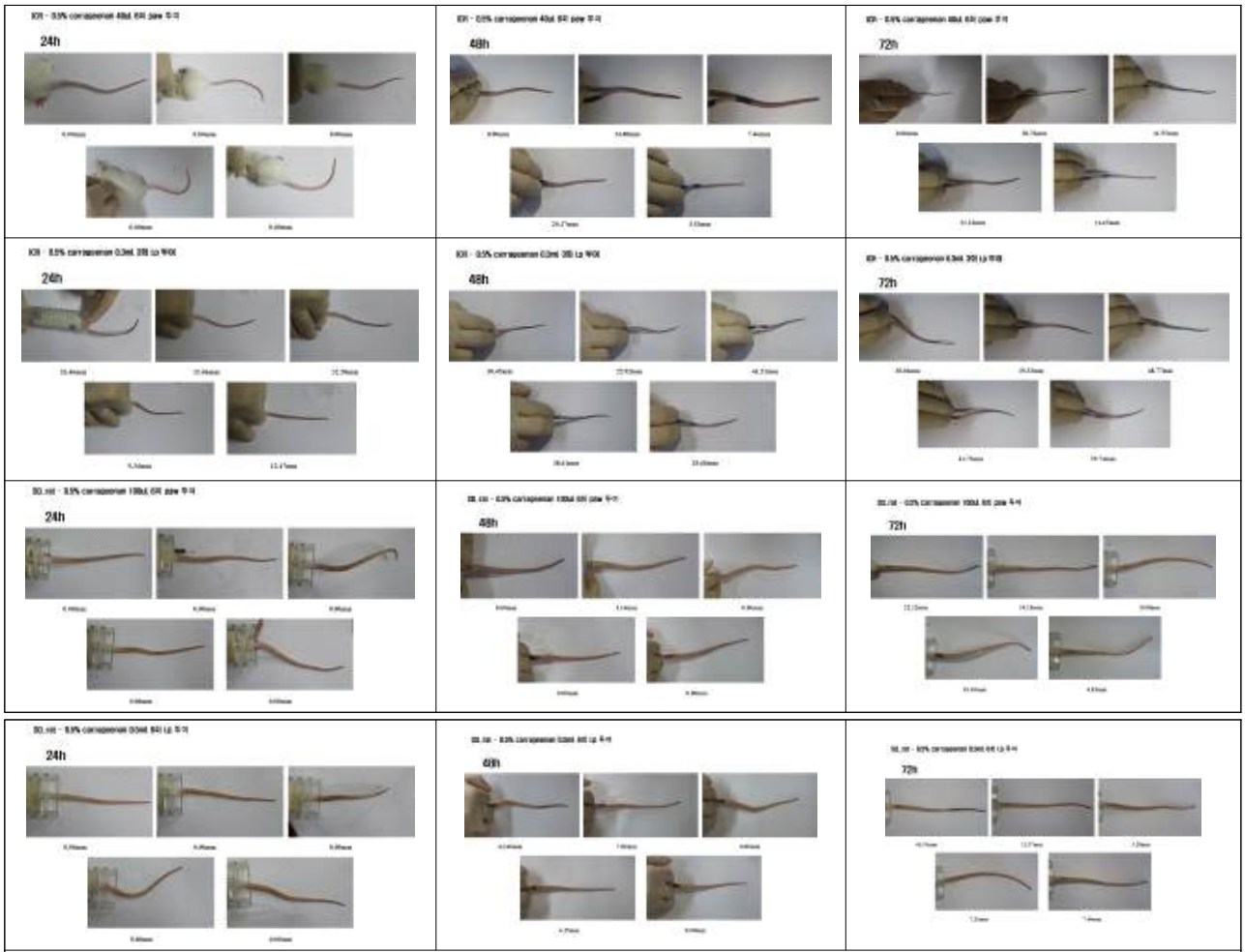
- ICR mouse - paw 40μl 6회투여, i.p 0.3ml 3회 투여 후 24,48,72h 측정
- SD-rat - paw 100μl 6회투여, i.p 0.3ml 6회 투여 후 24,48,72h 측정

	24 H			
	ICR-IP(단위:mm)	ICR-Paw(단위:mm)	Rat-IP(단위:mm)	Rat-Paw(단위:mm)
1	26.46	-	-	-
2	15.46	-	-	-
3	32.58	-	-	-
4	9.34	-	-	-
5	12.47	-	-	-

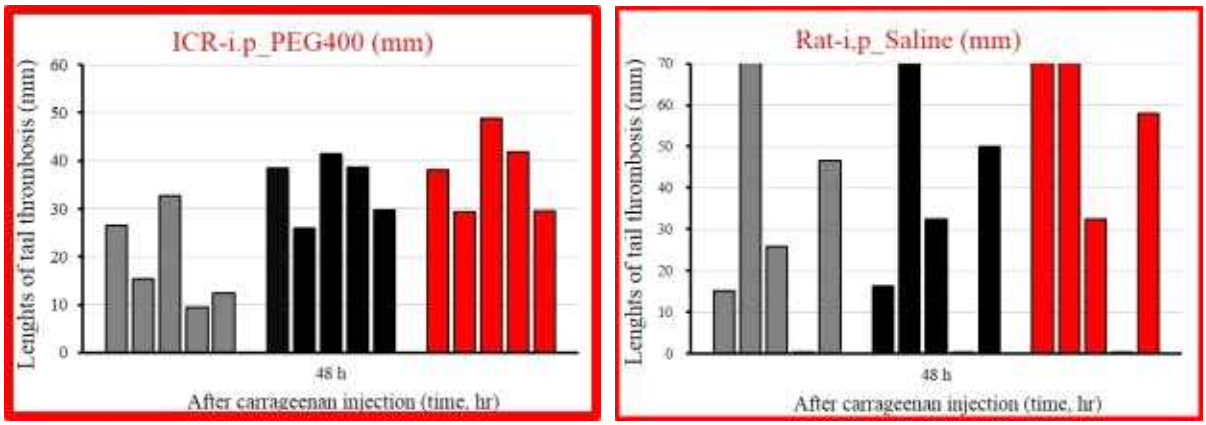
	48 H			
	ICR-IP(단위:mm)	ICR-Paw(단위:mm)	Rat-IP(단위:mm)	Rat-Paw(단위:mm)
1	38.45	-	62.68	-
2	25.92	24.8	7.82	3.14
3	41.51	7.46	-	-
4	38.61	29.27	4.15	-
5	29.68	3.53	-	-

	72 H			
	ICR-IP(단위:mm)	ICR-Paw(단위:mm)	Rat-IP(단위:mm)	Rat-Paw(단위:mm)
1	38.01	-	66.51	22.12
2	29.33	28.76	12.57	14.16
3	48.77	11.55	5.28	-
4	41.73	31.22	7.26	10.05
5	29.47	11.65	7.44	4.83

<실험동물별, 시간별, 투여방법별 tail thrombosis 비교>



<실험동물별, 시간별, 투여방법별 tail thrombosis 비교 사진>



<실험동물별, 시간별, 투여방법별 thrombosis tail length 비교 후 종별 선정결과>

12. 고지방식이에 의해 유도된 비만 (HFD)유도 동물모델에서의 효능평가 (항비만 3HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물)

□ 연구내용

1) HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 고지방식이에 의해 유도된 비만 (HFD)유도 동물모델에서 14주간 체중변화 결과 비교

2) HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 고지방식이에 의해 유도된 비만 (HFD)유도 동물모델에서 간조직내 지방량 분석 효과 비교

3) HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 고지방식이에 의해 유도된 비만 (HFD)유도 동물모델에서 혈청내 비교 지질생화적 분석

6) HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 고지방식이에 의해 유도된 비만 (HFD)유도 동물모델에서 Liver와 Viceral adipocyte 병리조직분석 (H&E, Oil red 염색)

○PNS_E의 고지방식이 비만병태모델의 항비만 효과

▶ 고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 HFD_PNS_E 3day, HFD_PNS_E 9day 추출물의 항비만 효과를 검증하고자 정상대조군(C57BL/6J-vehicle, ND), 고지방식이 비만유도 대조군 (HFD_HFD_CTL), 양성대조군 HFD_HCA (245 mg/kg) 실험군, 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 3day (200 mg/kg), HFD_PNS_E 9day (400 mg/kg), 비만 개선 HFD_PNS_E 9day (200 mg/kg)들을 비교 검증했다. 이를 위하여 고지방식이로 유도한 비만병태모델을 다음과 같이 제작했다. 8 주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐 (대한바이오링크)를 항온 (25±2℃), 항습 (50±5%) 및 12시간 간격의 광주기 (light on 07:00 ~ 19:00)로 조절되는 SPF환경에서 2 주간 기본사료(AIN-76A diet)와 물을 자유롭게 공급하면서 적응시킨 후, 체중이 약 24g 이상 되는 10 주령부터 고지방식이 (#D12492 60 kcal fat, Research Diets Inc, USA)를 투여하여 비만 (HFD) 병태모델을 제작했다. 식이섭취량 및 체중은 매주 1회 일정한 시간에 측정하여 기록하고, 사육이 끝난 시험동물은 희생시키고 각각의 혈청을 수집하여 혈청내 중성지방의 수준 및 저밀도 콜레스테

롤의 수준을 측정했다. 비만 병태모델에서 시험물질에 따른 체중변화 수준을 나타내는 그래프이다. 최종 21주에서 고지방식이 대조군 (HFD_CT)에 비하여 양성대조군 HFD_HCA 245mg/kg, HFD_PNS_E 3day 400mg/kg, HFD_PNS_E 3day 200mg/kg, HFD_PNS_E 9day 400mg/kg, HFD_PNS_E 9day 200mg/kg투여군에서는 감소된 추이를 보였다.

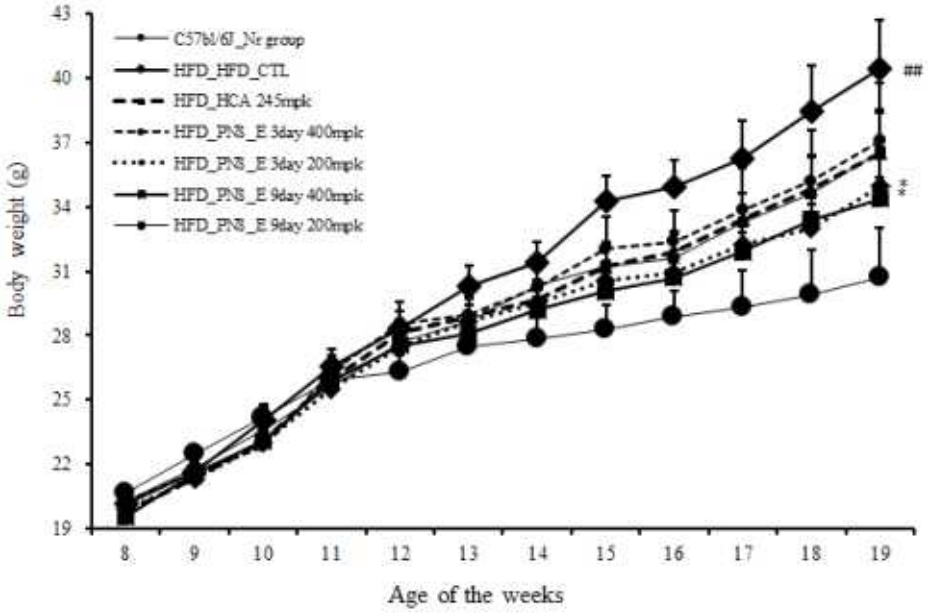


Fig. 1. Body weight change

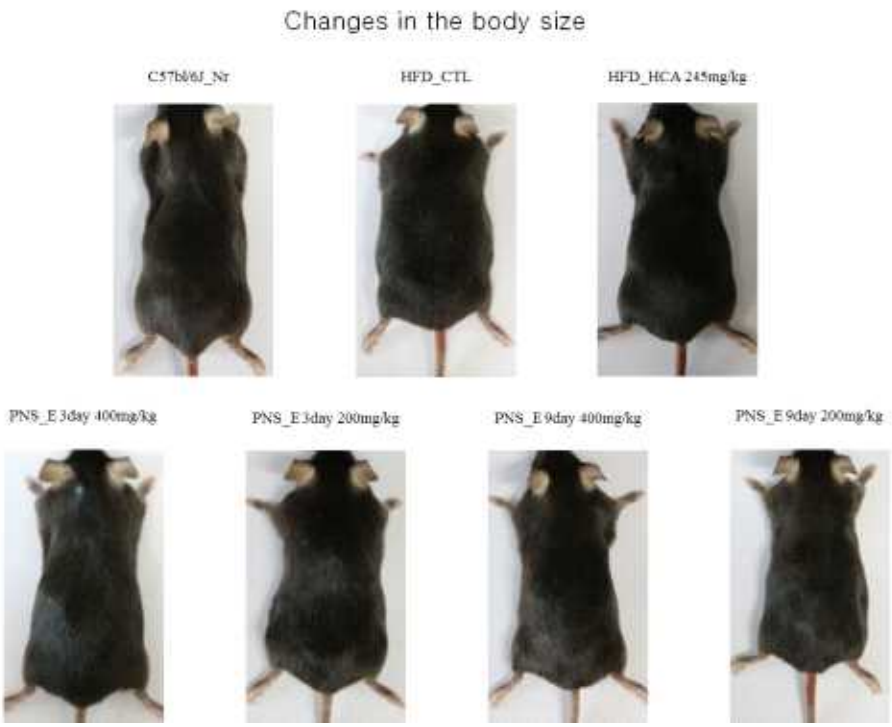


Fig. 2. Changes in the body size

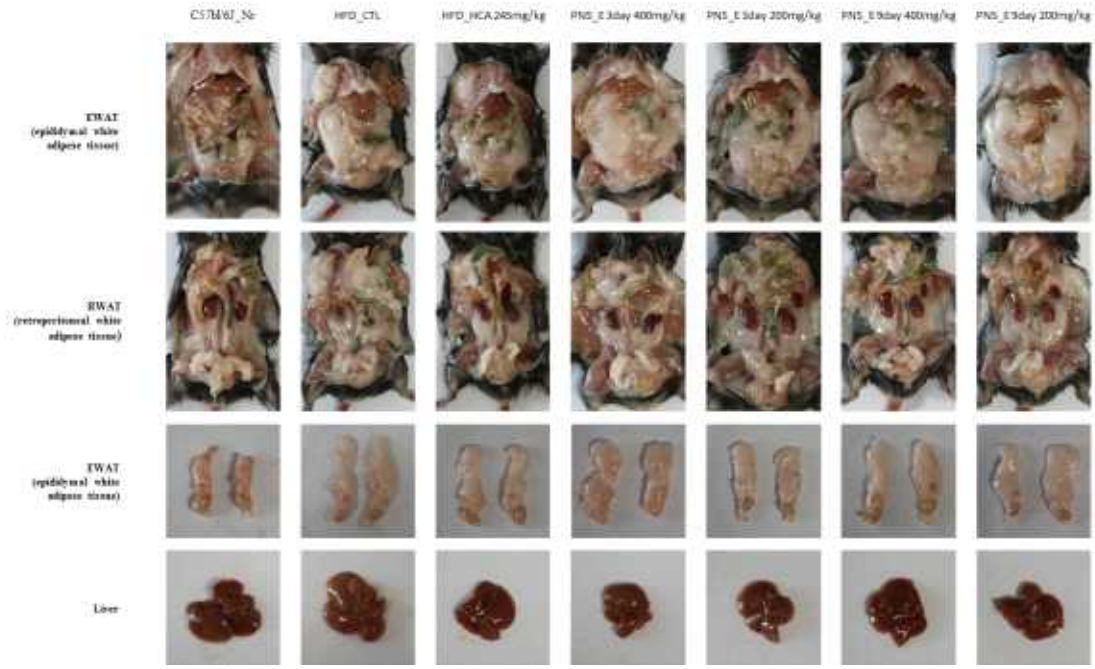


Fig. 3. Representative images of the IWAT, EWAT, RWAT, and liver tissue isolated from WT(C57bl/6J_Nr) and HFD mice after 19 weeks of HFD feeding (total n = 10/group)

① C57bl/6J_Nr group : Normal C57bl/6j mice (male 8w 23g mice) (n=10)

② HFD_CTL : HFD Vehicle control (n=10)

③ HFD_HCA 245mpk: HFD+HCA (245 mg/kg, o.p) (n=10)

④ HFD_PNS_E 3day 400mpk (n=10)

⑤ HFD_PNS_E 3day 200mpk (n=10)

⑥ HFD_PNS_E 9day 400mpk (n=10)

⑦ HFD_PNS_E 9day 200mpk (n=10)

▶ 고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 시험물질에 따른 부고환주변 백색지방(Epididymal adipose tissue)검사 (H&E 염색)로 병리형태학적 관찰하기 위하여, 실험 종료 후 ethyl ether로 마취하고 부검하여 적출한 부고환주변 백색지방량 (Epididymal adipose tissue) 일부를 10% 포름알데하이드 용액에 24시간 고정한 다음, 같은 용액으로 2회 교환하였다. 그 후 2배수 에탄올로 탈수하여 파라핀에 포메하고, 이것을 4 μm 두께로 박절하여 헤마톡실린-에오신 (H&E) 염색한 다음 광학현미경에서 부고환주변 백색지방 (Epididymal adipose tissue)세포는 200배 배율로 관찰하였다. 지방세포 크기는 Nikon ACT-1 version 2.51 (Nikon, Japan)를 사용하여 50 ㎛단위로 측정하여 크기분 분포도를 image J program을 이용하여 분석한 결과이다. 고지방식이 항비만 마우스모델에서 시험물질에 따른 지방 조직 형태에 대한 효과를 나타내는 그래프로 정상식이 정상군 (C57bl/6J-normal)와 비교하여, 고지방식이 섭취에 의해 비만이 유발된 고지방식이 대조군 (HFD_CT)에서 지방세포의 크기

와 크기의 분포도가 현저히 증가하게 된다. 양성대조군 HFD_HCA 245mg/kg, HFD_PNS_E 3day 400mg/kg, HFD_PNS_E 3day 200mg/kg, HFD_PNS_E 9day 400mg/kg, HFD_PNS_E 9day 200mg/kg투여군은 고지방식이 대조군 (HFD_CT)에 비하여 지방세포의 크기와 크기의 분포도가 감소가 현저하게 개선되었다.

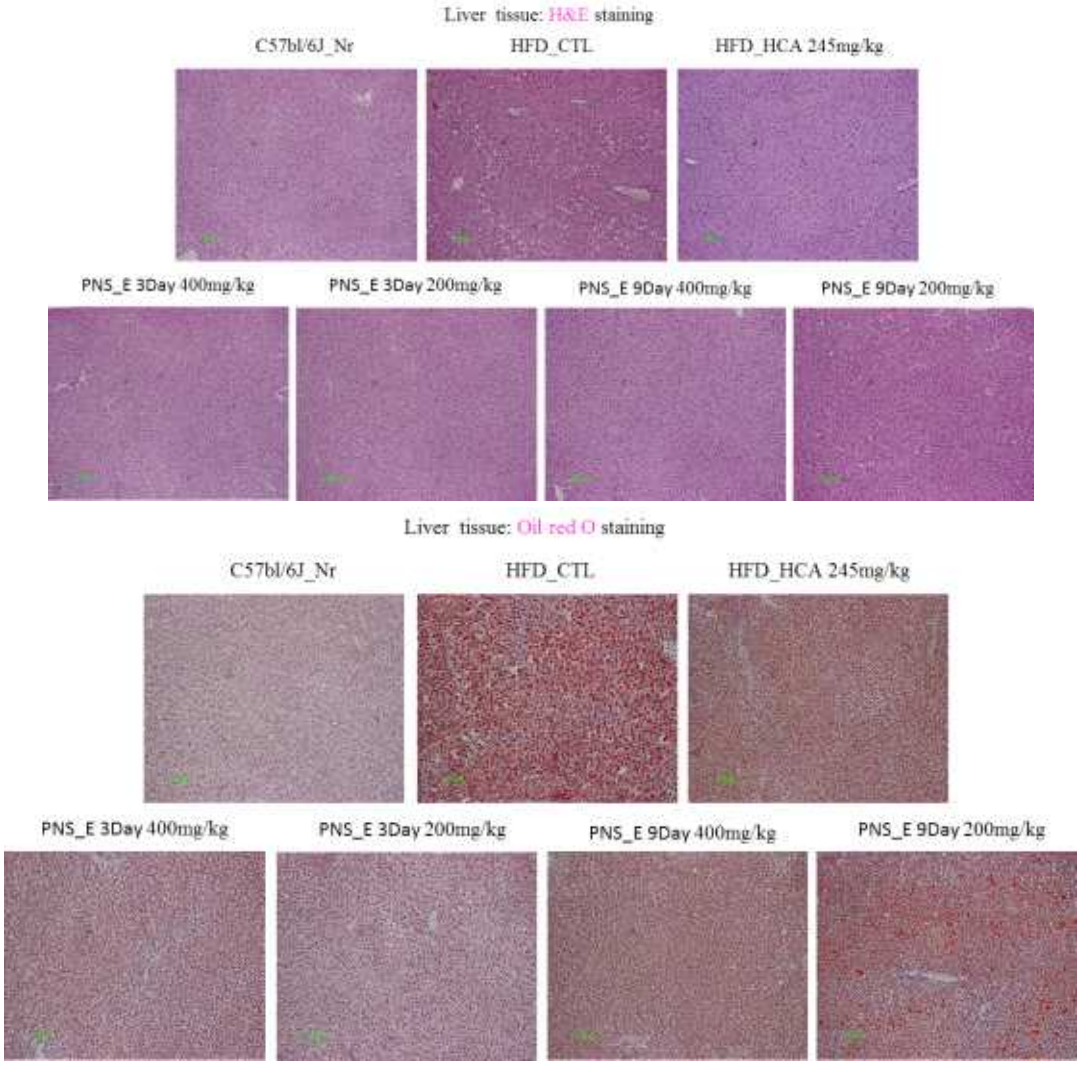


Fig. 4. Liver and Epididymis Fat tissue (H&E staining & oil red O staining) histology

