

116084-3

보안 과제(), 일반 과제(●) / 공개(●), 비공개()발간등록번호()
농생명산업기술개발 사업 제3차 연도 최종 보고서

발간 등록 번호

11-1543000-002605-01

**과
제
명**

과제명 GABA 기반의 경구용 자돈 빈혈 예방 제품 개발
최종보고서

**GABA
기반의
경구용
자돈
빈혈
예방
제품
개발**

2019. 2. 12.

주관연구기관 / 미래생명자원(주)
협동연구기관 / 건국대학교

**최
종
보
고
서**

2018

농
림
축
산
식
품
부

I
P
E
T

**농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원**

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “GABA 기반의 경구용 자돈 빈혈예방 제품 개발”(개발기간 : 2016.09.05. ~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 2. 12.

주관연구기관명 : (주)미래생명자원 김 성 진 (인)
협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단장 송 창 선 (인)

주관연구책임자 : 한 종 권
협동연구책임자 : 오 재 욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116084-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05.- 2018.12.31	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명				
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	GABA 기반의 경구용 자돈 빈혈예방 제품 개발			
연구책임자	한 종 권	해당단계 참여연구원 수	총: 14명 내부: 14명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 14명 내부: 14명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:560,000천원 민간:187,000천원 계:747,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안과제 해당사항 없음
----------------------	--------------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호	1	1									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

1. 자돈은 출산 후 3주령에는 약 4배의 크기로 증체되며, 이처럼 생리적으로 체중 증가 속도는 빠르는데 비하여 혈액 내의 적혈구 수가 증가되지 못하여 생후 3주령이 되면 예외없이 생리적인 빈혈이 초래되며, 이를 방치하면 식욕부진, 황달, 위축, 설사 등으로 생산성에 지대한 악영향을 미친다.
2. 본 과제에의 목표는 GABA와 철 (Fe)의 생체이용성 증대 기술을 통하여 포유 모돈 및 자돈의 사료에 공급함으로써 이유자돈의 빈혈을 예방하는 경구용 제품 개발에 목표를 두고 있다.
3. 대형 발효조를 이용한 GABA 생산 최적조건 확립
4. 돼지 세포에서 Pig EPO 발현과 EPO-Receptor 발현 정도 각각 Screening 완료.
5. 우선 양돈 농가 및 배합사료 회사를 상대로 하는 경구용 자돈 빈혈 예방 제품을 판매하고자 하며, 이 경우 직접적인 타겟 시장은 50억원 정도로 추산되는 철분 주사제를 대체하는 시장이 될 것이다. 본 제품의 경우, 추가적인 기대 효과로서 자돈의 체중 증가로 인한 돼지 생산성 증가가 가능하여 돼지 생산성 향상을 위한 추가적인 시장 형성이 가능할 것으로 예상된다.
6. 지속적인 추가 연구·개발을 통하여 질병 예방·치료가 가능한 항생제 대체제, 성장 촉진 사료첨가제 등의 지속적인 제품개발을 진행하고자 한다.
7. GABA 생산공정의 원가절감을 통하여 지속적인 GABA 시장 확대 (특히 축산분야)를 도모하고자 한다.