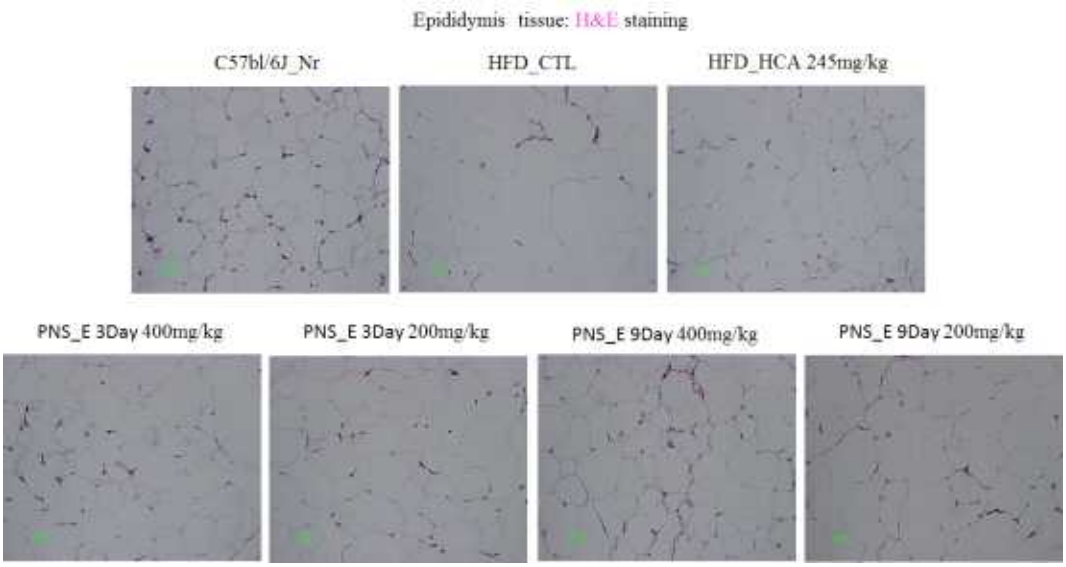


Fig. 5. Epididymis Fat tissue (H&E staining) histology

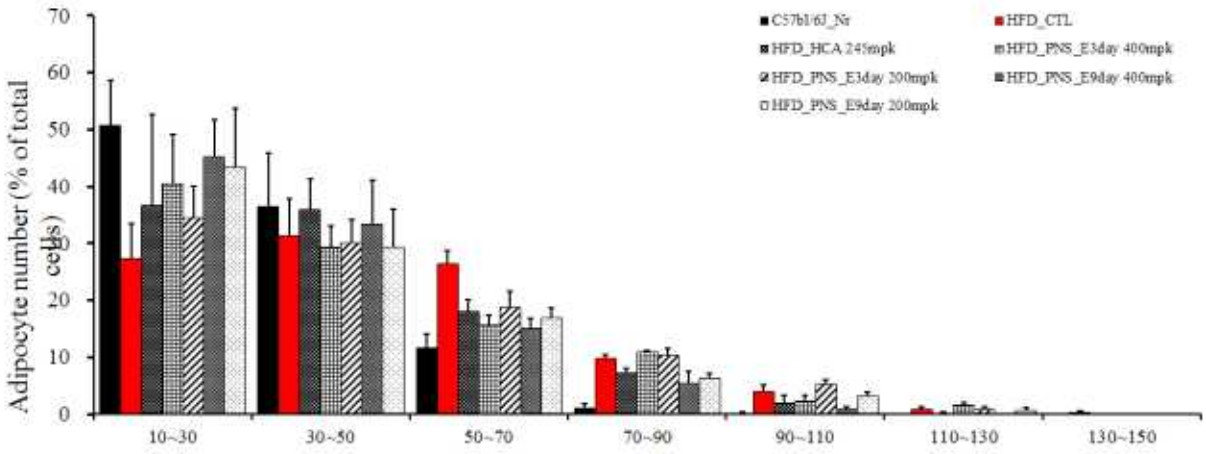


Fig. 6. Adipocytes area and cell size distribution were measured on the EWAT tissue after 14 weeks

① C57bl/6J_Nr group : Normal C57bl/6j mice (male 8w 23g mice) (n=10)

② HFD_CTL : HFD Vehicle control (n=10)

③ HFD_HCA 245mpk: HFD+HCA (245 mg/kg, o.p) (n=10)

④ HFD_PNS_E 3day 400mpk (n=10)

⑤ HFD_PNS_E 3day 200mpk (n=10)

⑥ HFD_PNS_E 9day 400mpk (n=10)

⑦ HFD_PNS_E 9day 200mpk (n=10)

▶ 고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 실험 종료 후 시험물질에 따른 혈청내 중성지방 (triglyceride)의 수준을 나타내는 그래프로, 비만유도대조군 (HFD_HFD_CTL)의 혈청내 중성지방 (triglyceride) 수준은 정상대조군의 혈청내 중성지방 (triglyceride)에 비하여

비슷한 수준을 보였다. 실험군에서는 HFD_PNS_E 3day 200mg/kg, HFD_PNS_E 9day 400mg/kg, HFD_PNS_E 9day 200mg/kg투여군 대조군에 비하여 감소를 나타났다.

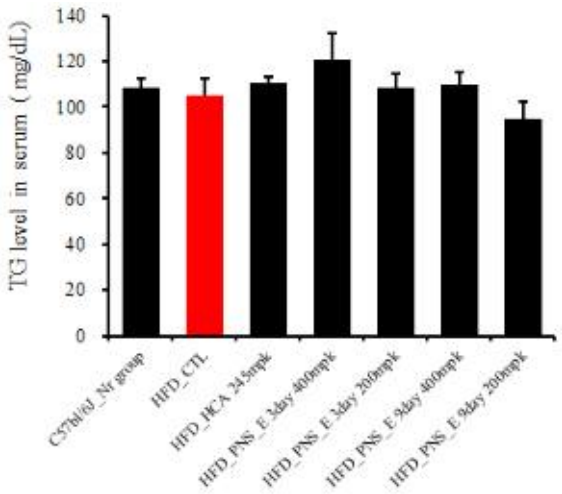


Fig. 7. Triglyceride level in serum

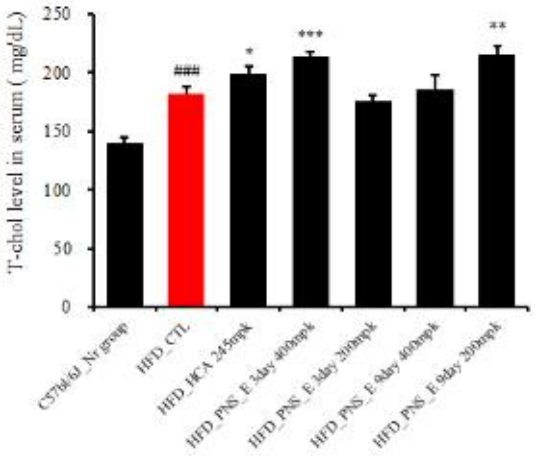


Fig. 7. Total cholesterol level in serum

① C57bl/6J_Nr group : Normal C57bl/6j mice (male 8w 23g mice) (n=10)

② HFD_CTL : HFD Vehicle control (n=10)

③ HFD_HCA 245mpk: HFD+HCA (245 mg/kg, o.p) (n=10)

④ HFD_PNS_E 3day 400mpk (n=10)

⑤ HFD_PNS_E 3day 200mpk (n=10)

⑥ HFD_PNS_E 9day 400mpk (n=10)

⑦ HFD_PNS_E 9day 200mpk (n=10)

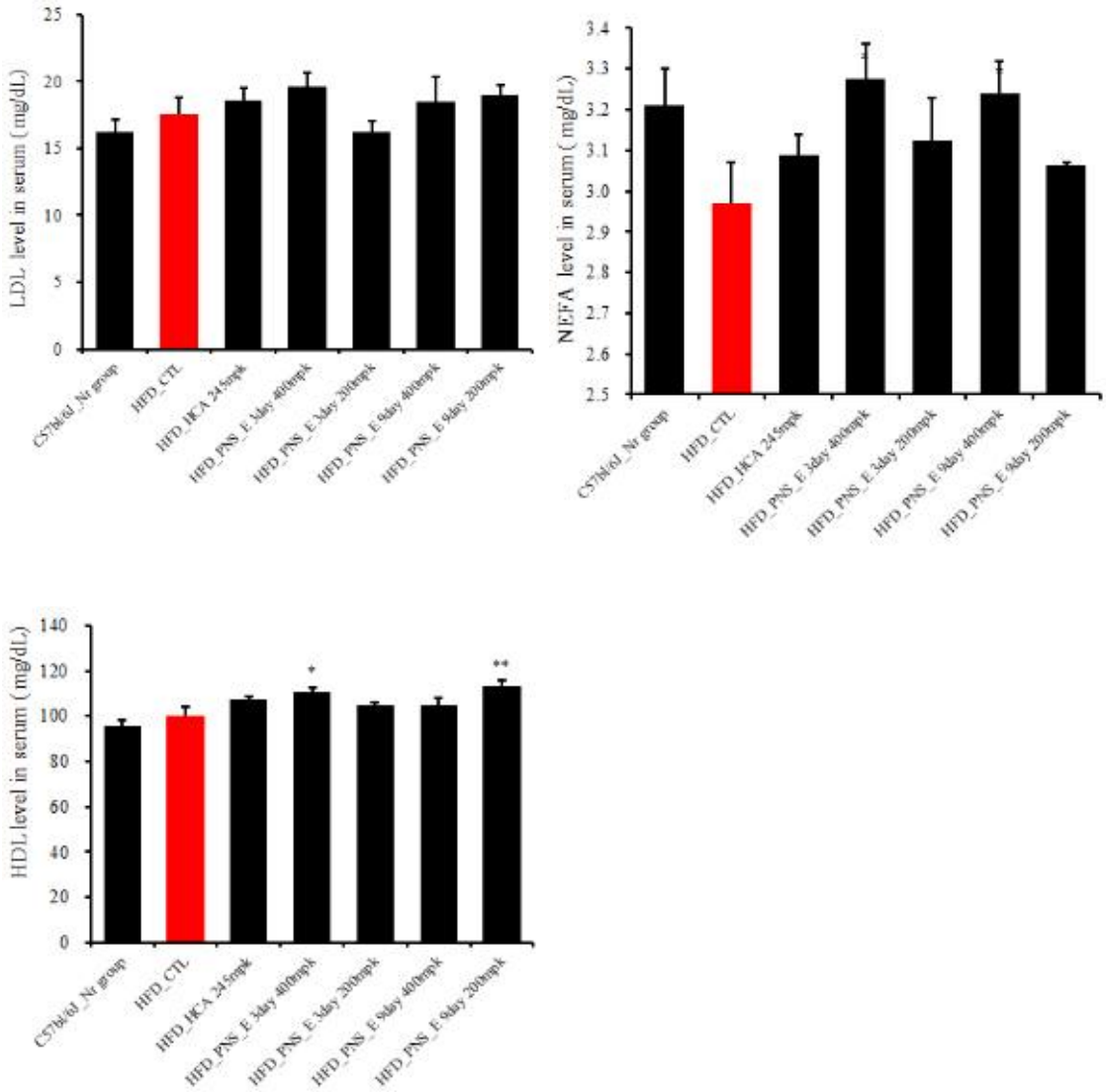


Fig. 8. LDH and Free fatty acid (FFA) level in serum

① C57bl/6J_Nr group : Normal C57bl/6j mice (male 8w 23g mice) (n=10)

② HFD_CTL : HFD Vehicle control (n=10)

③ HFD_HCA 245mpk: HFD+HCA (245 mg/kg, o.p) (n=10)

④ HFD_PNS_E 3day 400mpk (n=10)

⑤ HFD_PNS_E 3day 200mpk (n=10)

⑥ HFD_PNS_E 9day 400mpk (n=10)

⑦ HFD_PNS_E 9day 200mpk (n=10)

▶ 고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 실험 종료 후 시험물질에 따른 혈청내 지방간 염증 수준을 알 수 있는 LDH와 유리지방산 (FFA)의 수준을 나타내는 그래프로, 실험군에서 LDH 수준은 정상군에 비하여 고식이유도대조군 (HFD-CT)이 증가를 나타내었고, 고식이유도대조군 (HFD-CT)에 비하여 실험군 HFD_PNS_E 3day 200mg/kg에서 감소를 나타

내었다. 그리고 혈청내 유리지방산 (FFA) 수준은 정상군에 비하여 HFD_PNS_E 3day 200mg/kg, HFD_PNS_E 9day 200mg/kg투여군이 감소를 나타내었다.

▶ 고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 실험 종료 후 시험물질에 따른 피하지방량 (Abdominal subcutaneous fat), 부고환주변 백색지방 (Epididymal adipose tissue), 신장주변 백색지방량 (Kidney adipose tissue), 그리고 창자주변 백색지방량 (Intestine adipose tissu)을 나타내는 그래프로, 고식이유도대조군 (HFD-CT)의 각각 백색지방량은 정상대조군의 백색지방량에 비하여 증가를 나타내었다. 그리고 피하지방량 (Abdominal subcutaneous fat), 신장주변 백색지방량 (Kidney adipose tissue), 그리고 창자주변 백색지방량 (Intestine adipose tissu)은 고식이유도대조군 (HFD-CT)에 비하여 HFD_PNS_E 3day 400mpk, HFD_PNS_E 3day 200mpk, HFD_PNS_E 9day 400mpk, HFD_PNS_E 9day 200mpk 유의성 있게 감소를 나타내었다. 그리고 부고환주변 백색지방량 (Epididymal adipose tissue)은 고식이유도대조군 (HFD-CT)에 비하여 HFD_PNS_E 3day 400mpk, HFD_PNS_E 3day 200mpk, HFD_PNS_E 9day 400mpk, HFD_PNS_E 9day 200mpk 감소를 나타내었다.

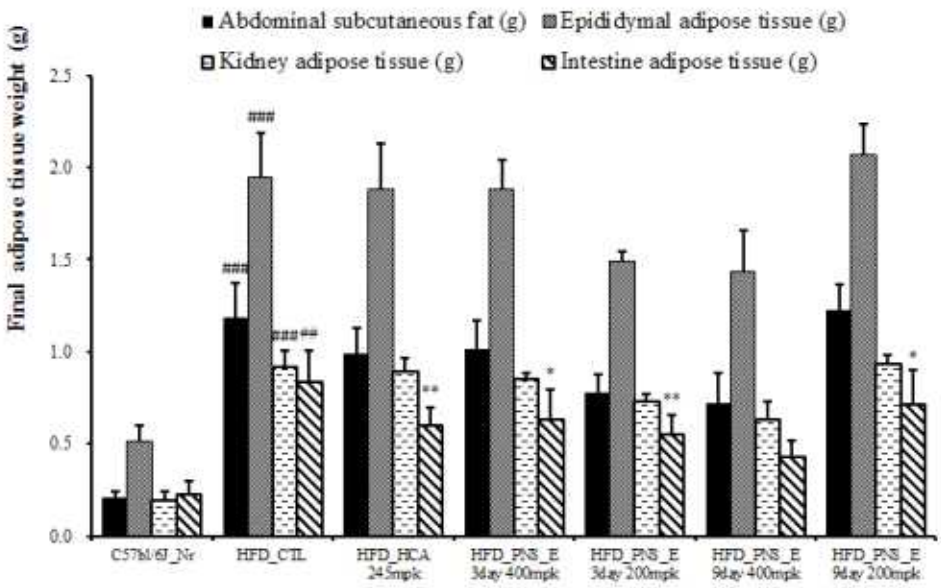


Fig. 38. Fat weight in body

① C57bl/6J_Nr group : Normal C57bl/6j mice (male 8w 23g mice) (n=10)
② HFD_CTL : HFD Vehicle control (n=10)
③ HFD_HCA 245mpk: HFD+HCA (245 mg/kg, o.p) (n=10)
④ HFD_PNS_E 3day 400mpk (n=10)
⑤ HFD_PNS_E 3day 200mpk (n=10)
⑥ HFD_PNS_E 9day 400mpk (n=10)
⑦ HFD_PNS_E 9day 200mpk (n=10)

▶고지방식이에 의해 비만병태 동물모델을 대상으로 실험 종료 후 시험물질에 따른 간무게 (liver weight)와 신장무게 (Kidney)를 나타내는 그래프로, 고식이유도대조군 (HFD-CT)의 간무게 (liver weight)은 정상대조군 (C57bl/6j_Nr)의 간무게 (liver weight)에 비하여 증가를 했다. 그리고 고식이유도대조군 (HFD-CT)에 비하여 실험군인 HFD_PNS_E 9day 400mpk에서 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다 ($p<0.05$). 그러나 신장무게 (Kidney)와 비장무게 (spleen)는 실험군간의 차이가 없었다.

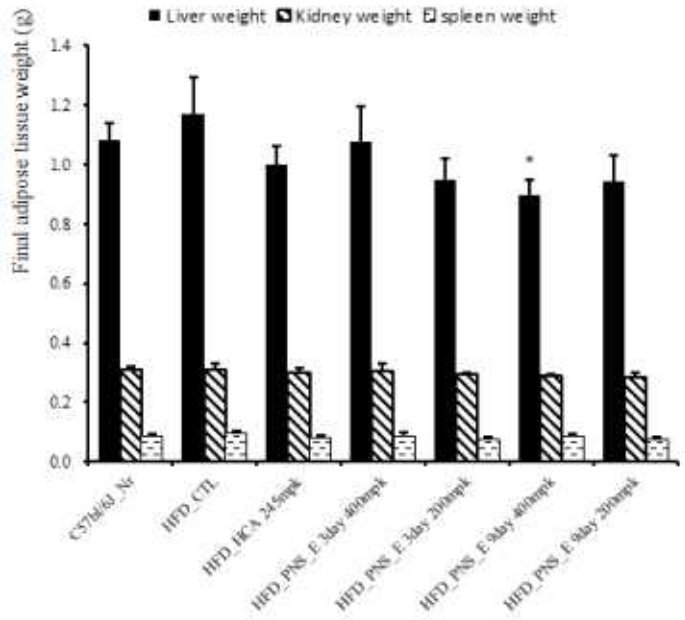


Fig. 39. Organ weight in body

① C57bl/6J_Nr group : Normal C57bl/6j mice (male 8w 23g mice) (n=10)
② HFD_CTL : HFD Vehicle control (n=10)
③ HFD_HCA 245mpk: HFD+HCA (245 mg/kg, o.p) (n=10)
④ HFD_PNS_E 3day 400mpk (n=10)
⑤ HFD_PNS_E 3day 200mpk (n=10)
⑥ HFD_PNS_E 9day 400mpk (n=10)
⑦ HFD_PNS_E 9day 200mpk (n=10)

13. carrageenan induced mice tail thrombosis model

▷ carrageenan유도 48시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 측정한 결과로 3일 전 부터 PN-Sprout 투여하며, ICR 생쥐에 1% carrageenan로 혈전 유도하고 48시간 후 꼬리혈전 혈성길이 및 collagen 유도 혈소판응집능 측정한 결과, 대조군 (control)에 비하여 양성대조군인 Heparin투여군은 대조군에 비하여 현저하게 감소를 나타내었고,

PN-Sprout 은 200 mg/kg 용량에서 0 day (p<0.05)와 3 days (p<0.01)에서 통계적 유의성 있게 꼬리혈전 길이가 억제되었고, Collagen응집인자에 의해 PN-Sprout 3 days (p<0.05에서 응집능 억제를 나타내어 PN-Sprout 3days을 분획시료로 선정 확정함 (Fig.1).

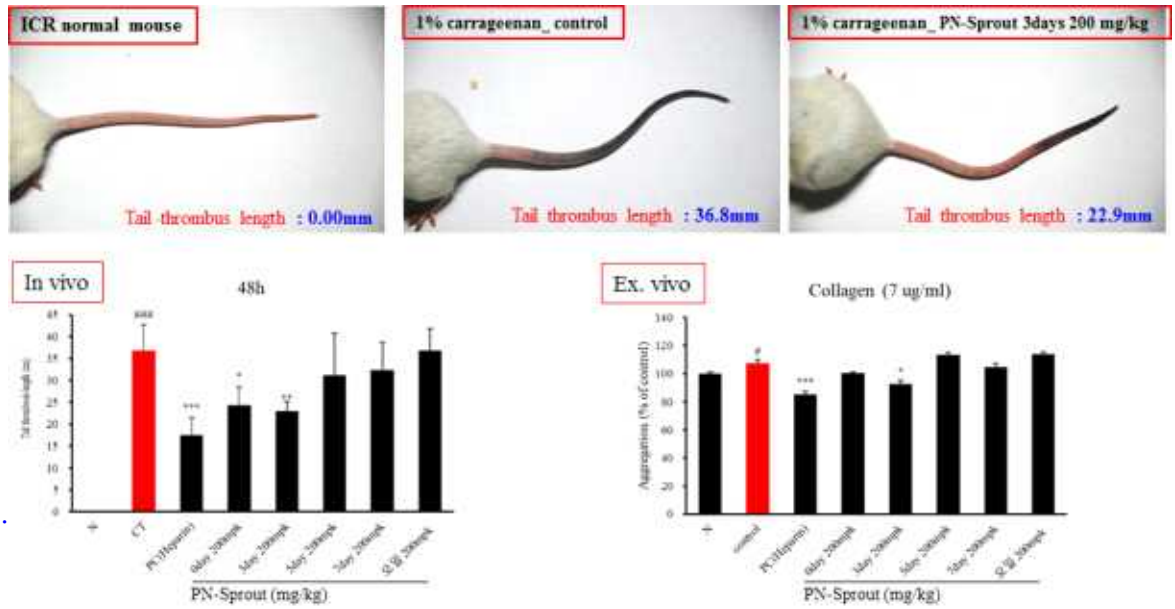


Fig.1. Antithrombotic effects of PN-Sprout extract in carrageenan induced mice tail thrombosis model

▷ Carrageenan유도 48시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 측정한 결과로, 3일 전 부터 물질분리한 PN-Sprout 3days 분획추출물 투여하며, ICR 생쥐에 1% carrageenan로 혈전 유도하고 48시간 후 꼬리혈전 혈성길이 및 collagen 유도 혈소판응집능 측정한 결과, 꼬리혈전 길이가 억제능은 PN-Sprout water (p<0.01)과 0 days추출물 (p<0.05) 에서 꼬리혈전 길이가 억제되었고, Collagen응집인자에 의해 PN-Sprout Hex. 분획에서 응집능 억제를 나타내었음. 재현성 실험에서도 분획물에 대한 효능검증이 나타나지 않았음 (Fig.2).

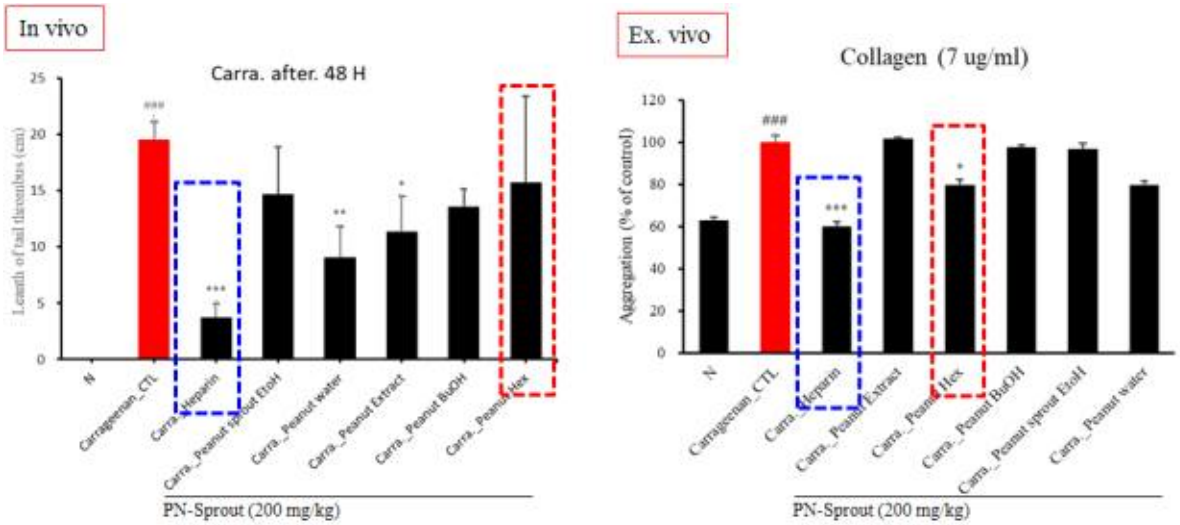
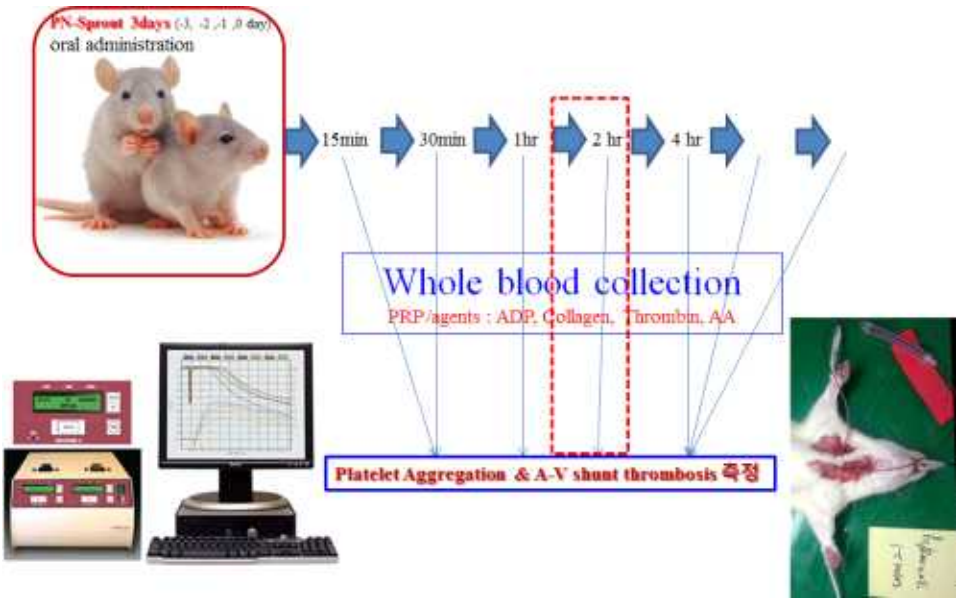


Fig.2. Antithrombotic effects of fractional extracts of PN-Sprout 3 days in carrageenan induced mice tail thrombosis model.

14. *Ex-vivo* Study-Platelet Aggregation Inhibition



<PN-Sprout 3days EtOH ext. 혈행개선 동물실험 및 임상용량결정시험>

▷ SD rat을 군당 구분하여 1주간 사육실에서 순화 후 8주령 수컷 SD rat에 3일전부터 PN-Sprout 3days EtOH 추출물 (300 mg/kg, 150 mg/kg, 75 mg/kg)을 투여 2시간 후 심장천자로 채혈하여 sodium citrate를 처리 후 원심분리하고 PRP혈소판을 분리하여 Chrono-log aggregometer를 사용하여 collagen에 의한 혈소판응집능을 측정했다. collagen과 ADP로 혈소판 응집을 유도하고 응집능을 측정한 결과, PN-Sprout 3days EtOH 추출물은 collagen 유도 혈전 기전에서 300 mg/kg, 150 mg/kg, 75 mg/kg 3개 용

량 모두에서 통계적으로 유의성 있는 억제 효능을 나타낸 반면 ADP 유도 기전에서는 효능을 나타내지 않음. 따라서 임상시험시 채혈하여 혈전억제효능을 평가시 응집유도 agonist로는 collagen을 사용하고 그 농도는 7 mg/ml를 적용하는 것이 적절함을 확인함. 또한 비임상 효력시험 용량은 대조군에 비하여 28%억제능을 보인 300 mg/kg으로 확인함. 양성대조군인 aspirin과 clopidogrel 투여군에서 혈소판억제 기전을 확인함 (Fig.3).

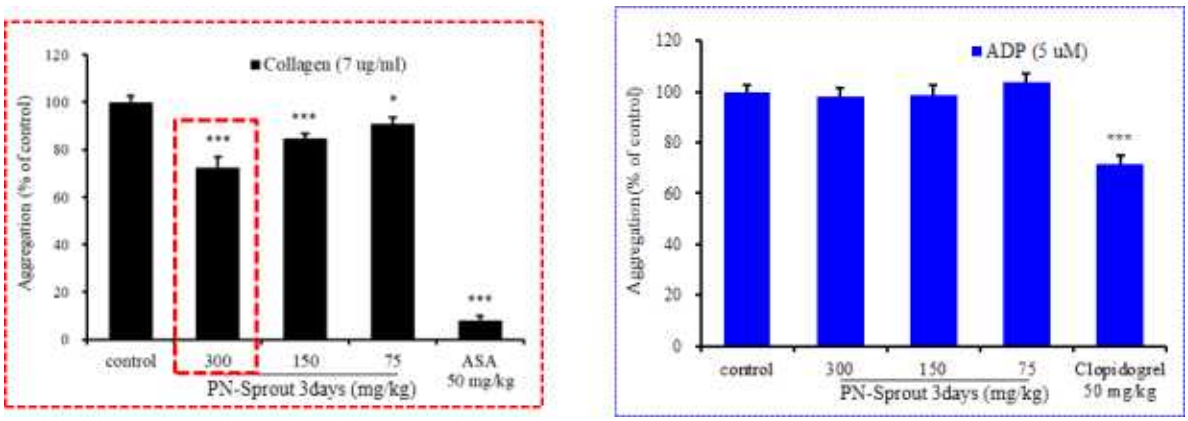


Fig.3. *Ex-vivo* Study of PN-Sprout 3days EtoH extract-Platelet Aggregation Inhibition

15. rat arteriovenous (AV)-shunt model

▷ 3일 동안 약물을 투여한 후, 좌측경동맥(Left carotid artery)과 우측경정맥(Right jugular vein)에 각각 폴리에틸렌 카테터를 삽입하고, 5cm 실리콘 튜브에 목화솜을 넣고 생리식염수를 채운 후 상기 동맥과 정맥에 연결된 튜브로 혈액을 흐르게 하여 전단응력(shear-stress)을 유도하여 15분간 혈전을 생성한다. 생성된 혈전을 건조시켜 무게를 측정하여 항응혈효과를 평가하여, 8주령 수컷 SD rat에 PN-Sprout 3days EtOH 추출물(300 mg/kg, 150 mg/kg, 75 mg/kg)을 투여 2시간 후 항혈전 효능을 측정한 결과, PN-Sprout 3days EtOH 추출물은 대조군에 비하여 300 mg/kg과 150 mg/kg 투여군에서 32.8%와 31.2% 혈전을 억제함. 그 외 대조군에 비하여 75 mg/kg PN-Sprout 3days 투여군은 17.5%, 양성대조군 Aspirin (50 mg/kg)은 64.5%로 혈전을 억제함. 결론적으로 PN-Sprout 3days EtOH 추출물은 75 mg/kg, 150 mg/kg, 300 mg/kg 용량 모두에서 통계적 유의성($p<0.001$)을 가지고 용량의존적으로 혈전억제 효능을 나타냄 (Fig.4).

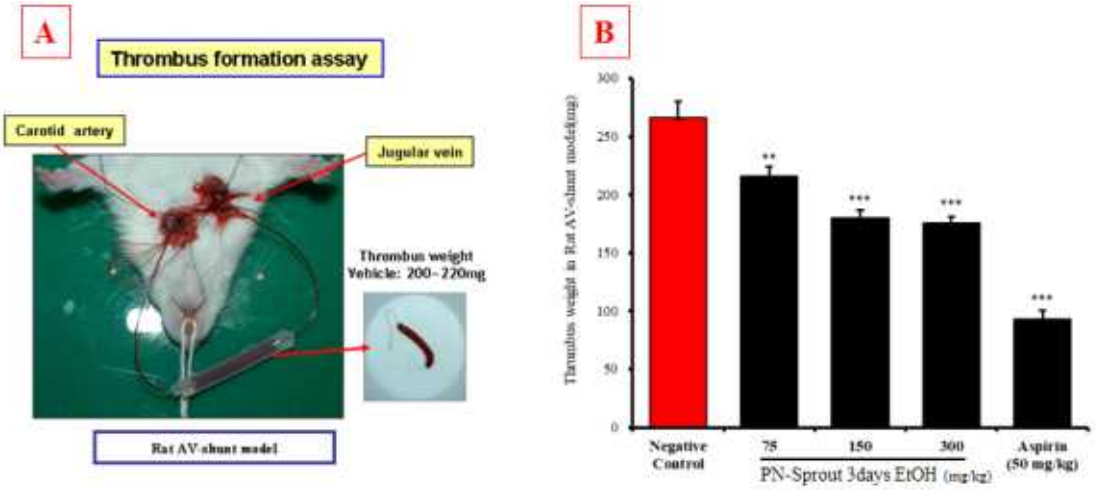


Fig.4. Anti-platelet effect of PN-Sprout 3days EtoH extract on rat arteriovenous (AV)-shunt model

16. Peanut food allergy mouse model

▷ 실험동물은 4주령의 암컷 C57bl/6n 마우스를 ㈜오리엔트바이오(Seoul, Korea)로부터 공급받아 실험동물실에서 일주일간 사육, 순화시킨 후 사용하였음. 사육실의 온도는 20±2℃, 상대습도 50±5%으로 조절하고, 할란사료 (2018S, Harlan, USA)와 음수는 케이지에 비치하여 자유섭식하도록 하였으며 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간주기로 조절. C57bl/6n 마우스(n=4 / group)의 경구를 통하여 0일, 7일에 10 μg / mouse의 농도로 투여하여 감작시켜 유발. 또한, 0일, 7일에는 5mg/mouse의 농도로 PN 추출물을 투여하고, 동시 21일, 35일에는 PN추출물을 30~40분 간격으로 2번 투여. 마지막 투여 후 마우스를 희생하여 실험을 진행하였음 (Fig.5).

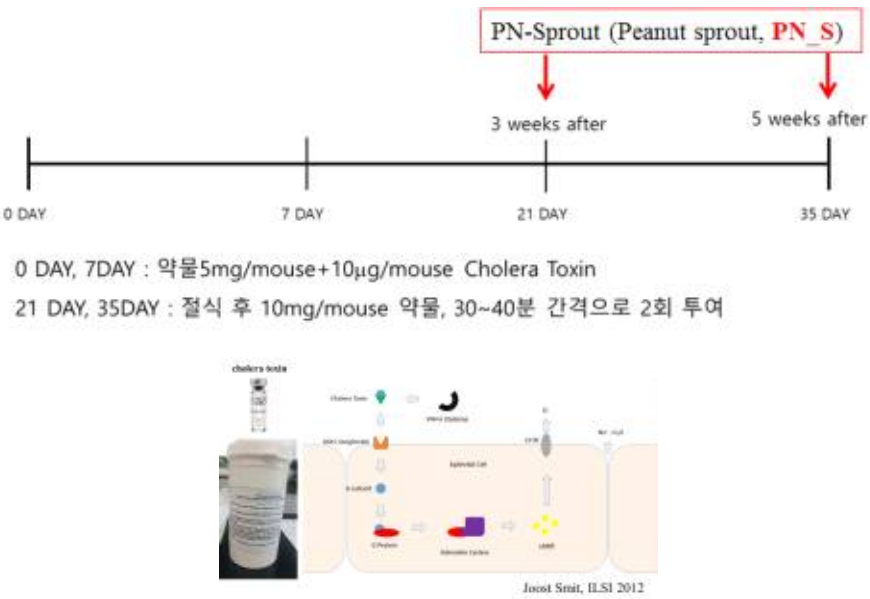


Fig.5. Allergic Protective Effect of PN & PN-Sprout against PN+CT (cholera

toxin)-induced peanut food allergy animal mode

▷ 8주령 수컷 C57bl/6n 생쥐에 cholera toxin으로 감작 후 PN-Sprout 추출물 (300 mg/kg)을 투여하고 부검 및 직장의 체온변화를 측정한 결과, Food anaphylaxis 측정을 위하여 cholera toxin으로 감작하여 PN을 투여한 후 PN-Sprout 추출물 (0 day)군에서 직장체온이 30분 경과시에 체온이 감소하여 알러지 아나팔락시스(anaphylaxis)가 나타났고, PN-Sprout (3~7days) 투여군에서는 거의 나타나지 않았다.

땅콩의 단백 항원은 Ara h1에서 Ara h8까지 8개가 알려져 있으며, 가장 지배적인 주 항원은 Ara h1, Ara h2, Ara h3로 알려져있고, 땅콩의 단백 항원은 Ara h1에서 Ara h8까지 8개가 알려져 있으며, 가장 지배적인 주 항원은 Ara h1으로 PN-Sprout 추출물 (0 day)군에서 Ara h1 특이 IgE 이 증가하였고, PN-Sprout (3~7days) 투여군에서는 정상군에 가깝게 거의 증가하지 않음. PN-Sprout 3days 투여군에서 IFN-γ,와 IL-10의 생산량이 현저하게 증가하여 면역증진효과를 확인. cholera toxin에 의해 유도된 마우스 모델에서 spleen의 총 절대 CD11b+/Gr-1+ 세포수가 대조군에 비하여 PN-Sprout (3~7days) 투여군이 감소를 나타냄. 그 외 대조군에 비하여 75 mg/kg PN-Sprout 3days 투여군은 17.5%, 양성대조군 Aspirin (50 mg/kg)은 64.5%로 혈전을 억제함. 결론적으로 PN-Sprout 3days 추출물은 Food anaphylaxis, Ara h1, 염증 사이토카인의 감소 효과를 통해 식품알레르기 반응을 효과적으로 억제하였고, PN을 PN-Sprout으로 키움으로써 식품알레르기를 줄일 수 있음(Fig.6~18).

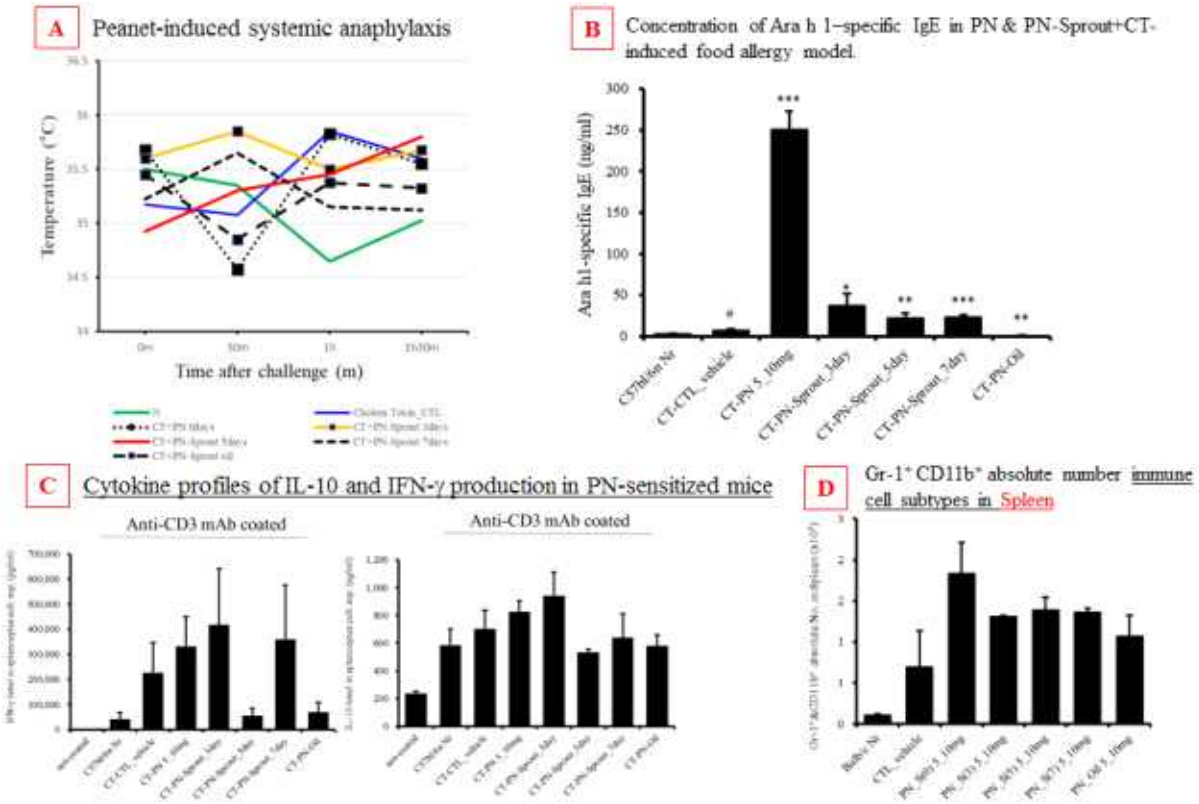


Fig.6. A mouse model for a peanut food allergy using cholera toxin (CT) intraperitoneal sensitization