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 자돈은 출산 후 3주령에는 약 4배의 크기로 증체되며, 이처럼 생리적으로 체중 증가 속도는 빠르는데 비하여 혈액 내의 적혈구 수가 증가되지 못하여 생후 3주령이 되면 예외없이 생리적인 빈혈이 초래되며, 이를 방지하면 식욕부진, 황달, 위축, 설사 등으로 생산성에 지대한 악영향을 미친다.</p> <p>2. 본 연구팀은 다년간 GABA를 이용한 <i>in vivo</i> 실험 연구를 하면서 gamma-Aminobutyric acid (GABA)의 포유모돈 섭취가 erythropoietin (EPO) 생성을 촉진하고, 포유자돈에게도 EPO가 증가한다는 결과를 여러 차례 확인하였을 뿐 아니라 Rat을 이용한 실험에서도 적혈구수와 EPO의 수치가 증가하는 것을 확인하였다.</p> <p>3. 본 과제의 목표는 GABA와 철 (Fe)의 생체이용성 증대 기술을 통하여 포유 모돈 및 자돈의 사료에 공급함으로써 이유자돈의 빈혈을 예방하는 경구용 제품 개발에 목표를 두고 있다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>1. 대형 발효조를 이용한 GABA 생산 최적조건 확립</p> <p>2. In vivo 실험내에 GABA 급여에 인한 EPO 증가 확인 및 HEP 3B cell line에서의 GABA의 세포 독성(cytotoxicity) 확인</p> <p>3. 돼지 세포에서 Pig EPO 발현과 EPO-Receptor 발현 정도 각각 Screening 완료.</p> <p>4. Erythropoietin이 돼지세포에 미치는 영향 Screening 완료.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 우선 양돈 농가 및 배합사료 회사를 상대로 하는 경구용 자돈 빈혈 예방 제품을 판매하고자 하며, 이 경우 직접적인 타겟 시장은 50억원 정도로 추산되는 철분 주사제를 대체하는 시장이 될 것이다. 본 제품의 경우, 추가적인 기대 효과로서 자돈의 체중 증가로 인한 돼지 생산성 증가가 가능하여 돼지 생산성 향상을 위한 추가적인 시장 형성이 가능할 것으로 예상된다.</p> <p>2. 전 세계적으로 돼지의 사육 두수는 약 12억두 이상으로 추정된다(2004년 FAO). 따라서 중국, 베트남, 러시아, 브라질 등 주요 양돈 활성 국가를 대상으로 수출을 추진할 예정이다.</p> <p>3. 본 과제를 통하여 주요 요인별 빈혈에 대한 효능 및 작용 기전 연구를 통하여 인체용 빈혈 예방 혹은 치료제 개발을 위한 기반을 구축하고자 한다.</p> <p>4. 지속적인 추가 연구·개발을 통하여 질병 예방·치료가 가능한 항생제 대체제, 성장 촉진 사료첨가제 등의 지속적인 제품개발을 진행하고자 한다.</p> <p>5. GABA 생산공정의 원가절감을 통하여 지속적인 GABA 시장 확대 (특히 축산분야)를 도모하고자 한다.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	가바	에리스로포이에 틴	빈혈	경구용	철분 생체이용성
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	GABA	Erythropoietin	Anemia	Oral	iron bioavailability

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	10
2. 연구수행 내용 및 결과	16
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	77
4. 연구결과의 활용 계획 등	80

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

<뒷면지>

주 의

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

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 이유자돈 시기의 중요성

‘갓 이유한 자돈의 사료섭취는 평생 중 가장 긴 하루’ 라고 표현될 정도로 이유 자돈의 사료 섭취는 출하 시까지 기간 중 가장 중요한 시기이며 사료섭취가 충분하지 못하게 되면 출하 체중에서 큰 차이를 나타낸다. 이유자돈 시기의 스트레스가 자돈 발육 정체의 주원인이지만 양돈 사육기술의 과학화로 현저하게 개선되었다. 하지만, 여전히 발육 정체가 일어나는 원인들이 남아있으며, 크게 주사 스트레스, 체지방 감소, 소화기능 저하, 면역력 저하, 빈혈 등이 있는데, 특히 빈혈은 예외 없이 모든 이유자돈에서 일어나는 생리적 현상이다.

자돈의 체중은 급속하게 증량되어 출산 시에는 1.0 ~ 1.5kg 정도에 지나지 않지만 1주일만 되어도 2배, 3주령에는 약 4백의 크기로 증체된다. 이처럼 생리적으로 체중증가 속도는 빠르는데 비하여 혈액내의 적혈구 수가 증가되지 못하여 생후 3주령이 되면 생리적인 빈혈을 초래한다. 이를 방지하면 식욕부진, 황달, 위축, 설사 등으로 생산성에 지대한 악영향을 미친다.