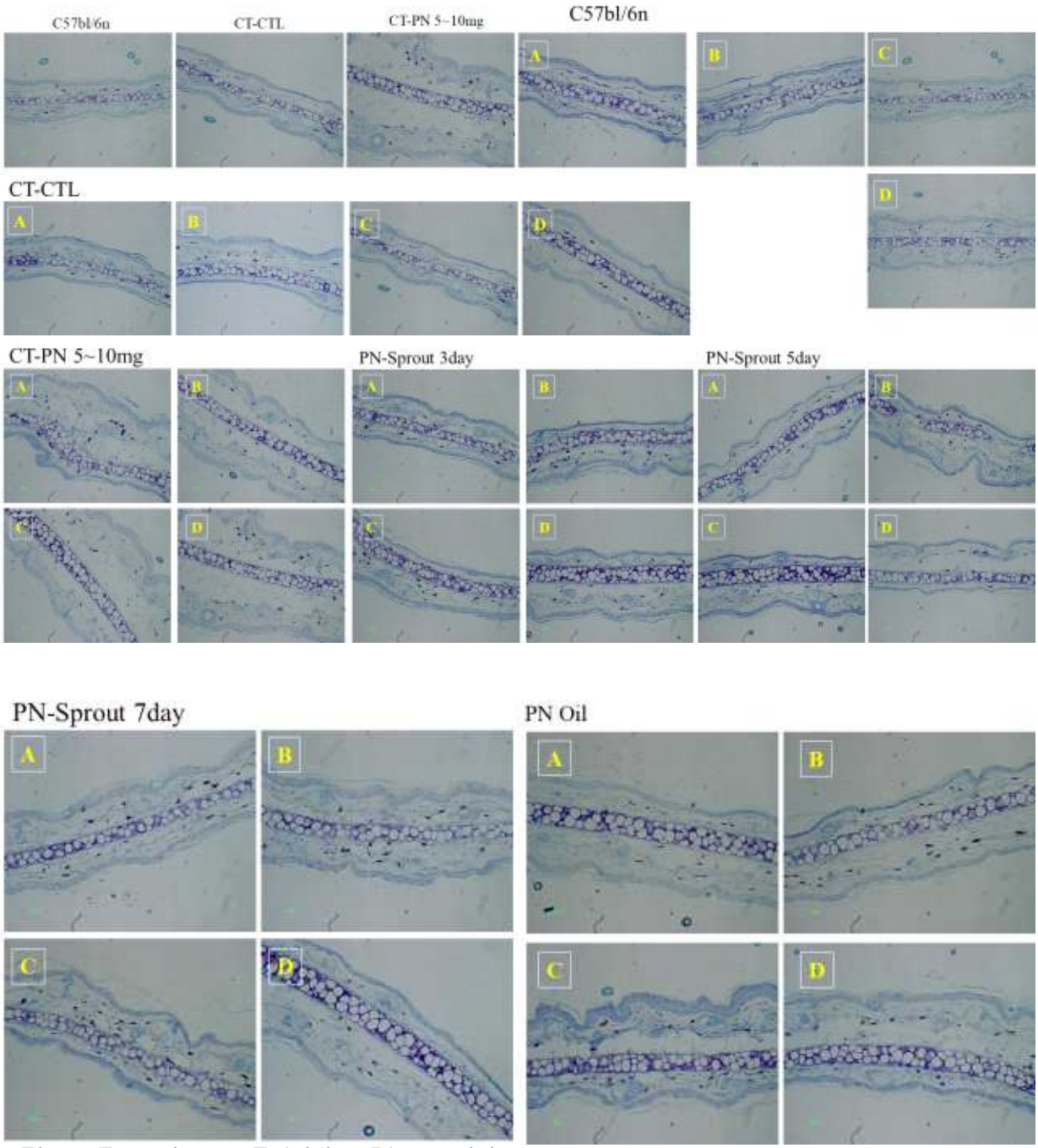


Fig.7. Ear tissue: Toluidine Blue staining

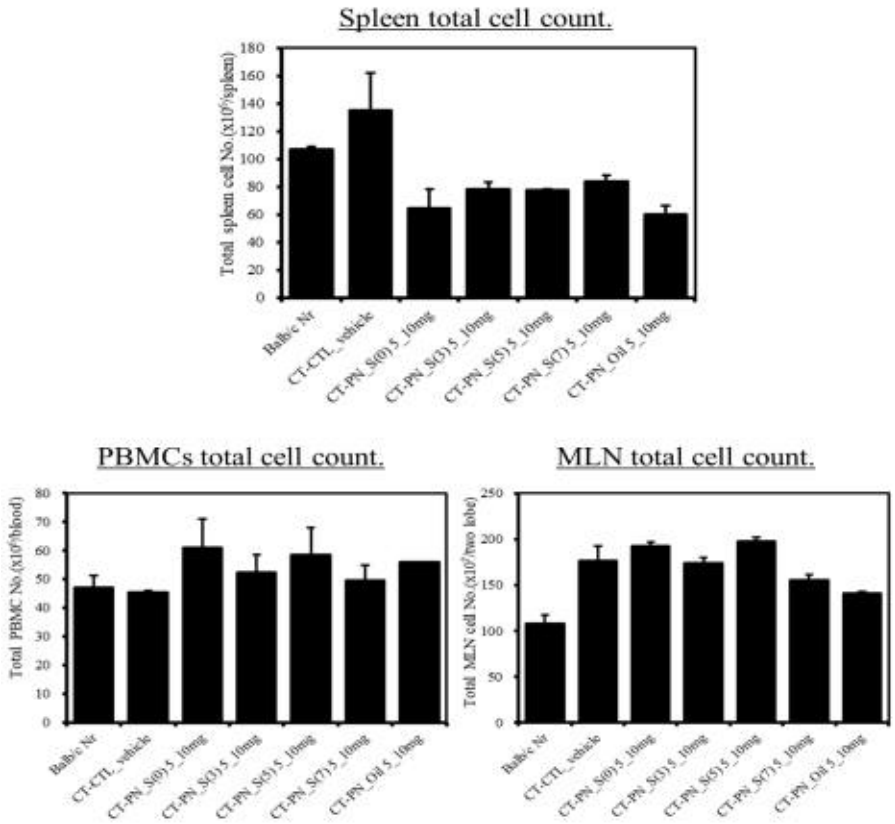


Fig.8. Total cell count

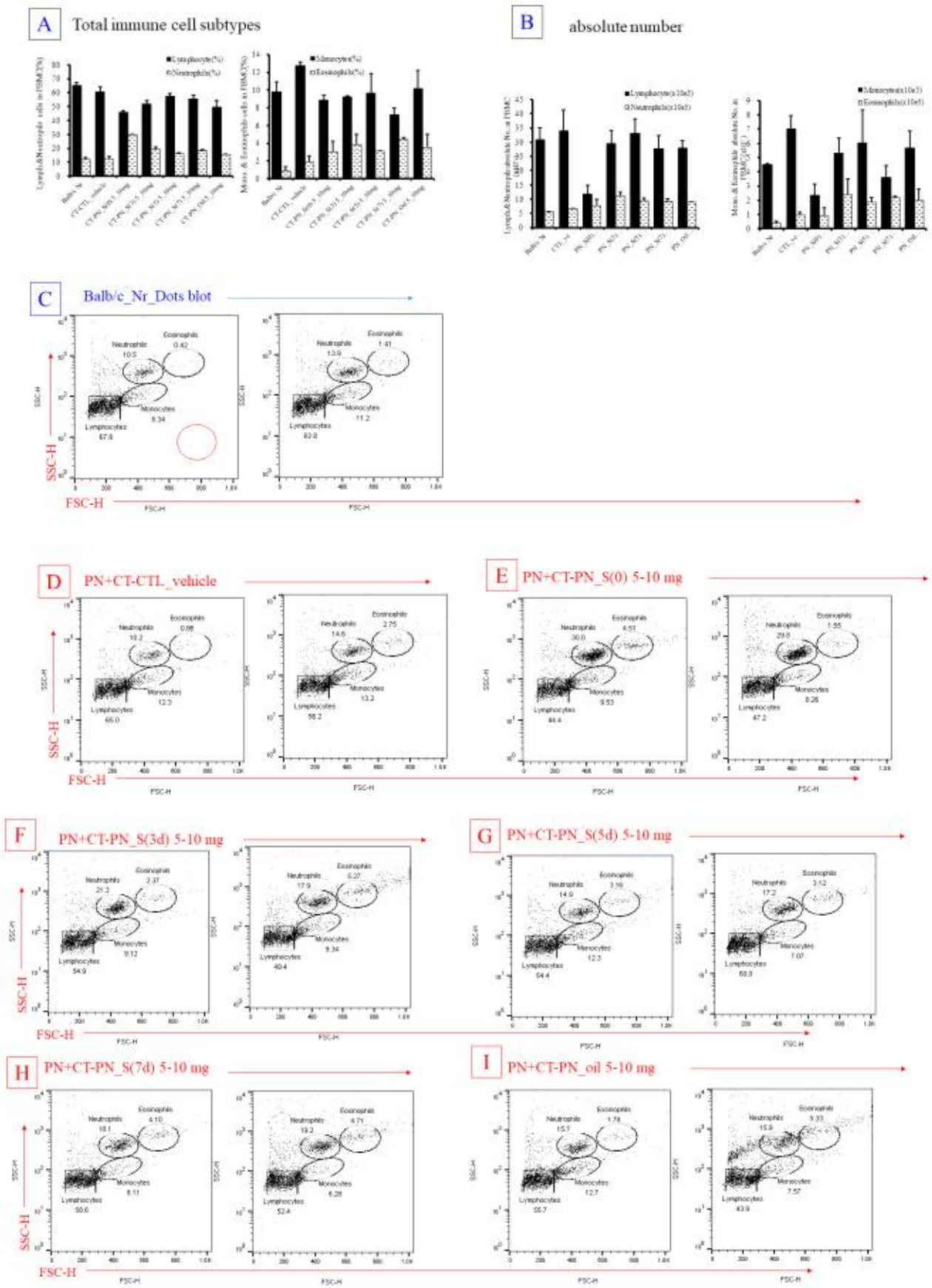


Fig.9. Population analysis of various immune cell subtypes in PBMCs in PN & PN−Sprout+CT−induced food allergy model(n=8)

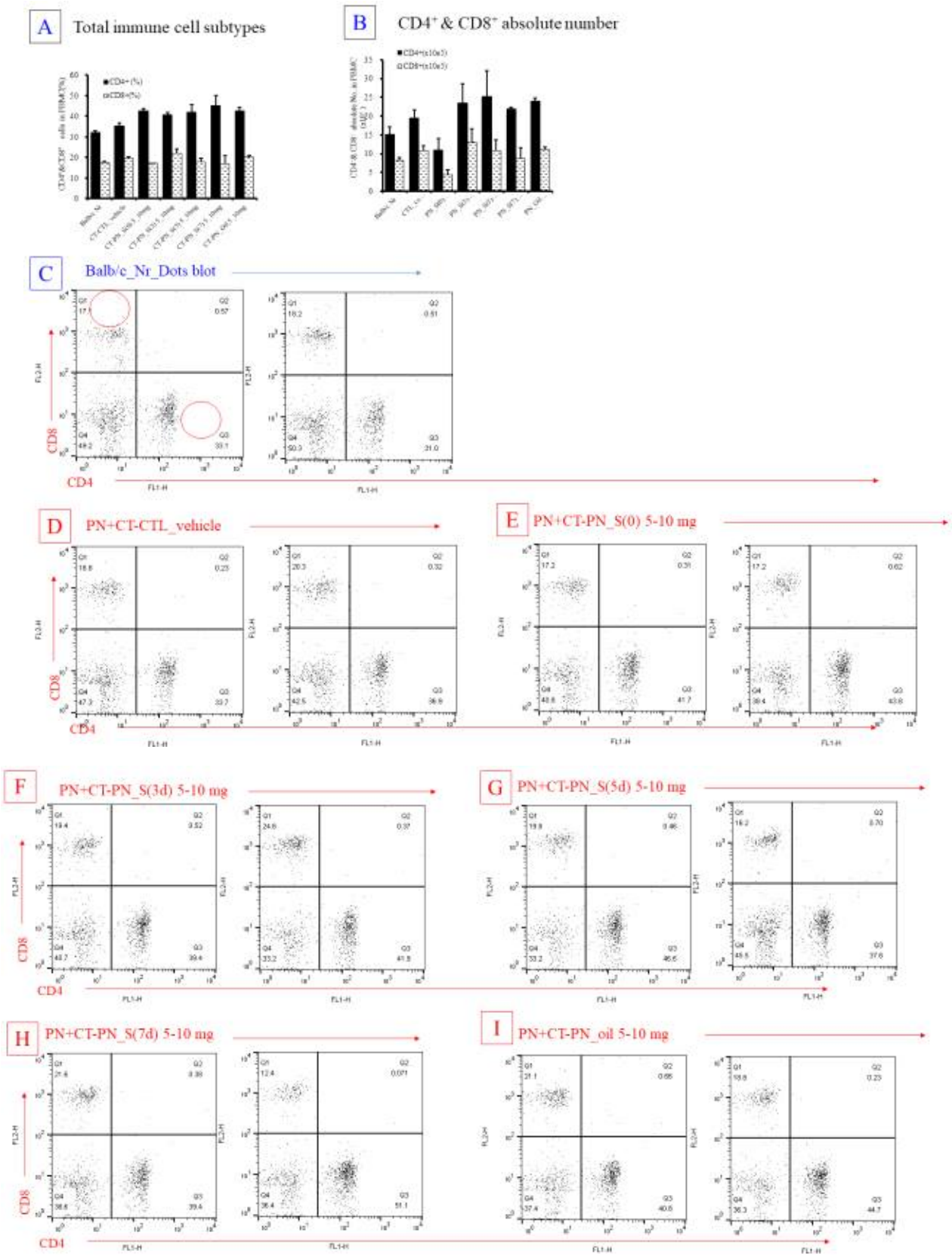


Fig.10. Population analysis of various immune cell subtypes (CD4+&CD8+) in PBMCs in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

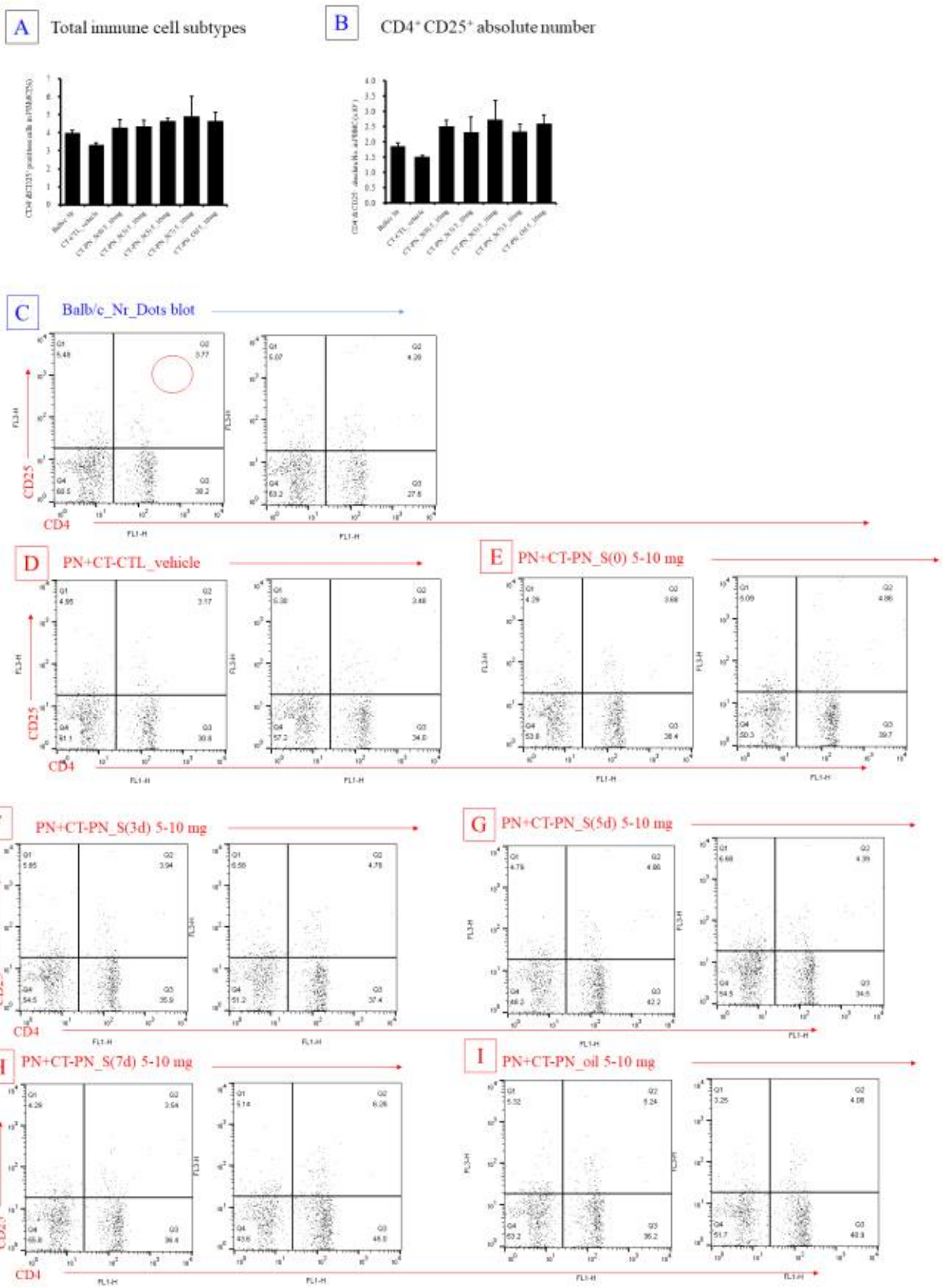


Fig.11. Population analysis of various immune cell subtypes (CD4+/CD25+) in PBMCs in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

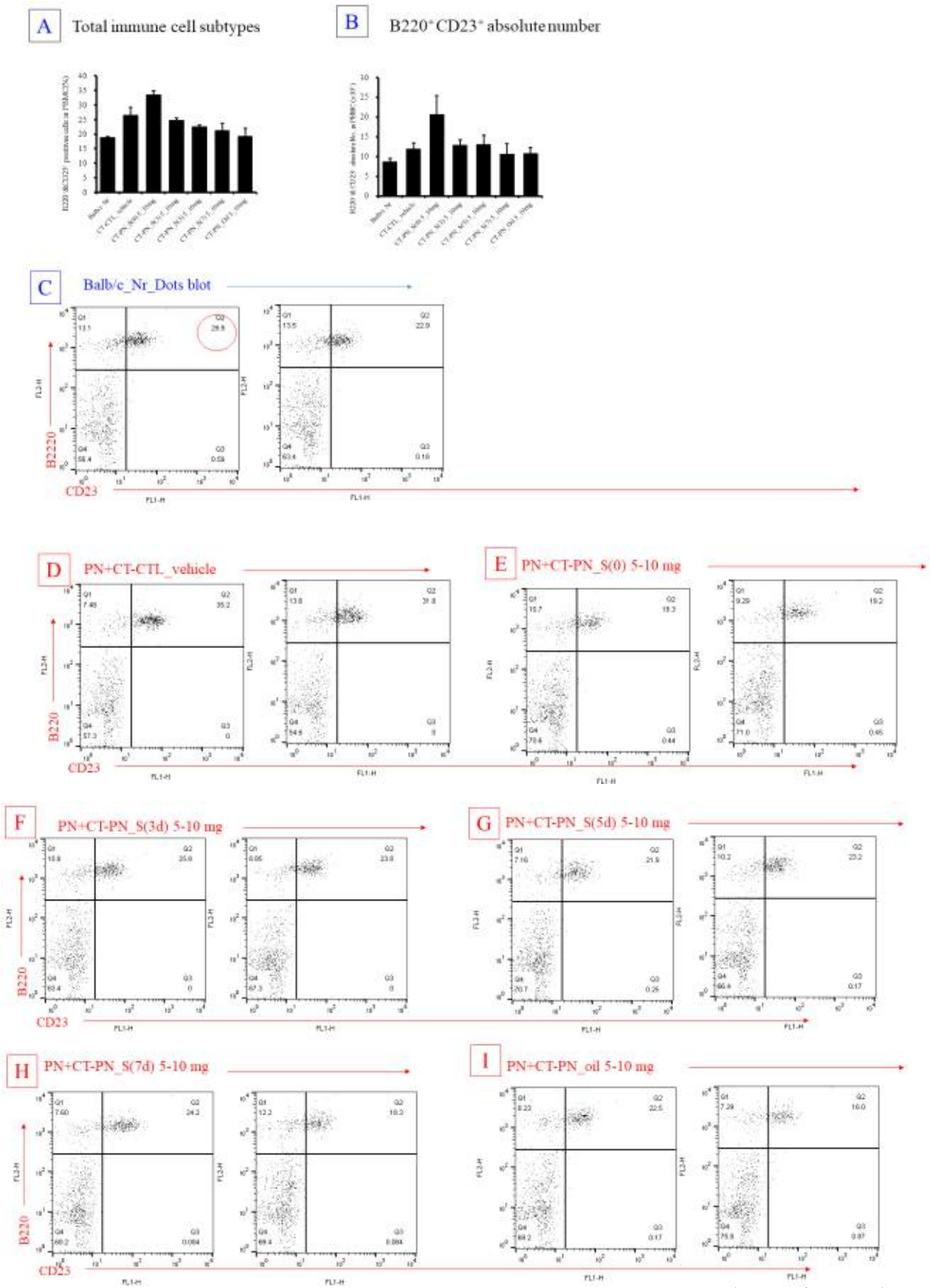


Fig.12. Population analysis of various immune cell subtypes (CD4+/CD25+) in PBMCs in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

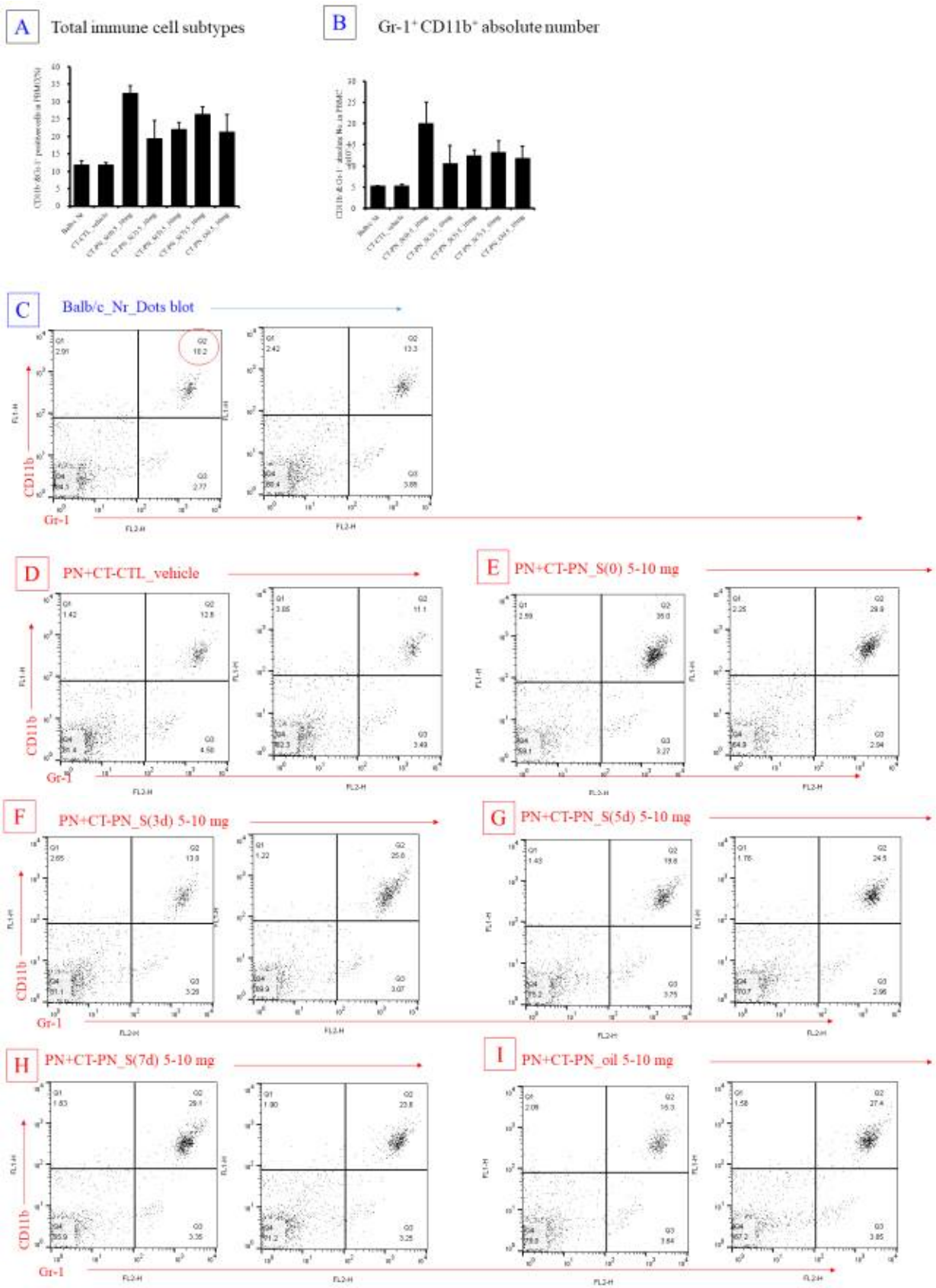


Fig.13. Population analysis of various immune cell subtypes (CD11b+/Gr-1+) in PBMCs in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

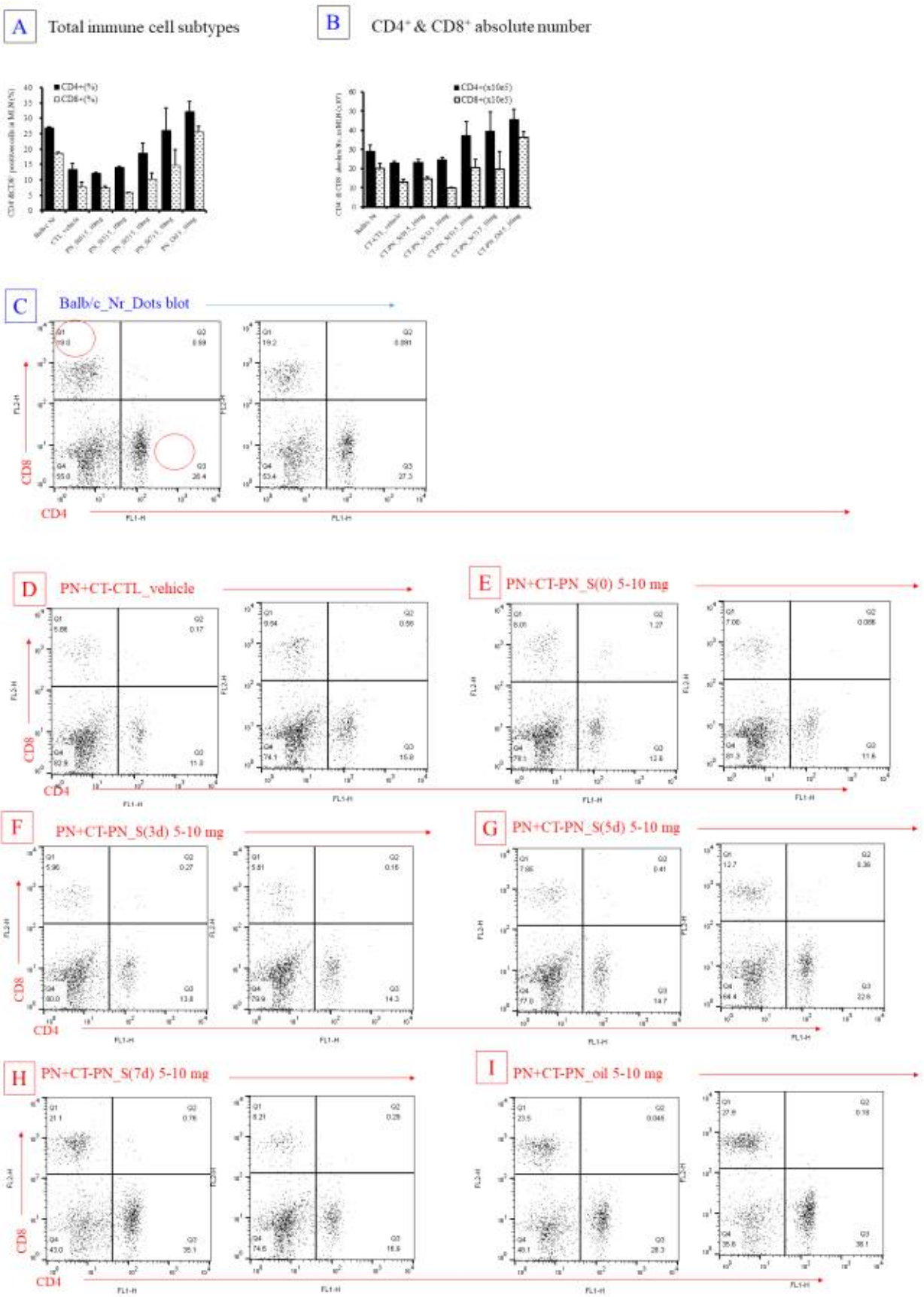


Fig.14. Population analysis of various immune cell subtypes (CD4+&CD8+) in MLN in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

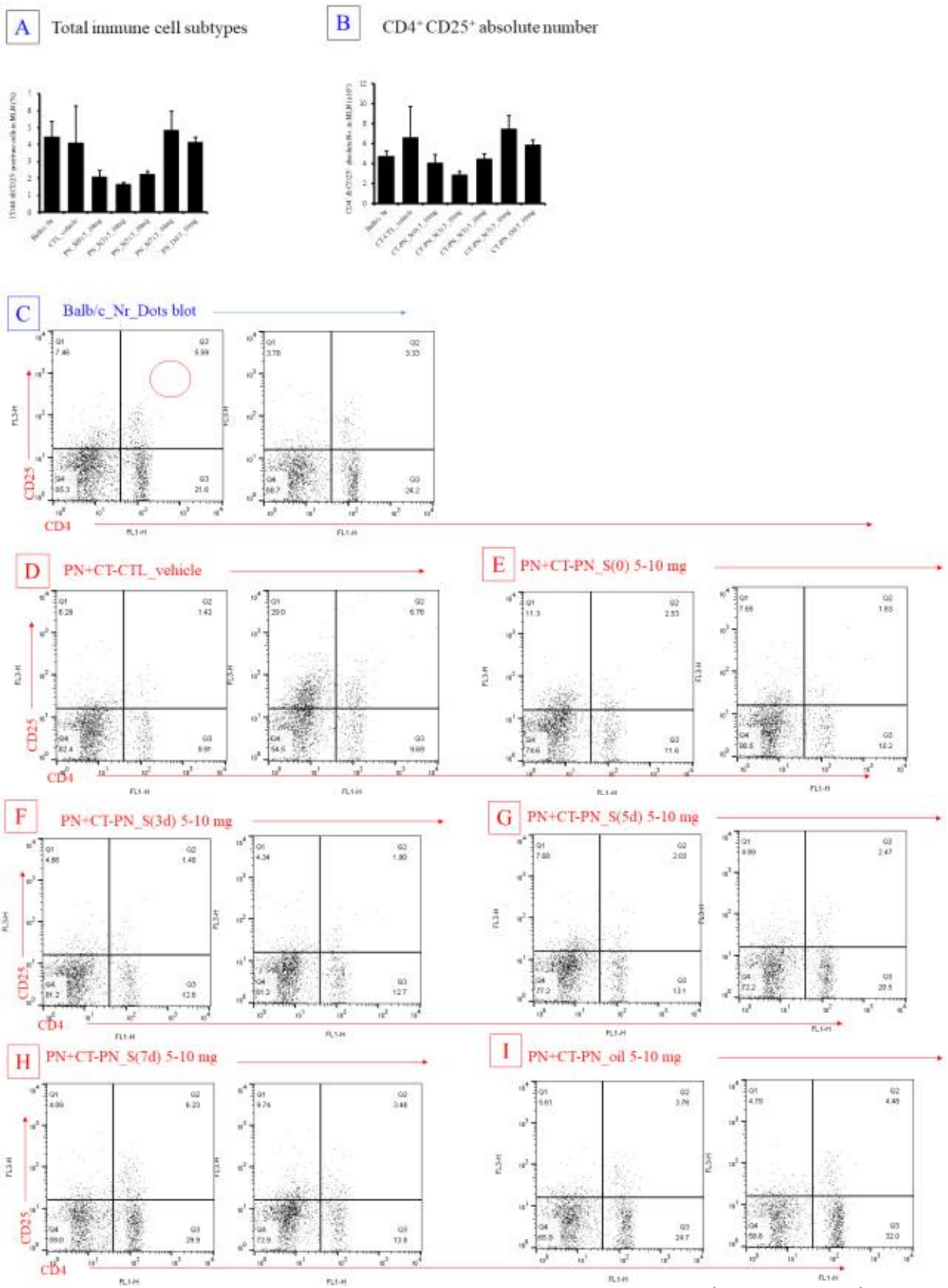


Fig.15. Population analysis of various immune cell subtypes (CD4+CD25+) in MLN in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

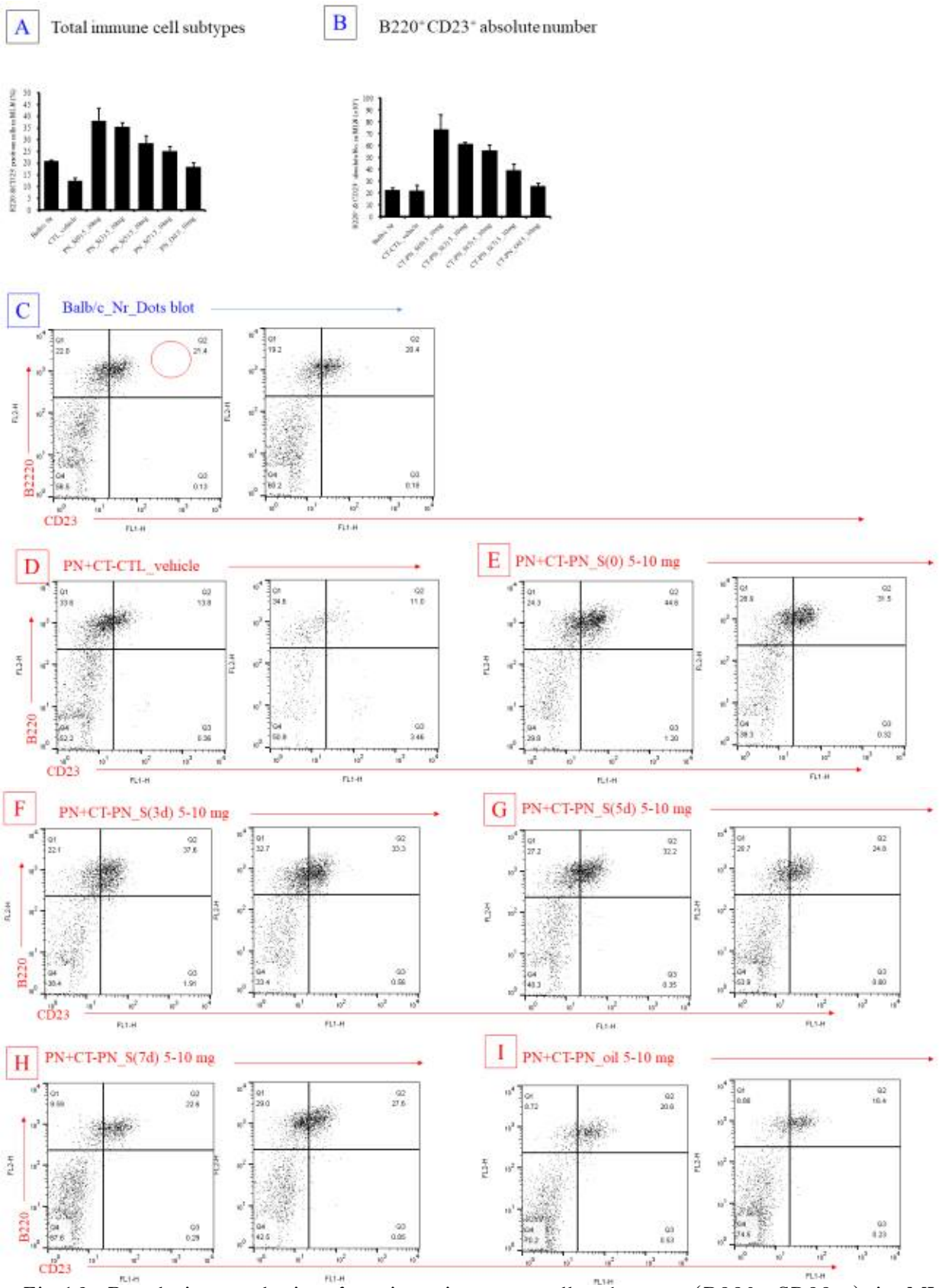


Fig.16. Population analysis of various immune cell subtypes (B220+CD23+) in MLN in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

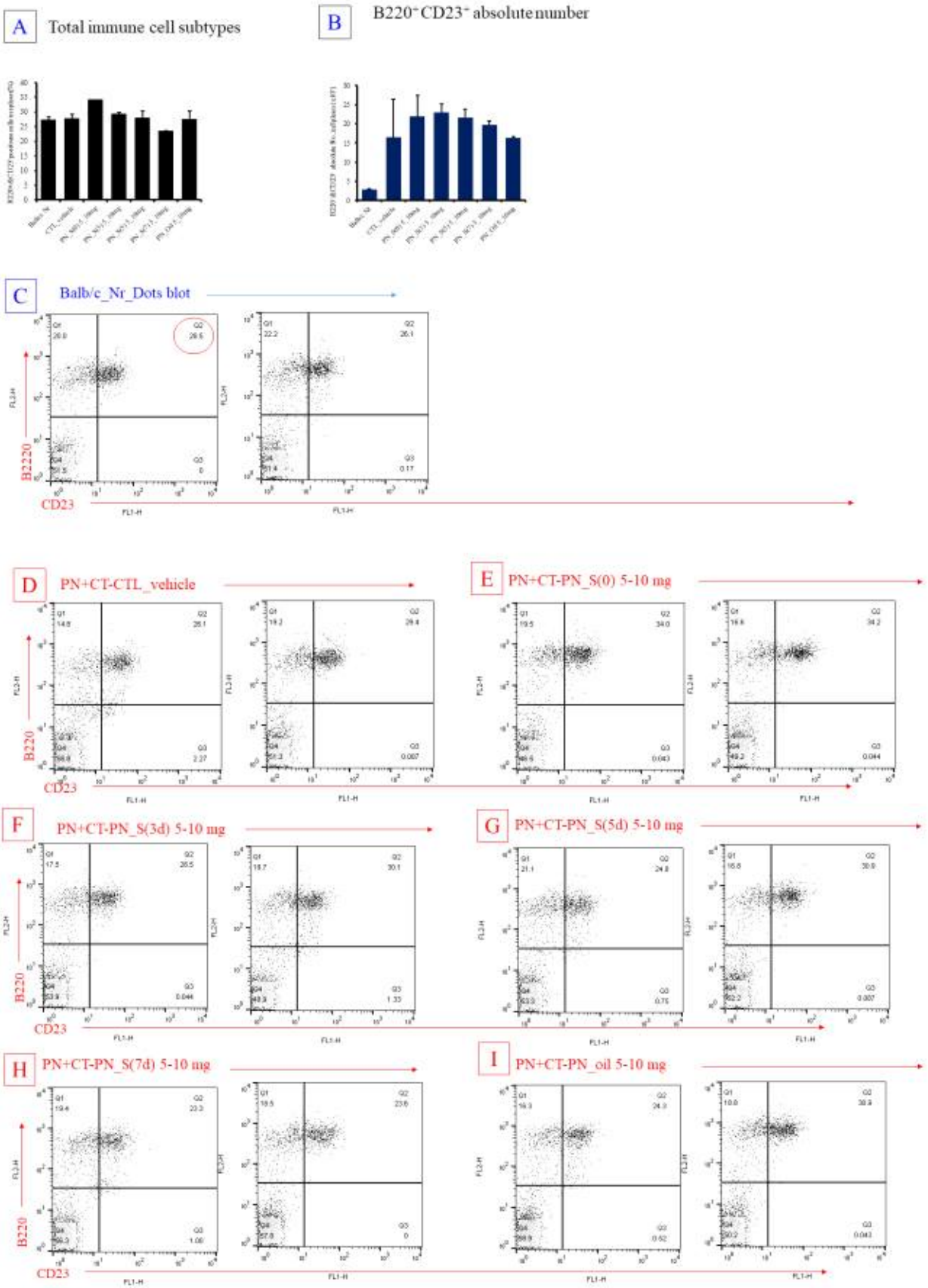


Fig.17. Population analysis of various immune cell subtypes (B220+CD23+) in spleen in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

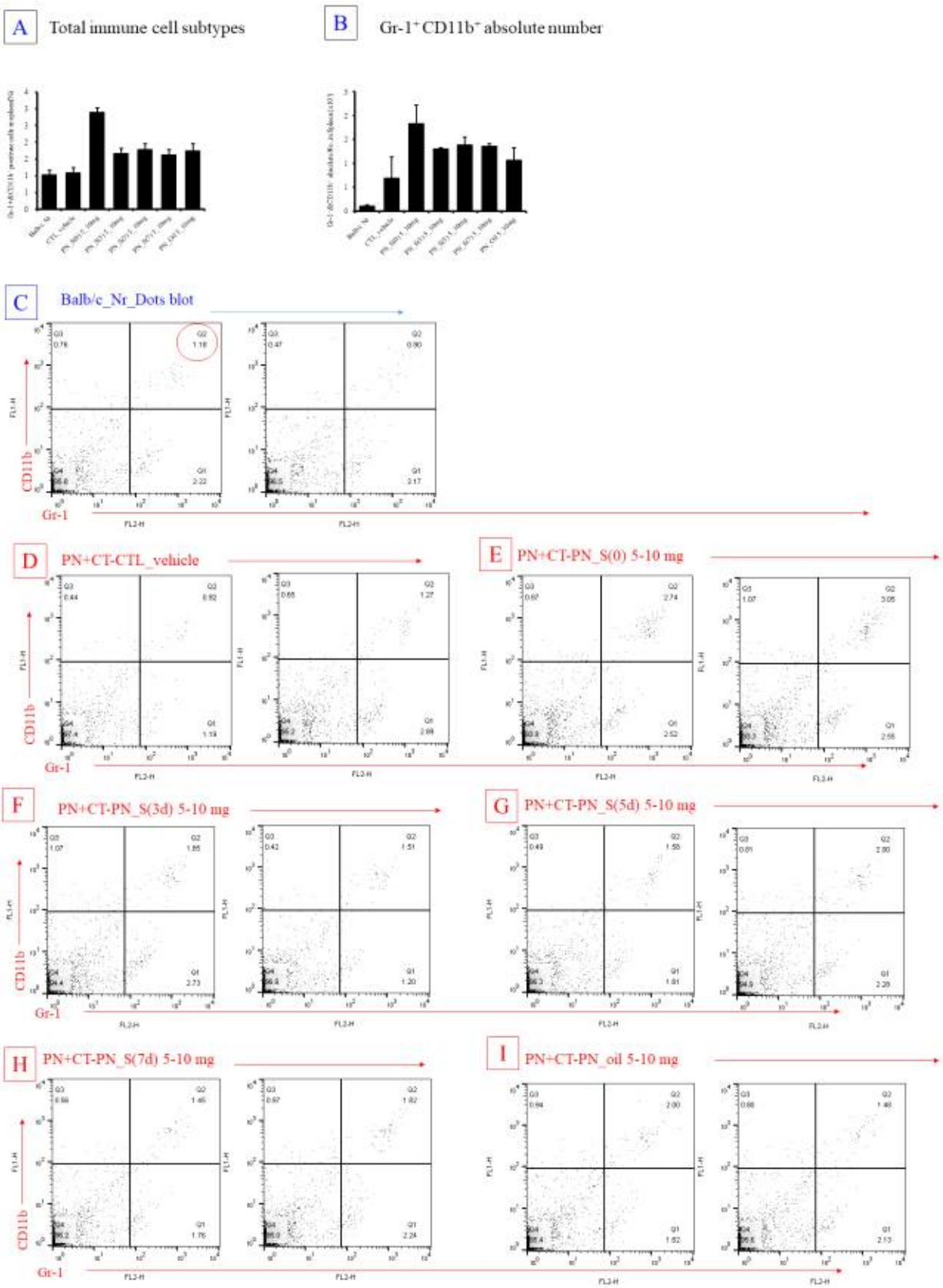


Fig.18. Population analysis of various immune cell subtypes (CD11b+Gr-1+) in spleen in PN & PN-Sprout+CT-induced food allergy model(n=8)

17. PNS_E 3 days and PNS_E 9 days의 항혈전 효능에 대한 동물효력평가

(1) SD 흰쥐에서 Arterio-Venous(A-V) shunt model을 이용한 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days의 유효성 평가.

PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days들를 0.5%CMC에 잘 녹인 후 300g의 SD 흰쥐에 각각 200 mg/kg,그리고 400 mg/kg씩 경구 투여한다. 1시간 후 SD rat의 복강에 2 ml 씩 urethane 1.25g/kg을 주사하여 마취한 후, 마취가 끝나면 Left carotid artery와 Right jugular vein에 PE50 tube로 cannulation 했다. 그런 다음 5cm silicon tube에 cotton thread을 넣고 saline을 채운 후 artery와 vein에 연결된 tube로 혈액을 흐르게 하여 shear-stress를 유도하여 15분간 thrombus를 생성시켰다. 생성된 thrombus를 건조시켜 무게를 측정한 결과로, vehicle 대조군이 273±18.9 (mg)의 thrombosis가 형성되었고, PNS_E 3 days 400 mg/kg투여군이 162±6.5 (mg)로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 40.6% 혈전(thrombosis) 억제 효과가 나타났다 ($p<0.001$). 그리고 PNS_E 3 days 200 mg/kg투여군은 198±9.9 (mg)로 27.4%, 그리고 PNS_E 9 days 400 mg/kg투여군은 198±9.9 (mg)로 27.4%의 통계학적으로 유의성 있게 혈전(thrombosis) 억제 효과가 나타났다 ($p<0.01$). PNS_E 3 days의 농도의존적으로 항혈전 효능을 A-V shunt 모델에서 관찰할 수 있었다 (Fig.9), Fig.10.

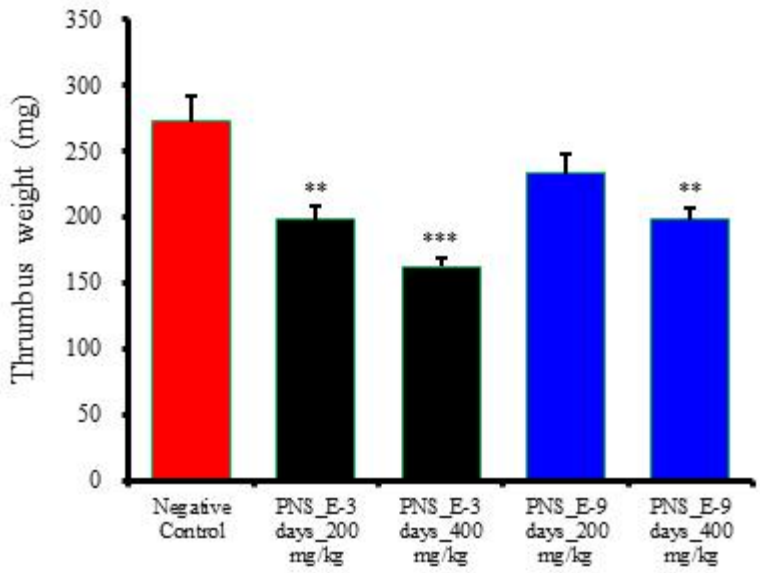


Fig.9. Mean (S.D.) effects of vehicle (Control), and PNS_E 3 days and PNS_E 9 days (200, 400 mg/kg/day) orally for 3 days, on thrombus weight in arteriovenous shunt model in rats (n =6 per data point).