○ 이유자돈의 철분 부족

이유자돈의 철분 부족 현상은 다음과 같다. 포유 시 자돈은 1~3주일 경에 피부의 창백, 호흡수 증가, 원기 소실 등과 같은 빈혈 증상을 일으키면서 발육저하가 발생하고, 설사가 동반되면서 심해지면 폐사하기도 한다.

신생 자돈의 철분 요구량은 생후 3주간 제2가 철로서 300mg 정도가 필요한데 젖이나 사료, 흙 등을 통하여 120mg 정도를 흡수하고 나머지 180mg은 별도로 보충을 해주어야하며, 농가에서는 대부분 3일령과 10일령 각 2회 구분하여 주사하고 있다. 국내 및 국외 대부분의 농가에서 철분주사제의 필수성에 의해 주사제를 사용하고 있으나, 그 부작용의 위험은 여전히 존재하고 있다.

이유자돈 철분 필요량(mg)	300
신생자돈 체내 철분량	50
모유 및 사료, 기타	70
주사제 철분량	180

1-2. 연구개발의 필요성

○ 철분주사제의 부작용

국외와 국내 양돈 사육에서 이유자돈의 철분공급은 거의 95%이상 철분주사제를 사용하고 있으며, 마치 철분주사 이외에는 다른 방법이 없는 것으로 인식되어 인력과 시간, 금액 투자, 주사제의 위험성을 무릅쓰고 철분주사제를 사용하고 있다. 하지만, 철분주사제는 분명한 문제점과 주의해야 할 부분들이 존재하고, 큰 경제적 손실로 이어질 수 있다.

돼지의 비타민 E, 셀레늄 결핍증은 심근의 변성, 간의 괴사, 골격근의 변성 등을 유발하여 주로



급성장하는 어린자돈의 갑작스런 폐사를 일으킨다. 이 결핍증이 있는 자돈에 철분주사의 투여 시

동일한 근변성을 일으키며, 심장근육의 변성으로 인해 심장마비로 급사가 발생하는 이른바 철분쇼크가 발생한다. 그 이유는 비타민E와 셀레늄이 결핍된 상태에서 철분주사를 맞게 되면 철분대사가 원활히 이뤄지지 못해 주사한 철분이 체내로 흡수되지 않고 독이 되어 다리 근육이 검붉게 괴사되고 다리를 절며, 결국 철분중독으로 인해 폐사하게 된다.

즉 이유 자돈의 빈혈 예방을 위해서는 단순한 철분 공급 뿐만 아니라 철분 대사가 원활히 이루어 질 수 있도록 생체 내 환경을 만들어 주는 것은 반드시 필요하다.

1-3. 연구개발 범위

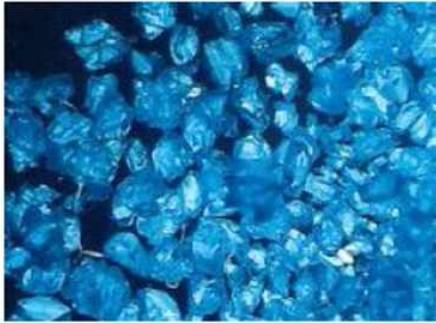
○ 철분 생체 이용성 증가 solution

1) 유기태 철 (B-TRAXIM®)

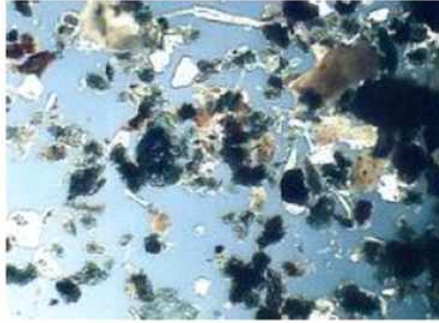
모든 사료 내에 유기태 미네랄은 높은 생체이용성 (bioavailability)으로 바로 젖과 혈액 내에 미네랄 수준을 증가시키고 동시에 철분의 일일 요구량 극복에 중요하다. 유기태 미네랄은 알려진 바와 같이 무기태 미네랄에 비해 생물학적 활성이 높고 혈액 샘플 당 철분이 125~185% 정도로 측정되고 있으며 이것은 철분이 바로 젖으로 이전될 수 있는 가능성을 의미한다. 갓 난 돼지에 있어서 철분은 태어난 당일에 주사 또는 젖을 통해 얻게 되며, 철분의 젖으로의 이전은 갓 난 돼지의 피부색을 개선시키는데 중요하다. Lactoferrin이라는 Fe-binding Glycoprotein은 우유 내에 다량 포함되어 있다.

이유 전 갓 난 돼지와 모든 포유기간 동안 철분의 공급은 매우 중요하다 이 기간의 갓 난 돼지 사료 내에 유기태 미네랄 (B-TRAXIM)을 공급함으로써 높은 수준의 생물학적 활성을 가진 철분 성분이 이유 전 갓 난 돼지의 사료 섭취율이 떨어짐에도 불구하고 red skin을 나타냈으며 외부 저항력도 강해졌다.

본 연구에서 사용할 유기태 미네랄 B-TRAXIM-Fe®은 glycine과 Fe이 1:1의 비율로 결합된 착화합물 형태의 유기태 미네랄이며, 단순한 섭취, 흡수수준에서 벗어난 가축 체 내에서의 고유한 기능 발현을 통한 이용성까지 고려된 특화된 철분제이다. 무기태 철이나 일반 유기태 철과는 달리 분자량이 낮고 용해성이 우수하여 낮은 pH 환경에서 안정하므로 장 전체에서 효과적으로 흡수 및 이용 (흡수율 약 5.2배 vs 무기태 철)된다. 또한, 각각의 초미립자에 미네랄과 아미노산이 균일하게 함유되어 있어 사료 배합 시 이상적인 배합도와 분산력을 지닌 유기태 철이다.