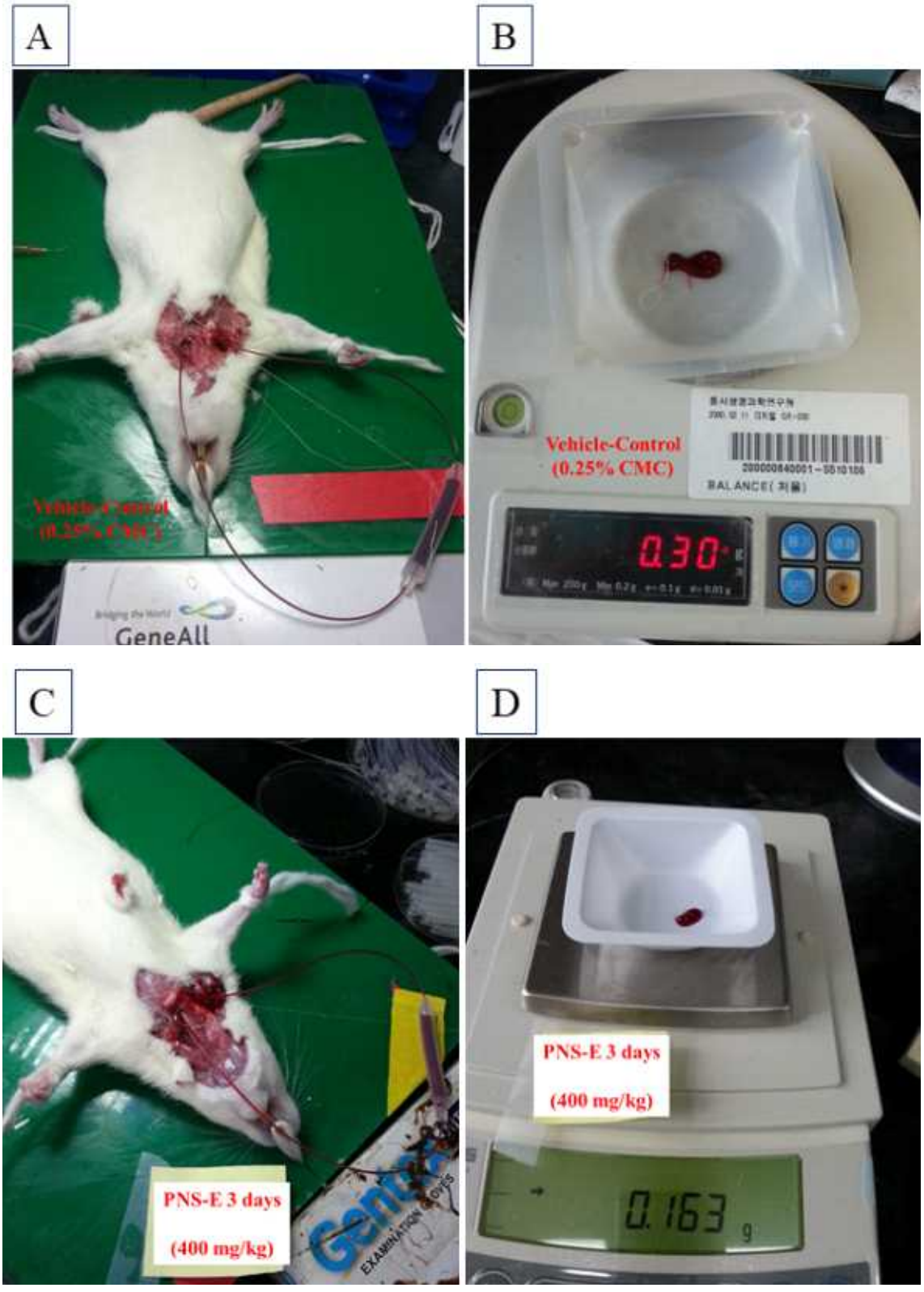


Fig.10. A−V shunt rat and thromosis photograph of vehicle (Control), and PNS_E 3 days (400 mg/kg/day) photograph A~D.

(2) Carrageenan 유도 혈전 생쥐모델에서 Aspirin, Clopidogrel, 그리고 PNS_E 3 days와

PNS_E 9 days들간의 항혈전 유효성 평가 비교. (Antithrombotic effects of PNS_E in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model)

① Carrageenan 유도 혈전 생쥐모델에서 Heparin, Aspirin, 그리고 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days들간의 항혈전 유호성 평가.

Fig.11는 carrageenan유도 24시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 측정한 결과로 대조군 (control)에 비하여 PNS_E 3 days 400 mg.kg은 대조군 (control)에 비하여 통계학적 유의성 있게 감소를 나타내었다. 그리고 Aspirin 50 mg/kg은 대조군 (control)에 비하여 약 3배이상 유의성 있게 감소를 나타내었고 ($p<0.001$), 그러나 PNS_E 3 days 200 mg.kg, PNS_E 9 days 200 mg.kg, 그리고 PNS_E 9 days 400 mg.kg투여군은 대조군 (control)과 차이가 없었다.

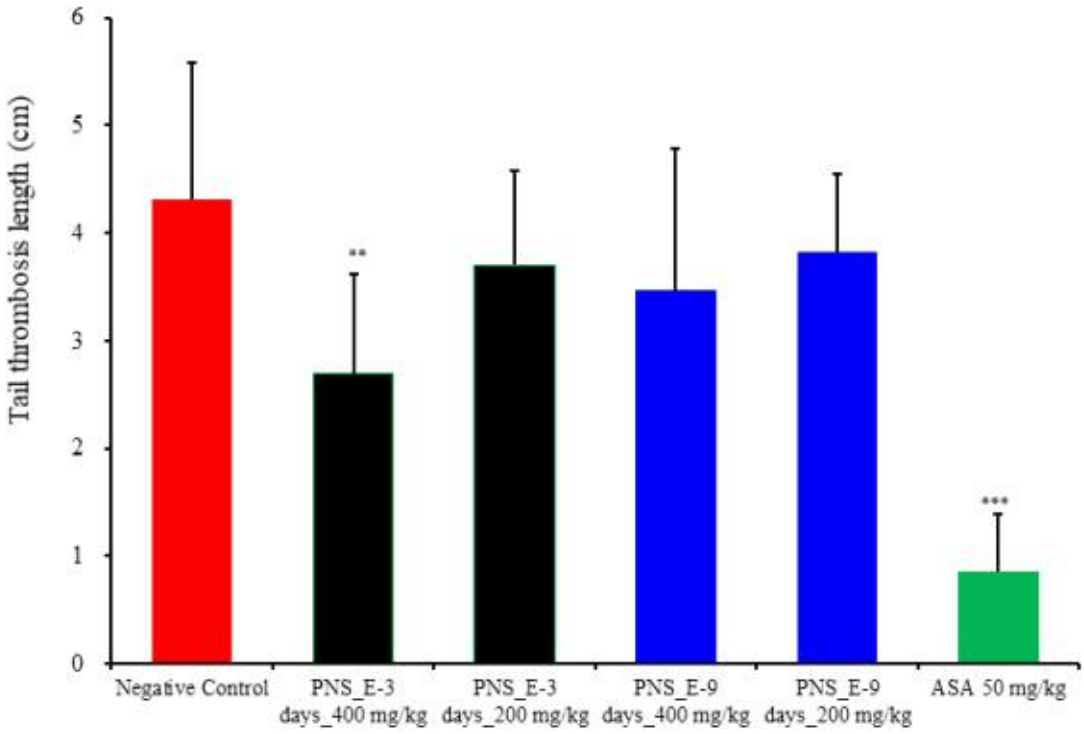


Fig.11. Effects of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days and Aspirin, in carrageenan-induced mice tail thrombosis at 48h. Mean (S.D.) effects of vehicle (Control), PNS_E 3 days and PNS_E 9 days and Aspirin (50 mg/kg/day) administration for 3 days (n =10 per data point).

② Carrageenan 유도 혈전 생쥐모델에서 Aspirin, Clopidogrel, 그리고 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days의 항혈전 유호성 평가.

Fig.12는 carrageenan유도 48시간 후 꼬리 혈전 형성길이 (tail thrombosis)를 측정한 결과로 대조군 (control)에 비하여 양성대조군인 Aspirin (20 mg/kg)과 Clopidogrel (50 mg/kg)투

여군은 대조군에 비하여 91% 이상 현저하게 통계학적 유의성 있게 감소를 나타내었고 ($p<0.001$), PNS_E 3 days은 대조군 (control)에 비하여 200 mg/kg ($p<0.01$), 과 400 mg/kg ($p<0.01$) 농도 의존적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig.12). 그러나 PNS_E 9 days은 대조군 (control)에 비하여 차이가 없었다 (Fig.12, Fig.13,).

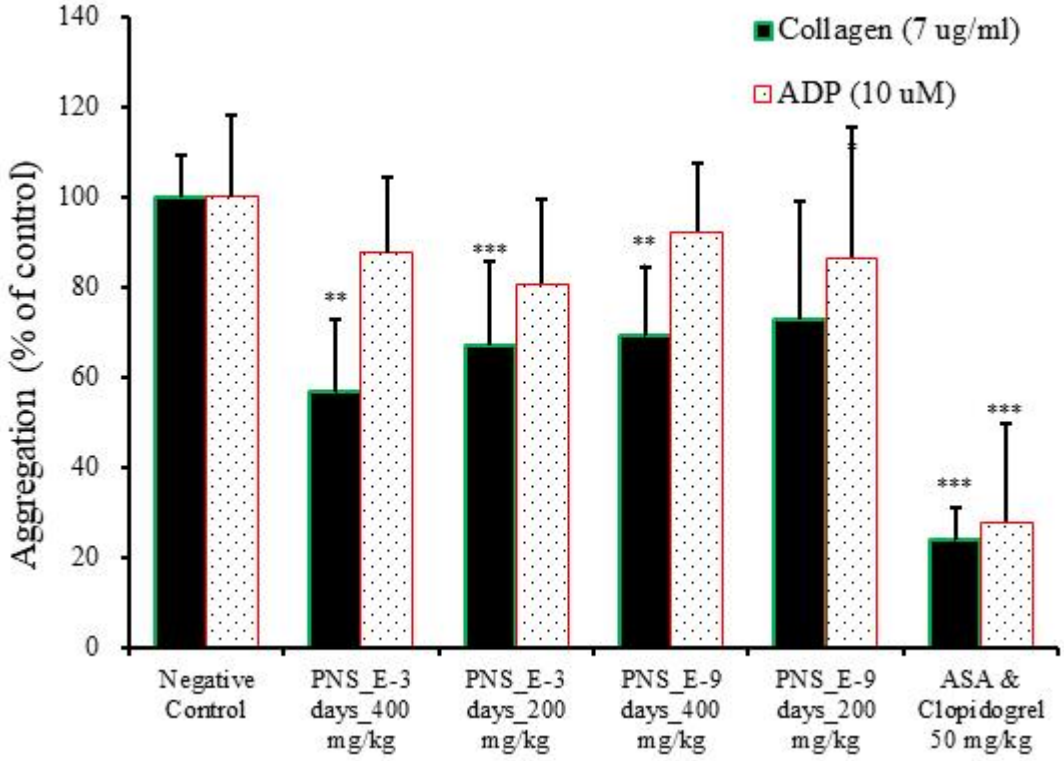
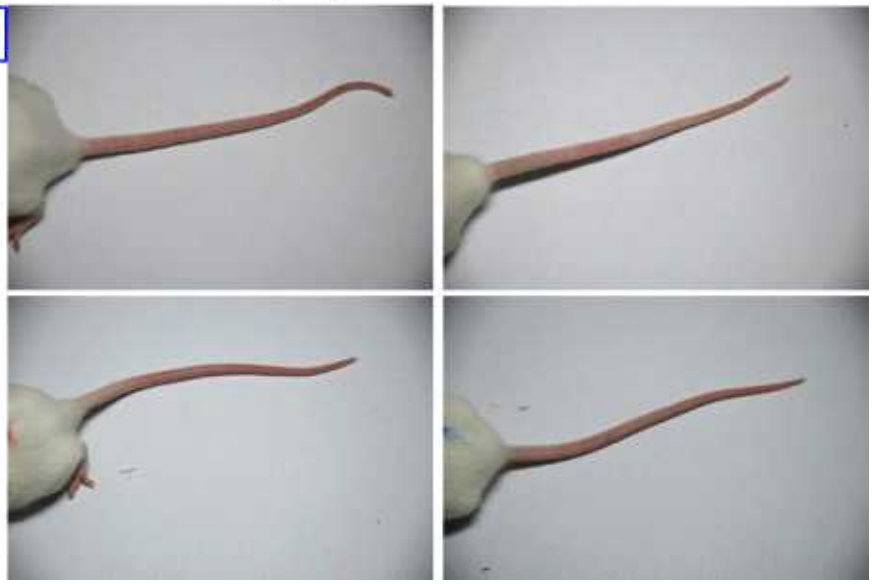


Fig.12. Effects of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days, Aspirin, and Clopidogrel in carrageenan-induced mice tail thrombosis at 48h. Mean (S.D.) effects of vehicle (Control), PNS_E 3 days and PNS_E 9 days (200, 400 mg/kg/day), Aspirin (20 mg/kg/day), and Clopidogrel (50 mg/kg/day)orally for 3 days (n =10).

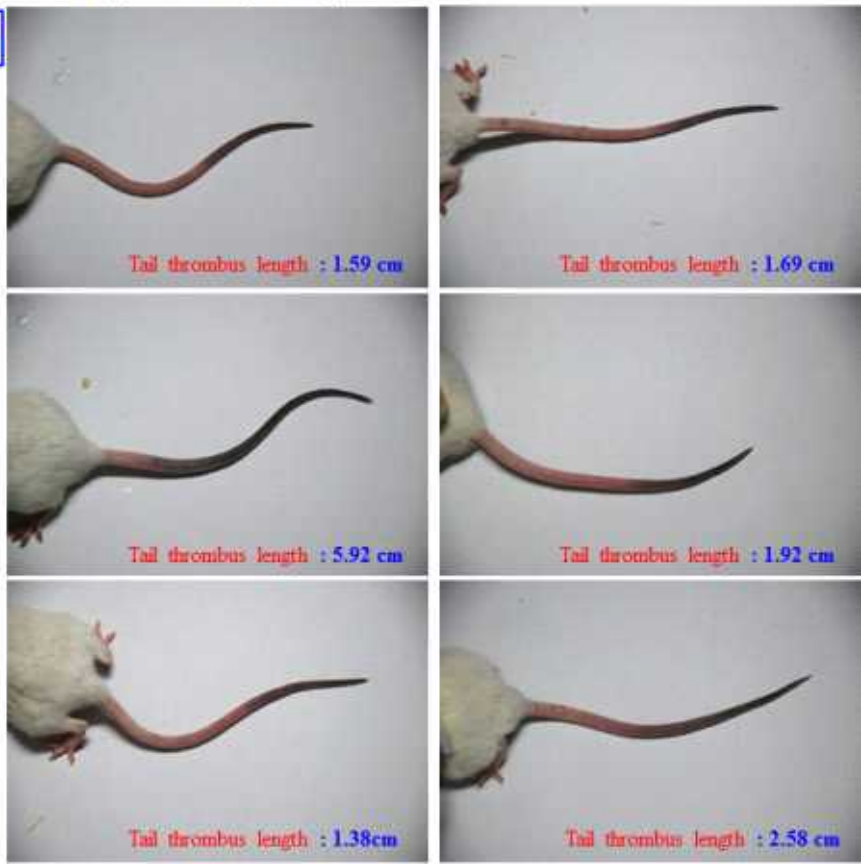
Normal ICR mice (30 g)

A



Carrageenan-i.p 48h _ Control

B



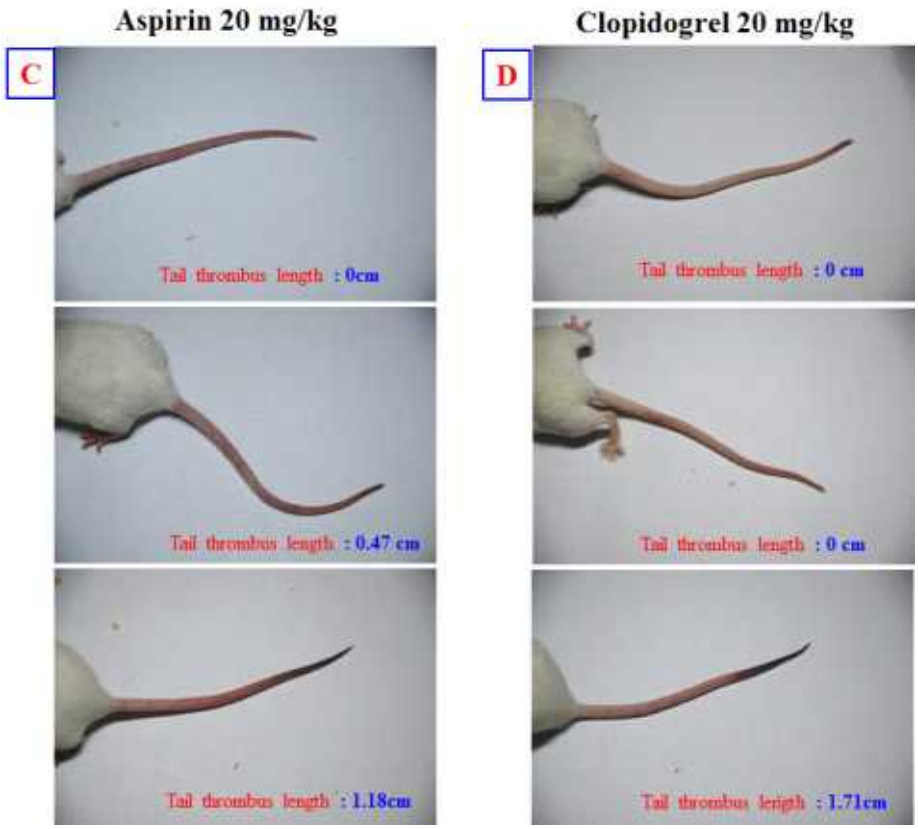


Fig.13. Effects of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days, Aspirin, and Clopidogrel on carrageenan induced mice tail thrombus length (48 h after carrageenan injection).
A~D, carrageenan induced mice tail thrombus length photograph.

18. 기능식품 후보소재 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days의 collagen에 의한 혈소판 활성화 기전연구

(가) PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days에 의한 TXA2 (Aspirin^{TM} Effect-Detection) 측정 변화

PNS_E 3 days and PNS_E 9 days의 기전을 탐색해보고자 cyclooxygenase에 의해 PGH_2로부터 생성되는 thromboxane A2 (TxA2)는 불안정한 물질이므로, 그 대사체인 thromboxane B2 (TXA_2)를 측정하였다. 우리의 연구결과에서 Fig.3은 11dH TXA2를 나타내는 그래프로, 대조군의 수준은 676.09 (pg/ml)이었으며, PNS_E 3 days 추출물은 50 ㎍/ml을 처리했을 때는 651.07 (pg/ml)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 유의성은 없었고, 100, 200 ㎍/ml시에는 468.93 ($p<0.05$), 347.5 ($p<0.01$) (pg/ml)수준으로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소로 나타났다. PNS_E 9 days 추출물은 50, 100, 200 ㎍/ml 처리순으로 보았을 때 대조군에 비하여 차이가 없었다. 그리고 아스피린 ($p<0.05$) (aspirin) 50 ㎍/ml을 처리하여 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig. 3). 이러한 결과로 PNS_E 3 days이 농도 의존적으로 collagen 유도 TXA2의

생산을 억제하는 것으로 생각된다.

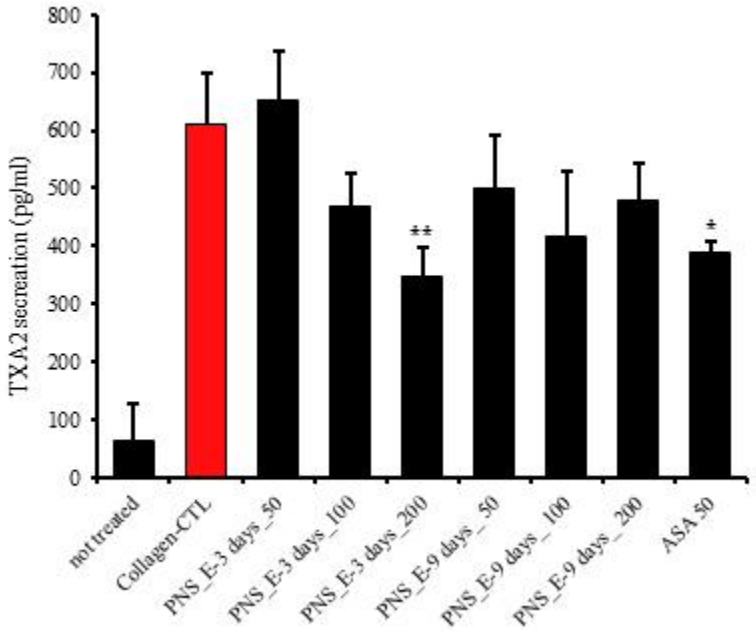


Fig.3. Effects of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days on collagen-activated platelet ATP release expression TXA2 production.

Washed platelets were pre-incubated with PNS_E 3 days and PNS_E 9 days and stirred in an aggregometer for 2 min prior to collagen stimulation for 5 min, and then the reactions were terminated followed by granule secretion assay. The TXA2 formation was terminated by addition of 2 mM EDTA and 50 mM indomethacin 5 min after the addition of collagen (5 ㎍/ml). Bar graphs show mean SEM of at least three independent experiments performed. *: $P < 0.05$ or **: $P < 0.01$ versus agonist-activated control.

나) PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days에 의한 serotonin 측정량 평가 변화

혈액의 혈소판 등은 활성화되면 혈액 내 serotonin을 분비하며 이는 인접세포를 자극하여 혈행을 저하시킨다. 따라서 serotonin을 측정하는 원리는 o-phthalaldehyde (OPT)와 반응해서 fluorophore를 형성한다. 최적의 fluorimetric condition에서 22 pmol 이하를 검출할 수 있다. 혈소판의 serotonin 함량은 300 nmol/10 humal platelets 부터 6930ìmol/10 rabbit platelets까지 종에 따라 다양하며 공통적으로 일어나는 중요한 인자이다. 즉, Serotonin은 혈소판내의 a-granules에 저장되어 있다가 collagen, thrombin, ADP 등의 자극을 통해 방출되어 편두통을 유발하고 비가역적 혈소판 응 집 반응에 관여한다. 우리의 연구결과에서 Fig.4는 serotinin 함량을 나타내는 그래프로, 전처리 과정에서 collagen으로 유도하지않은 -0군에서는 55.259 (ng/ml)이었고, 전처리 과정에서 collagen으로 유도한 대조군 (collagen-CTL)에서는 524.8 (ng/ml)수준으로 나타났다. PNS_E 3 days추출물은 50 ㎍/㎖을 처리했을 때는 517.44 (ng/㎖)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 유의성은

없었고, 100, 200 ㎍/㎖시에는 394.08 ($p<0.05$), 379.01 ($p<0.05$) (ng/㎖)수준으로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소로 나타났다. PNS_E 9 days 추출물은 50, 100, 200 ㎍/㎖ 처리순으로 보았을 때 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으나 유의성은 없었다. 양성대조군으로 아스피린 ($p<0.01$) (aspirin) 50 ㎍/ml을 처리하여 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig. 4). 이러한 결과로 PNS_E 3 days이 농도 의존적으로 collagen 유도 serotonin 분비를 억제하여 혈소판 활성을 억제하는 것으로 생각된다.

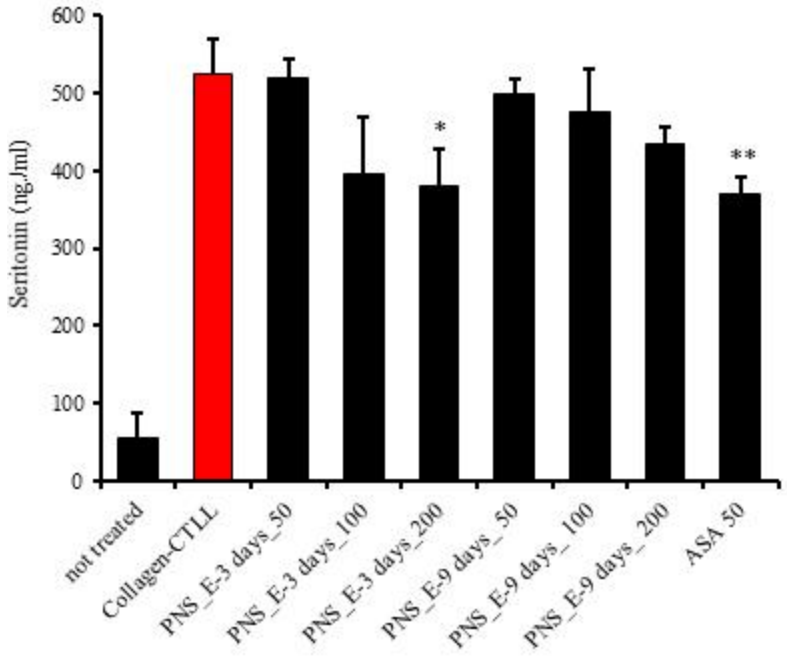


Fig.4. Effects of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days on collagen-activated platelet ATP release expression Serotonin production.

Washed platelets were pre-incubated with PNS_E 3 days and PNS_E 9 days and stirred in an aggregometer for 2 min prior to collagen stimulation for 5 min, and then the reactions were terminated followed by granule secretion assay. The serotonin formation was terminated by addition of 2 mM EDTA and 50 mM indomethacin 5 min after the addition of collagen (5 ㎍/ml). Bar graphs show mean SEM of at least three independent experiments performed. *: $P < 0.05$ or **: $P < 0.01$ versus agonist-activated control.

(다) PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days에 의한 intracellular calcium ion 농도$[Ca2+]_i$ 측정량 평가 변화

collagen, thrombin, ADP 등의 자극을 통해 방출되어 비가역적 혈소판 응집 반응에 관여하고, 이때, 세포질 내 존재하는 endoplasmic reticulum으로부터 동원되어지는 Ca^{2+}과 세포 외부에서 유입되는 Ca^{2+}이 중요하게 작용한다. 이에 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days이 collagen에 의해 유도되는 혈소판 응집 반응과 세포질내 Ca^{2+} 농도에 미치는 영향에 관해

알아 보았다. 우리의 연구결과에서 Fig. 5는 intracellular calcium (Ca^{2+}) 농도를 나타내는 그래프로, 전처리 과정에서 collagen으로 유도하지 않은 -0군에서는 139.8 (nM)이었고, 전처리 과정에서 collagen으로 유도한 대조군 (collagen-CTL)에서는 1453.2 (nM)수준으로 나타났다. PNS_E 3 days 추출물은 50 ㎍/㎖을 처리했을 때는 1228.2 (nM)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 유의성은 없었고, 100, 200 ㎍/㎖에서는 1069 ($p<0.05$), 1018 ($p<0.01$) (nM)수준으로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소로 나타났다. PNS_E 9 days추출물은 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 통계학적으로 유의성은 없었다. 양성대조군으로 아스피린 ($p<0.001$) (aspirin) 50 ㎍/ml을 처리하여 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

이러한 결과로 PNS_E 3 days이 농도 의존적으로 collagen 유도 intracellular calcium (Ca^{2+}) 분비를 억제하여 혈소판 활성을 억제하는 것으로 생각된다.

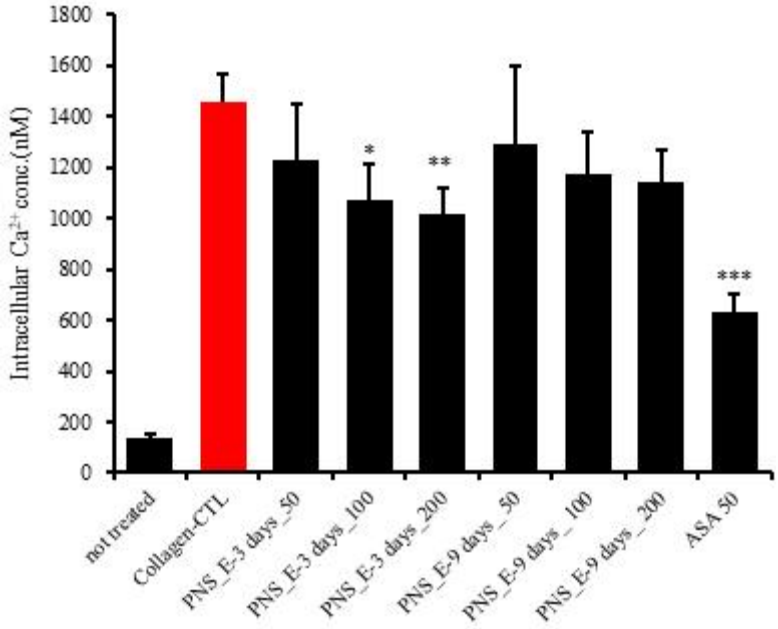
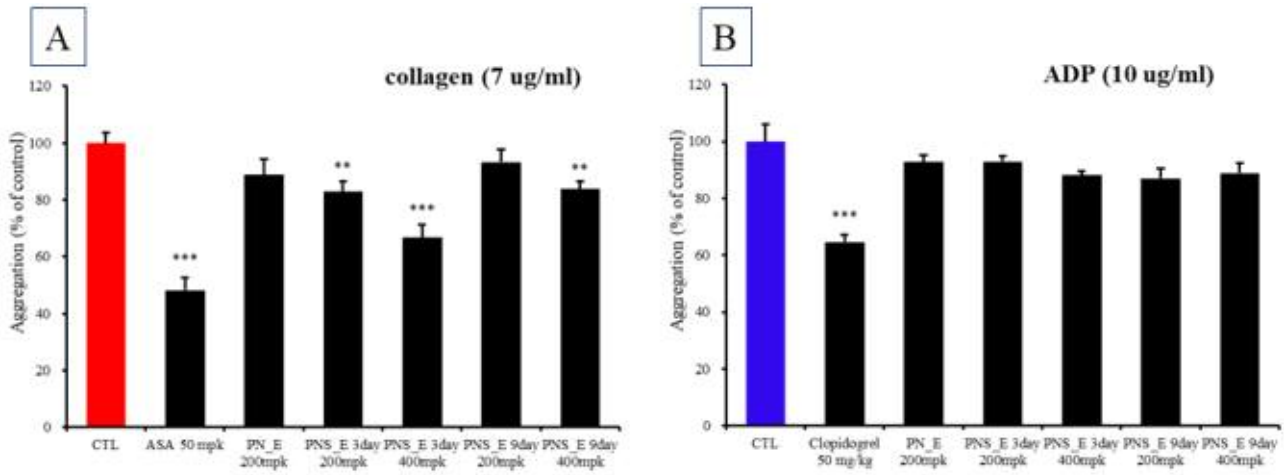


Fig. 5. Effects of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days on collagen-activated platelet ATP release expression TXA2 production concentration.

Washed platelets were pre-incubated with PNS_E 3 days and PNS_E 9 days and stirred in an aggregometer for 2 min prior to collagen stimulation for 5 min, and then the reactions were terminated followed by granule secretion assay. Platelets were loaded with Fura-2/AM. The platelets (3 x 10^8/ml) were pre-incubated with or without a PNS_E 3 days and PNS_E 9 daysin the presence of 1 mM CaCl2 for 2 min at 37℃. [Ca2+]i levels were determined. Bar graphs show mean SEM of at least three independent experiments performed. *: $P < 0.05$ or **: $P < 0.01$ versus agonist-activated control.

(라) PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days에 의한 혈소판응집 Ex vivo 효능 평가 분석

8주령 SD rat을 군당 10마리로 구분하여 1주간 사육실에서 순화 후 PN_E는 200 mg/kg, PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days을 200 mg/kg, 400 mg/kg을, 양성대조군으로 aspirin은 50 mg/kg을 경구투여 하고, 투여 2시간 후 심장천자로 채혈하여 sodium citrate를 처리 후 원심분리하고 PRP혈소판을 분리하여 Chrono_log aggregometer를 사용하여 collagen에 의한 혈소판응집능을 측정하였다. 우리의 연구결과에서 Fig.6A는 PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days의 혈소판응집 반응으로 collagen (7 ㎍/ml) 응집유도에서 PNS_E 3 days 400 mg/kg에서 가장 크게 응집능을 나타내었고, PNS_E 3 days 200 mg/kg에서도 15% 이상 응집능이 관찰되었다. 따라서 임상용량은 400 mg으로 결정되었다. 한편 ADP (10 μM) 응집유도(Fig.6B)에서는 PNS_E의 혈소판 응집이 관찰되지 않았다. Fig. 6C는 collagen 유도로 혈소판 활성화되면 분비량이 증가하는 ATPase 농도를 나타내는 그래프로, 전처리 과정에서 collagen으로 유도하지 않은 -0군에서는 1.35 (nM)이었고, 전처리 과정에서 collagen으로 유도한 대조군 (collagen-CTL)에서는 4.43 (nM)수준으로 나타났다. PNS_E 3 days추출물은 50 mg/kg을 처리했을 때는 4.28 (nM)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 유의성은 없었고, 200, 400 mg/kg에서는 4.15, 3.19 ($p<0.01$) (nM)수준으로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소로 나타났다. PNS_E 9 days 추출물은 대조군에 비하여 차이가 없었다.. 양성대조군으로 아스피린 ($p<0.001$) (aspirin) 50 ㎍/ml을 처리하여 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소를 나타내었다 (Fig. 6C). 따라서 PNS_E 3 days은 collagen 유도 ATPase 분비량을 농도 의존적으로 억제하였고, 그리고 임상시험시 혈액순환 효능 평가를 위하여는 혈액을 채취하여 collagen 유도에 의한 항혈전 효능을 평가하여야 된다.



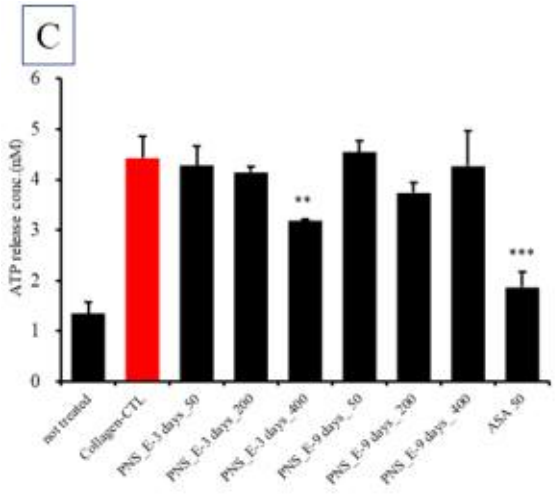


Fig. 6. *Ex vivo* effect of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days administered orally on the collagen-induced platelet aggregation and ATP secretion in SD rat.

PNS_E 3 days and PNS_E 9 days (75, 150 or 300 mg/kg), aspirin (50 mg/kg) or vehicle was orally administered for 1 week to mice with the last dose 60 min before blood collection. Platelet aggregation by collagen (A), Platelet aggregation by ADP (B) and ATP secretion (B) were induced by collagen at the indicated concentrations. Results are expressed as mean SEM (n= 10). *: $P < 0.05$ versus control.

(마) PNS_E 3 days의 collagen으로 유도한 fibrinogen binding 분석 억제 효능

혈소판의 응집은 GPIIb/IIIa와 혈액내의 fibrinogen의 결합에 의해 이루어진다. Fibrinogen은 한 분자내에 중간에 thrombin에 의해 잘려나가는 linker부위에 의해 연결되는 특징적인 RGD 및 KZAGDV 도메인을 양쪽에 가지고 있어 활성화된 GPIIb/IIIa와 결합, 다리 역할을 함으로써 혈소판의 응집을 초래한다. 최근의 여러 연구들에 의하면 GPIIb/IIIa의 형태 변화는 비교적 짧은 세포내 도메인 간의 상호 결합이 깨어지면서 유도된다. 즉 평상시는 α chain과 β chain의 세포내 도메인이 서로 결합되어 있는데, 여러 신호전달 과정에 의해 β chain의 세포내 도메인이 다른 단백과 결합하면서 α chain과의 결합이 깨어지면서 α chain과 β chain의 세포외 도메인의 형태 변화가 유발된다. 이러한 integrin의 형태 변화를 가져올 수 있는 잘 알려진 신호전달 과정은 다양한 경로를 거치며 결과적으로는 integrin의 활성화라는 공통의 결과를 유도한다. Fig. 7A는 collagen 유도로 혈소판 활성화되면 혈소판 응집시 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$의 발현이 증가를 나타내는 그래프로, Fibrinogen binding 빈도(%)는 collagen으로 유도한 대조군 (collagen-CTL)을 100%로 나타났다. PNS_E 3 days 추출물은 50, 100, 200 ㎍/㎖시에는 84%, 79%, 70% ($p<0.001$) 빈도로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소로 나타났다. PNS_E 3 days추출물은 대조군에 비하여 차이가 없었다 (Fig. 7).

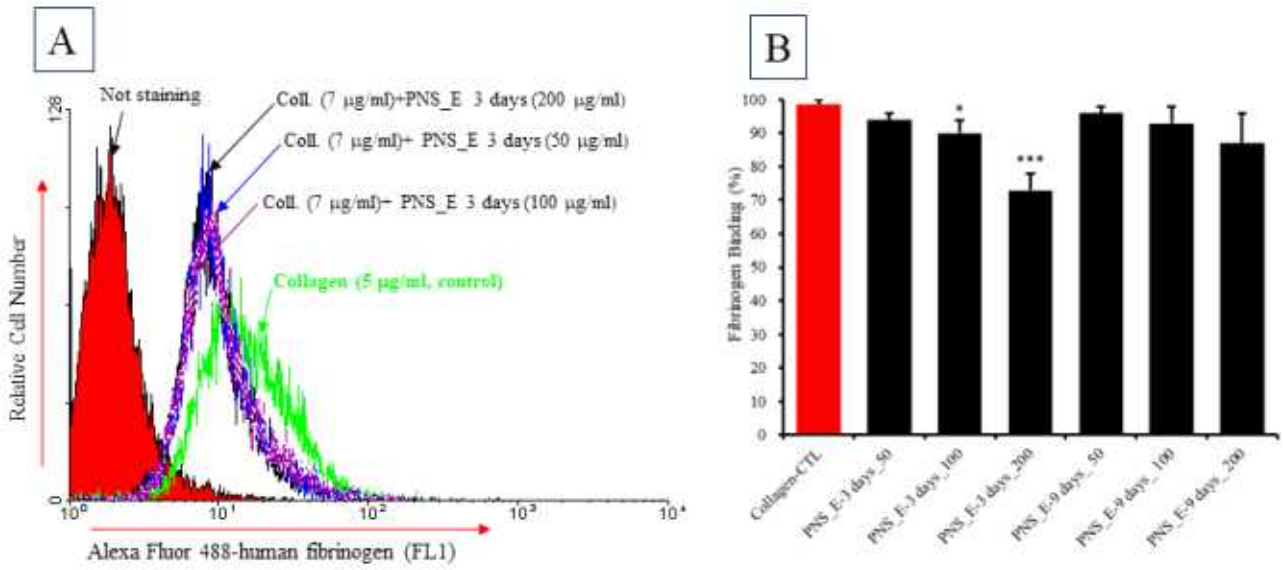


Fig. 7. PNS_E 3 days and PNS_E 9 days inhibits collagen-induced fibrinogen binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta3$.

The inhibitory effect of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days on fibrinogen binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta3$ in collagen-stimulated platelets was examined by flow cytometric analysis. Washed platelets were pretreated with PNS_E 3 days and PNS_E 9 days, and then collagen (5 ㎍/ml) was added together with Alexa Fluor 488-human fibrinogen, and the sample was incubated at 37 ℃ for 15 min. Bar graph represents summary of inhibitory effect of PNS_E 3 days and PNS_E 9 days on fibrinogen binding. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ versus control.

(바) PNS_E 3 days와 PNS_E 9 days에 의한 혈소판에서 cAMP 활성 효능 분석

Collagen은 GP VI 수용체를 결합하여 IP3 생성을 증가시켜 세포내 저장소로부터의 calcium 동원을 촉진시킨다 (Abrams, 2005). 또한 세포내 cAMP는 IP3 수용체의 저해를 통해 collagen에 의한 calcium level 증가를 억제할 수 있다 (Tertyshnikova and Fein, 1998). 혈소판이 활성화되는 과정에서 혈소판에 세포 내에 존재하던 과립 (granule)이 유리되면서 과립내에 함유되어 있던 serotonin, ADP 등이 분비되며, P-selectin이 발현되며, thromboxane A2 (TxA2)와 같은 활성 물질들이 생성된다 (Jurk and Kehrel, 2005; Rivera et al., 2009). 이들 물질들은 혈소판의 이차적인 활성화를 유도하여, 혈소판의 응집 및 혈전의 생성을 더 견고하게 하는데 큰 역할을 한다 (Offermanns, 2006; Jackson et al., 2009). 이와 더불어 혈관내피세포, 백혈구등의 다른 혈관 조직 및 세포들과의 상호작용을 유발하여 혈전 생성을 촉진시킬 수 있다 (Pakala et al., 1997; Cirillo et al., 1999; Vandendries et al., 2004; Nemmar et al., 2007). Fig. 8는 collagen 유도로 혈소판 활성화되면 혈소판응집시 cAMP 분비량 증가를 나타내는 그래프로, 전처리 과정에서 collagen으로 유도하지 않은 -0군에서는 0.48 (pmol/10^9 platelets)이었고, PNS_E 3 days 추출물은 100 ㎍/㎖ ($p<0.001$)을 처리했을 때는 4.81 (pmol/10^9 platelets)로 대조군에 비하여 유의성 있

게 증가를 나타내었고, PNS_E 9 days 추출물은 100 ㎍/㎖ ($p<0.001$)을 처리했을 때는 5.17 (pmol/10^9 platelets)로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가를 나타내었다. 전처리 과정에서 IBMX로 유도한 대조군 (IBMX-CT)에서는 4.0 (pmol/10^9 platelets)로 나타났다. IBMX에 PNS_E 3 days 추출물은 100 ㎍/㎖을 처리했을 때는 3.97 (pmol/10^9 platelets)로 대조군에 비하여 차이가 없었고, IBMX에 PNS_E 9 days 추출물은 100 ㎍/㎖을 처리했을 때는 4.66 (pmol/10^9 platelets)로 대조군과 차이가 없었다 (Fig.8). 양성대조군으로 IBMX에 아스피린 ($p<0.001$) (aspirin) 50 ㎍/ml을 처리하여 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가를 나타내었다 (Fig. 8).

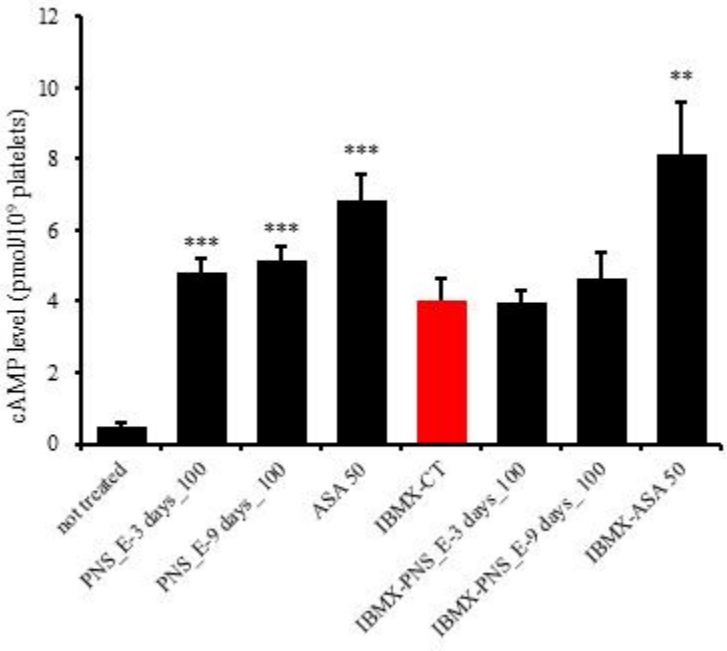


Fig. 8. elevates basal levels of cAMP activity.