B-TRAXIM 유기태 철 ^{x50}
Crystalline 구조



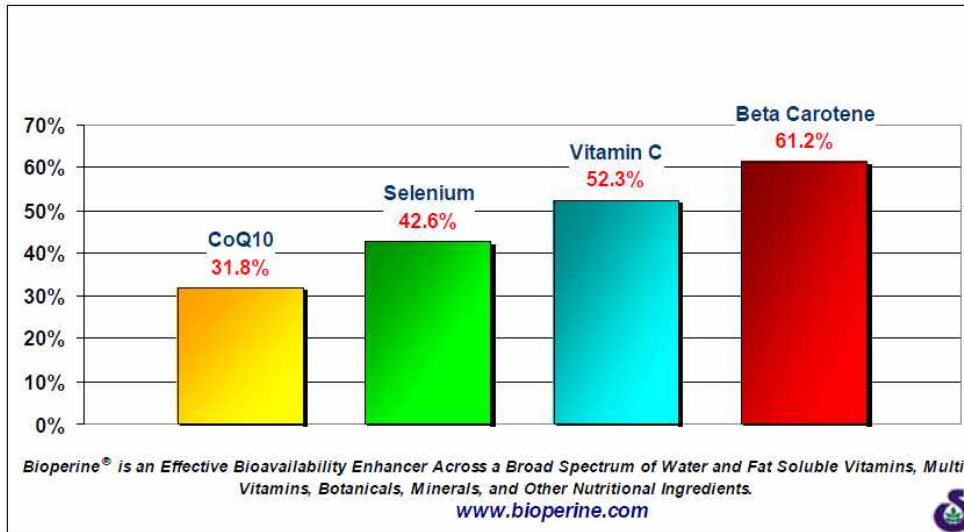
무기태 철
Amorphous 구조

2) Piperine

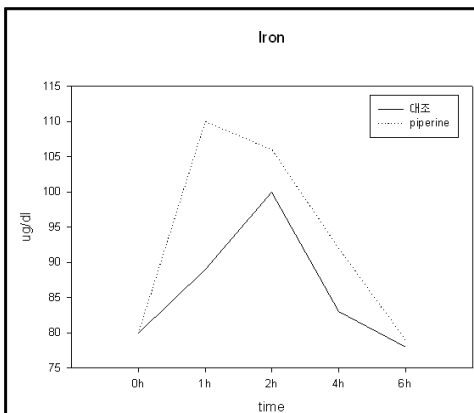
Piperine은 향신료로 많이 사용되는 흑 후추 (*Piper nigrum*)의 활성성분으로 약간의 매운맛을 갖는 물질이며, 항산화효과, 위액분비 촉진, 장속의 가스 제거 등의 효능이 알려져 있고 간세포 보호, 류마티스 관절염 완화, 비만억제, 유방암, 대장암, 폐암 등의 항암효과 등이 보고되고 있다. 또한, piperine은 아래 표와 같이 여러 물질들을 흡수하며 그 외에도 많은 물질들의 흡수를 촉진시킨다. Piperine의 역할은 유기태 철의 체내 흡수를 촉진시키는 역할도 있지만, EPO의 생성을 촉진하는 아미노산 계열의 GABA를 흡수촉진하여 Erythropoiesis booster로서도 매우 중요한 물질이라고 할 수 있다.

본 연구과제에서 Piperine의 중요한 역할은 유효성분들의 흡수율과 이용률을 증진시킨다는 것이며, 관련 문헌들이 다수 발표되었다.

흡수 물질	논문 제목	발간 저널
Curcumin	Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers.	Planta Med. 1998.
Polyphenol	Piperine Enhances the Bioavailability of the Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate in Mice	J. Nutr. 2004.
beta-carotene	Piperine, an Alkaloid derived from Black pepper increases serum response of Beta- Carotene during 14-Days of Oral Beta Carotene Supplementation	Nutrition Research.
CoQ10	Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation.	J. Nutr. Biochem. 2000.



Piperine의 흡수촉진 물질들에는 수용성 비타민, 지용성 비타민, 항산화제, 아미노산, 미네랄 등이 있으며, 이 중 Fe, Ca, Zn, Se 등 trace mineral의 흡수를 증진시킨다. 주관기관인 (주)미래자원ML에서는 육계 실험을 통하여 piperine이 철 (Fe)의 생체이용률을 증가시킨다는 사실을 실험을 통하여 규명한 바 있다.



(그림) piperine 에 의한 육계에서의 철분 흡수 증가 (자체 실험)

○ γ -aminobutyric acid (GABA) 기반의 erythropoietin (EPO) 증감제

GABA는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 동물의 경우 뇌, 신장, 심장, 폐 등에서 발견되며 식물의 경우 발아 현미, 녹차 등에서 많이 검출되고 있다. GABA는 억제성 신경전달물질로서 중추신경계 신경전달물질 중 약 30%를 차지하며 다른 신경전달물질에 비하여 약 200-1,000배의 고농도로 존재한다. GABA는 혈압상승 억제, 시력증진, 항불안, 항경련 등 인체에 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있고, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며 통증완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 주목받는 물질이다.

GABA는 세계적으로도 식품소재로서 1980년대 중반부터 이용되기 시작하였으며, 2001년경부터 본격적으로 시장을 형성하기 시작한 소재이다. GABA는 4개의 탄소로 구성되어 있고, glutamate decarboxylase (GAD)의 L-glutamate의 탈탄산 반응에 의해 CO₂와 함께 생성되며, pyridoxal-5'-phosphate dependent 경로로 합성되는 것으로 알려져 있다.