Rat washed platelets were stirred either in the presence of vehicle or PNS_E 3 days and PNS_E 9 days in an aggregometer; the reaction was terminated and then cAMP enzyme immunoassays were performed. PNS_E 3 days and PNS_E 9 days (100 ㎍/ml) significantly increased cAMP accumulation in resting platelets in a dose-dependent manner. and IBMX pretreatment slightly potentiated PNS_E 3 days and PNS_E 9 days-induced cAMP elevation. Results are a summary of at least three independent experiments performed and results in bar graphs are presented as mean SEM *: $P < 0.05$ or **: $P < 0.01$ versus control.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발

-시제품 및 제품화(땅콩새싹 추출물, 땅콩새싹 냉압착오일)을 이용한 혈액순환 건강식품 상품화 개발 (임상전 단계까지) **2건〉 이상**

-매출액 : 혈액순환 건강식품 **1건**

-기타 : 특허 **3편** 출원 및 **1편** 등록, 국내,외 학술발표 **2편**, SCI급 논문 **2편**

3-2. 목표 달성여부

1. 제품화 2건 이상 달성

- 음료

- 오일

2. 논문 투고

1)

- 저널명: *International Journal of Molecular Science* (IF: 4.18) **2019**, 20, 5907-5917
- 논문명: Treatment with Peanut Sprout Root Extract Alleviates Inflammation in a Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Macrophage Cell Line by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway

2)

- 저널명: *Horticulture, Environment, and Biotechnology* (IF: 1.53 revision 중)
- 논문명: Anti-allergenic Effects of Peanut Sprouts Extract in a Systemic Anaphylaxis Food Allergy Mouse Model

Mar 18, 2020

Gung Pyo Lee, PhD, *Editor-in-Chief*

Horticulture, Environment, and Biotechnology

Dear. Dr. Gung Pyo Lee

I am excited to submit to the *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, our manuscript HEAB-D-20-00005 entitled "Anti-allergenic Effects of Peanut Sprouts Extract in a Systemic Anaphylaxis Food Allergy Mouse Model." Thank you for the opportunity to review and resubmit this manuscript.

In keeping with your suggestion, I am resubmitting this revision before the agreed deadline, March 23, 2020. I appreciate the time and detail suggestions of the Editor-in-Chief and have incorporated the suggested changes into the manuscript to the best of my ability. The manuscript has certainly benefited from these insightful revision suggestions. I look forward to working with you and the reviewers to move this manuscript closer to publication in the *Horticulture, Environment, and Biotechnology*.

Once again, thank you for your consideration in editing and reviewing my manuscript submitted to the *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, and I look forward to receiving your feedback.

1. Before going through the review process, we normally perform similarity check with previously published papers using CrossCheck whether it is over 10%.
▶ Corrections: have been made to reflect these suggestions. After further editing, the document will be submitted with the required evidence.

2. Also, the manuscript has "Abstract Issue" with Planta Med 2019; 85(18): 1386, which has DOI number (DOI: 10.1055/s-0039-3399628).
▶ Based on the reviewer's comment, changes were reserve in the manuscript.

3. And the second request is that the submission should include "English Certificate", according to the instruction for authors: if authors are non-native speakers of English, the manuscript must be accompanied by certification that they have been edited either by a professional English-language editor or by a qualified colleague (a native English speaker with expertise and experience in the editing of scientific papers).
▶ Corrections: have been made to reflect these suggestions. After further editing, the document will be submitted with the required evidence.

Thank you again for attending to our manuscript.

Sincerely,
Won-kyung Yang, PhD.
Seung-Hyung Kim, PhD.
Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University
62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea
+82-42-280-2642
+82-42-274-2600
skh518@dju.kr

3. 학술발표

1) 학술발표 1. 2019 The American Society of Pharmacognosy Annual Meeting(2019년미국생약학회)

CERTIFICATE OF PRESENTATION

This is to certify that

Seung-Hyung Kim

has presented the following at the

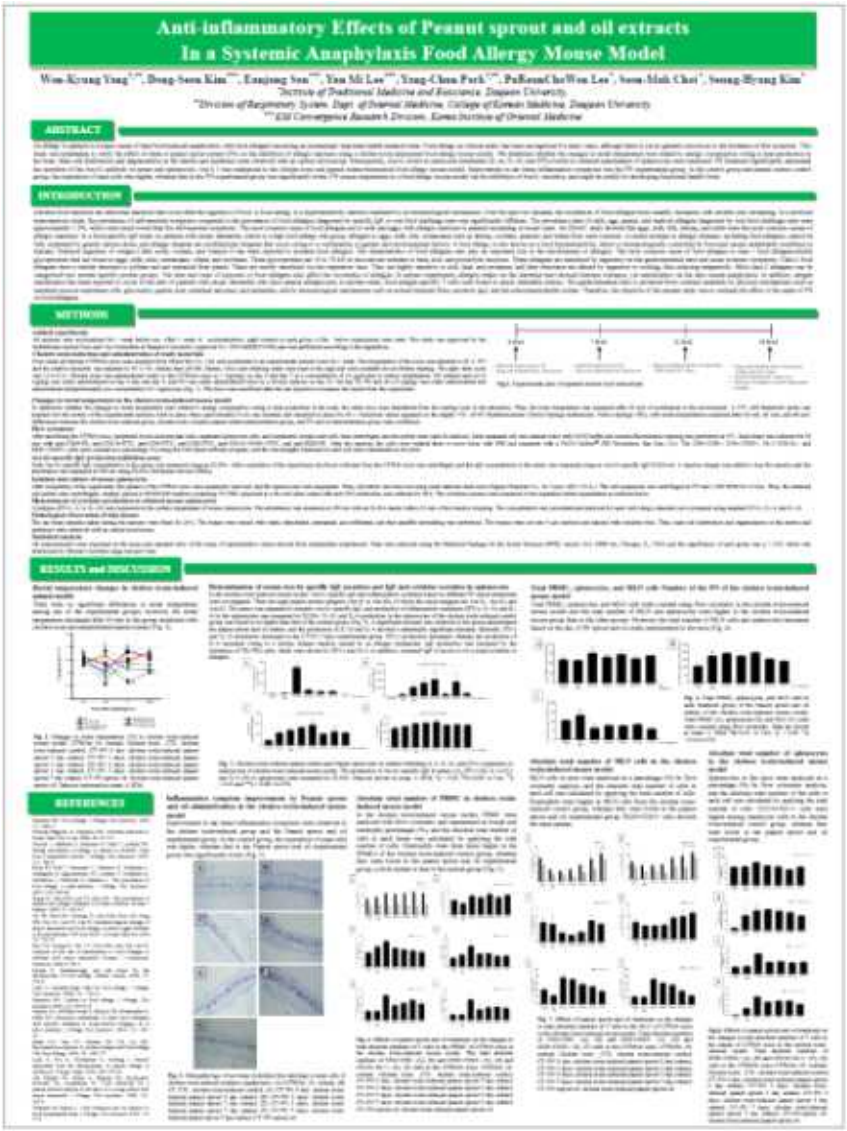
67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2019)
Innsbruck, Austria | Sep 1-5, 2019

Presentation Type: poster
P-478
Anti-allergenic Effects of Peanut sprouts Extract In a Systemic Anaphylaxis Food Allergy Mouse Model

Authors:
Seung-Hyung Kim, Won-Kyung Yang, Dong-Seon Kim, Eunjung Son, Yun Mi Lee, Da Som Lee, Hyun A Kim, Yang-Chun Park, Geung-Joo Lee,

Hermann Stuppner
Chair of the Local Organizing Committee

2) 2019년 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회


Anti-inflammatory Effects of Peanut sprout and oil extracts
In a Systemic Anaphylaxis Food Allergy Mouse Model

4. 특허 등 지적재산권

1) 특허출원 10 - 2017 - 0158136
발명의 명칭 : 발아땅콩오일의 추출방법, 오일 및 캡슐담은 오일
출원 일자 : 2017. 11. 24

2) 특허출원 10 - 2018 - 0026951
발명의 명칭 : 식물성 단백질 음료 및 그 제조방법
출원 일자 : 2018. 03. 07

3) 국제특허출원 : PCT/KR2018/014485
발명의 명칭 : 발아땅콩오일의 추출방법, 오일 및 캡슐담은 오일
출원 일자 : 2018. 11. 23

4) 등록상표 제40 - 14011150호
"새싹이든"
출원일자 : 2018. 09. 28

5) 등록상표 제40-14128696호
"리본앤딜라이트"
출원일자 : 2018. 09.28

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 기술개발 추진전략

(1) 전단계에서 확정한 항혈전 한약제제의 유효성 평가를 1차, 2차, 3차등 반복실험을 통하여 혈전 동물실험의 정확도를 높임.

(2) 임상 시험 후보의 유효성 자료를 강화하기 위하여, 한약제제 및 활성물질에 대해 실험동물 효력 자료를 강화함.

나. 기술적 측면

(1) 국내 혈전 치료제 개발 기업으로서 기술지원

(2) 항혈전 효능 물질 활용기술 개발을 통해 국제적 경쟁력을 확보

다. 경제·산업적 측면

(1) 항혈전 한약제제 및 특허 확보를 통해 로열티 수입 확보

(2) 혈전 치료제와 관련하여 막대한 수입비용 대체

(3) 천연물 원료 개발 시 관련 국내 재배산업 등의 발전

(4) 기술이전을 통해 관련 기업의 성장과 이에 따른 고용증대

라. 기술개발결과의 활용분야 및 활용방안

(1) 혈행개선에 좋은 일반 식품 사업 전개(음료 및 오일)

(2) 호흡기 질환 관련 제품에 대한 원료의 사업화

(3) 항혈전 효능 물질을 이용한 의약품의 개발

(4) 지적 재산권 선점으로 기술이전을 통한 기술 경상료 수입

붙임. 참고문헌

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 1980;55:434-438.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 2002;346:1221-1231.
3. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Dig Dis 2010;28:155-161.
4. Browning JD. Statins and hepatic steatosis: perspectives from the dallas heart study. Hepatology 2006;44:466-471.
5. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study.Hepatology 2005;42:44-52.
6. Park SH, Jeon WK, Kim SH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. J Gastroenterol Hepatol 2006;21:138-143.
7. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. Hepatology 1990;12:1106-1110
8. Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH. Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. J Pediatr 2000;136:727-733.
9. Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. Dig Dis Sci 1995;40: 2002-2009.
10. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. Pediatrics 2006;118:1388-1393.
11. Schwimmer JB, McGreal N, Deutsch R, Finegold MJ, Lavine JE. Influence of gender, race, and ethnicity on suspected fatty liver in obese adolescents. Pediatrics 2005;115:e561-565.
12. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2002;122:1649-1657.
13. Shimizu I, Inoue H, Yano M, et al. Estrogen receptor levels and lipid peroxidation in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. Liver 2001;21:342-349.
14. Petersen KF, Dufour S, Feng J, et al. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103: 18273-18277.
15. Abrams CS (2005) Intracellular signaling in platelets. *Curr Opin Hematol* **12**:401-405.
16. Adlercreutz H (2002) Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* **3**:364-373.

17. Agnelli G and Verso M (2011) Management of venous thromboembolism in patients with cancer. *J Thromb Haemost* **9 Suppl 1**:316-324.
18. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S and Itakura Y (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* **131**:955S-962S.
19. Amin A, Stemkowski S, Lin J and Yang G (2007) Thromboprophylaxis rates in US medical centers: success or failure? *J Thromb Haemost* **5**:1610-1616.
20. Andrews RK and Berndt MC (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* **114**:447-453.
21. Anthony MS, Clarkson TB and Williams JK (1998) Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* **68**:1390S-1393S.
22. Antithrombotic Trialists C (2002) Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* **324**:71-86.
23. Antithrombotic Trialists C, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC and Zanchetti A (2009) Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* **373**:1849-1860.
24. Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA, Watson SP and Heemskerk JW (2005) Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *FASEB J* **19**:825-827.
25. Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B and Gibbins JM (2008) Future innovations in antiplatelet therapies. *Br J Pharmacol* **154**:918-939.
26. Baum JA, Teng H, Erdman JW, Jr., Weigel RM, Klein BP, Persky VW, Freels S, Surya P, Bakhit RM, Ramos E, Shay NF and Potter SM (1998) Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell lowdensity-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **68**:545-551.
27. Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G and Brown DL (2006) Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* **295**:306-313.
28. Bhathena SJ and Velasquez MT (2002) Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* **76**:1191-1201.

29. Bhatt DL, Hirsch AT, Ringleb PA, Hacke W and Topol EJ (2000) Reduction in the need for hospitalization for recurrent ischemic events and bleeding with clopidogrel instead of aspirin. CAPRIE investigators. *Am Heart J* **140**:67-73.
30. Bhatt DL and Topol EJ (2003) Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2**:15-28.
31. Booze CD and Serebruany VL (2006) The action of dipyridamole to prevent thrombosis: practical implications for the treatment and prevention of stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **8**:221-227.
32. Briggs WH, Folts JD, Osman HE and Goldman IL (2001) Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. *J Nutr* **131**:2619-2622.
33. Calderwood DA (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* **117**:657-666.
34. Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC and McQuaid KR and Laine L (2006) Systematic review and meta-analysis of adverse events of low-dose aspirin and clopidogrel in randomized controlled trials. *Am J Med* **119**:624-638.
35. Meadows TA and Bhatt DL (2007) Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* **100**:1261-1275.
36. Messina M (2010) A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J Nutr* **140**:1350S-1354S.
37. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003) Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* **133**:1238-1243.
38. Michelson AD (2008) P2Y12 antagonism: promises and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:s33-38.
39. Michelson AD (2010) Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **9**:154-169.
40. Minamino T, Kitakaze M, Asanuma H, Tomiyama Y, Shiraga M, Sato H, Ueda Y, Funaya H, Kuzuya T, Matsuzawa Y and Hori M (1998) Endogenous adenosine inhibits P-selectin-dependent formation of coronary thromboemboli during hypoperfusion in dogs. *J Clin Invest* **101**:1643-1653.
41. Morel O, Kessler L, Ohlmann P and Bareiss P (2010) Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis. *Atherosclerosis* **212**:367-376.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) A crop for a special purpose in mass production structure construct through fog agricultural techniques and a high value creat using effective component</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">(주)리본인터내셔널</td><td rowspan="2">주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속)(주)리본인터내셔널</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">한국한의학 연구원
대전대학교 산학협력관</td><td colspan="2">(성명)안 종 식</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비

(
700,000천원)</td><td>계</td><td></td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2017. 08. 30 ~ 2019. 12. 31</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>525,000</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>14명</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>175,000</td><td>내부인원</td><td>5명</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>9명</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발
 -시제품 및 제품화(땅콩새싹 추출물, 땅콩새싹 냉압착오일)을 이용한 혈액순환 건강식품 상품화 개발 완료
2. 새싹 땅콩 식품 안전성 확보
 - 식품알러지 반응 연구 및 알러지 프리 확인

3. 새싹 땅콩 대량 체계 확립
 - 신규 재배 장비를 통한 모듈화 및 표준 생산 체계 확립
 - 모듈 장비의 완정성을 통한 대량 생산 체계 확립

4. 논문 2건, 학술대회 2건 이상, 특허 2건 및 상표 2건 출원 및 등록 완료

○ 연구내용 및 결과

사업 진행을 위한 새싹땅콩 원료 생산체계를 구축하였으며, 새싹땅콩 추출물의 항혈전 효과 및 항염 효과의 유의성 있는 결과를 얻어 내었다.

또한, 식품의 안전성 확보를 위하여 새싹땅콩의 식품알러지 테스트 결과, 알러지에서 프리한 새싹땅콩 제품 개발이 가능함에 대한 결과치를 얻게 되었다.

더불어, 새싹땅콩 추출물 형태로 생산한 두유 제품을 이용하여 치매환자 대상으로 MMSE 테스트 결과 인지능력 개선에 대한 효과가 있음을 입증해 내었다.

이런 일련의 과정과 더불어 2건의 논문 투고와 학술 발표, 그리고 지적재산권 확보를 위한 절차를 수행/완료하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

항혈전 및 항염 효과에 좋은 두유 제품을 개발하였으며, 불포화지방산이 탁월한 오일 제품을 개발하였다. 상기 제품의 사업화를 위하여 새싹땅콩 원료의 대량생산 체계 안정화와 HACCP 시설에서의 제품 생산 및 온라인 마케팅을 주로 한 사업화에 박차를 가할 예정이다.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호			817036-3	
사업구분	농림부 자유응모과제				
연구분야				과제구분	단위
사 업 명	기술사업화 지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관				연구책임자	
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.08 ~2017.12	75,000	25,000	100,000
	2차연도	2018.01~2018.12	225,000	75,000	300,000
	3차연도	2019.01~2019.12	225,000	75,000	300,000
	4차연도				
	5차연도				
	계				
참여기업					
상 대 국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)리본인터내셔널	대표이사	안 종 식

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	

Ⅰ. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

<우수>
• 새싹땅콩의 기능성 확보
• 새싹땅콩의 대량생산체계 확보
• 기능성이 확보된 음료 및 오일 가공제품 개발
• 항혈전 효과가 있는 새싹땅콩 원료 개발

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

<우수>
• 새싹땅콩이라는 신규 작물 발굴 및 보급화 가능
• 새싹땅콩으로부터 기능성 성분의 정제를 통한 바이오 소재로의 개발 및 활용
• 해외시장에서의 가능성

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

<우수>
• 농가소득 향상 기여 : 땅콩새싹 재배 및 활용 분야 확대로 농가 부가가치 향상
• 시장 활성화 : 안전성과 강력한 효과를 바탕으로 한 즉각적인 상품화 시장
• 제품적용 확대 : 강력한 효능을 바탕으로 한 개별인정형 원료소재화 제품 확대
• 예방식의약품 산업 질 향상 : 기능식품 제시 가능 및 성인병 경계성 조기 예방 기여
• 국민의 건강 및 삶의 질 향상 : 안전성이 확보된 부작용 우려 없는 제품 제시

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

<우수>
회사의 어려움에도 불구하고 끝까지 새싹땅콩의 대량생산 체계 확보를 완료하였으며, 음료 디자인부터 개발까지 결과물을 만들어 내었음.
또한, 참여기관의 항혈전 효과 및 식품 알러지 반응에 대한 다양한 테스트가 시도되었으며, 그의 결과로 논문 2편을 투고하였음.

목표 계획 및 목표 달성도 측면에서 우수한 결과를 가져옴.(90% 이상)

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

<우수>
• 논문 2건 투고
• 특허 출원 3건(PCT 국제출원 1건 포함) 및 등록상표 2건
• 학술발표 총 4건

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
혈액순환 식품 2건 개발 (비임상전 단계까지)	50	100	대중성 있는 식품 2건 개발 완료 (맛, 영양성분 등 Lab Test 및 제품화)
국내 KCI 및 국제 SCI급 논문 2편	20	100	논문 2건 투고 완료
국내 KCI 및 국제 KCI급 학술발표 2편	10	100	학술발표 총 4편
특허 3편 출원 및 1편 등록	20	90	음료 및 오일 특허 출원 완료 브랜드가치 향상을 위한 상표 2건 등록 완료
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

신규 작물 보급화를 통한 농가 소득 향상에 기여할 수 있는 생산체계를 구축하였고, 항혈전 효과를 갖는 대중성 있는 식품을 발굴함으로써 시장활성화 및 추후 제품에 대한 방향성을 설정할 수 있었음.
국내 시장뿐만 아니라 해외 시장의 적극 공략을 통해 사업화의 발판을 삼을 수 있는 토대를 마련하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

새싹땅콩 재배를 위한 재배모듈의 다양화 및 이를 통한 여러 작물 재배로의 확대가 가능.
작물재배를 통한 농가 소득 창출에 기여할 뿐만 아니라, 작물의 원료화를 통해 기능성이 있는 대중화 제품을 발굴함으로써 예방의학 시장을 선점해 나아갈 것임.
또한, 해당 연구 과제를 통해 향후 개별인정 원료로의 발전을 이루어 나아갈 것임.

Ⅳ. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제		분 야	
연 구 과 제 명	스마트팜 안개재배법을 이용한 땅콩새싹으로부터 혈액순환 건강식품 개발			
주관연구기관	(주)리본인터내셔널		주관연구책임자	안 종 식
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	525,000,000	175,000,000		
연구개발기간	2017.08.30. ~ 2019.12.31.			
주요활용유형	□산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 ■기타(직접 사업화) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 혈액순환 식품 2건 개발(비임상전 단계까지)	100% 달성
② 국내 KCI 및 국제 SCI급 논문 2편	100% 달성
③ 국내 KCI 및 국제 KCI급 학술발표 2편	100% 달성
④ 특허 3편 출원 및 1편 등록	특허 2건 및 국제특허 1건(조약우선권 주장 출원) 등록상표 2건 90% 달성

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용 등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	

단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	10	10				40	5	5	10					5	5				5	5
최종목표	3	1				2	1,000	1,000	5			2		1.0	2				2	3
연구기간내 달성실적	3					2						2		1.0	4				1	1
달성율(%)	100%					100%						100%		100%	100%				50%	33%

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	새싹땅콩 재배 표준화 기술 및 대량생산 체계 구축
②	원물 가공을 통한 제품 개발 방법 및 레시피 확보
③	
· · ·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	V	V				V				
②의 기술	V	V				V				
③의 기술										
· ·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	선진화 재배 기술 공유 및 농가 수익 창출
②의 기술	건강 식품 개발 및 보급을 통해 예방 의학 시장 선점
③의 기술	
· ·	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

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			
가중치	10	10				40	5	5	10					5	5				5	5
최종목표	3	1				2	1,000	1,000	5			2		1.0	2				2	3
연구기간내 달성실적	3					2						2		1.0	4				1	1
연구종료후 성과창출 계획							1,000 이상	1,000 이상	10 명 이상											

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명[1]			
이전형태	□무상 □유상	기술료 예정액	천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기[3]	
기술이전시 선행조건[4]			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원 사업의 연구보고서입니다.

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

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