주관기관인 (주)미래자원ML 신소재연구소에서는 다년간 GABA 이용한 *in vivo* 실험 연구를 진행하면서 GABA가 EPO 생성을 촉진하는 결과를 여러 차례 확인하였다. 또한, EPO 증가 뿐 만 아니라 적혈구에서도 그 수가 증가하는 것을 확인하였다. Rat을 이용한 GABA의 음수첨가 실험에서 3주간 섭취시켰을 때 GABA 첨가군에서 유의적인 EPO 증가를 확인하였고, 나아가 적혈구 수치도 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 유전자 발현분석과 Western blot을 이용한 단백질 발현 분석에서도 GABA 섭취 시, EPO 생성 유전자와 EPO-Receptor의 유전자의 발현과 그에 따른 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 실험동물의 신장 조직에서 immunofluorescence microscopy 검경 결과, 눈에 띄는 EPO와 EPO-Receptor의 발현 증가를 확인하였다.

또한, 양돈 실험에서도 GABA 섭취 시 혈액분석결과에서 유의한 EPO 증가를 확인하였다. 이유자돈, 포유 모돈, 육성돈 세 가지 시기별 양돈에게 GABA를 사료에 50ppm 첨가 시, 모든 시험군에서 EPO의 유의적인 증가를 확인하였으며, 그 외에도 사료 효율이 개선되는 결과를 얻을 수 있었다.

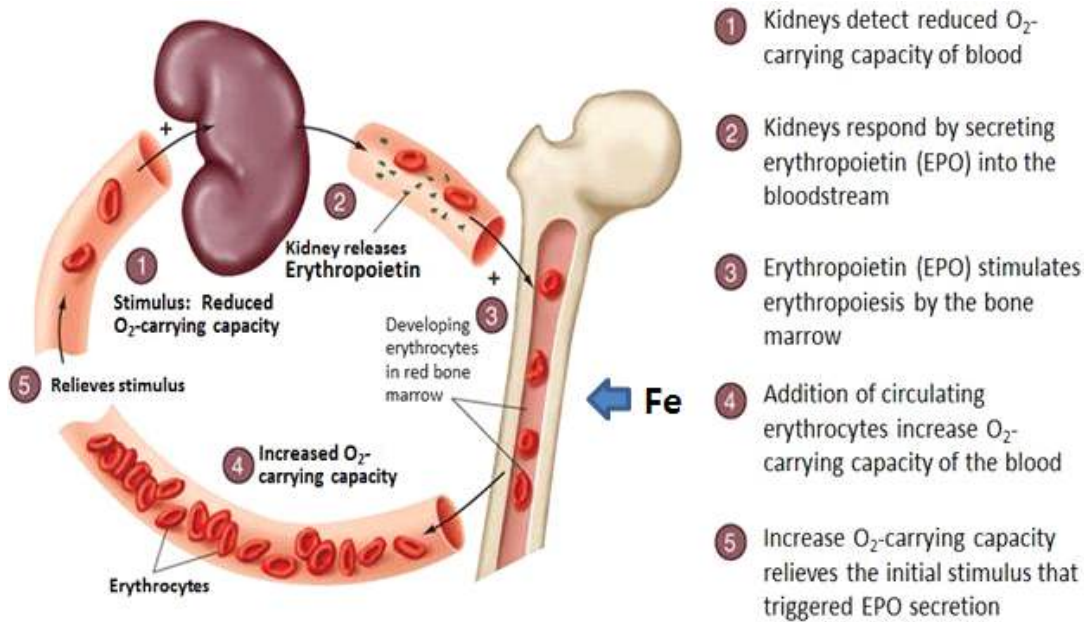
※ Erythropoietin (EPO)

EPO란 사람의 신장에서 주로 생성되는 조혈인자로서 적혈구 계열 전구세포의 성장 및 분화를 촉진시켜 성숙한 적혈구의 생성을 도와주는 역할을 하는 호르몬이며, 전 세계 인구 5%에 해당하는 신부전증 유래의 빈혈환자 뿐 아니라 자가 수혈, 항암제 투여 및 AIDS 치료 시의 빈혈 치료를 위하여 사용되는 의약품이다.

EPO는 만성신부전 환자에서 신기능 감소속도를 완화시키며 그 작용 기전은 다음과 같다.

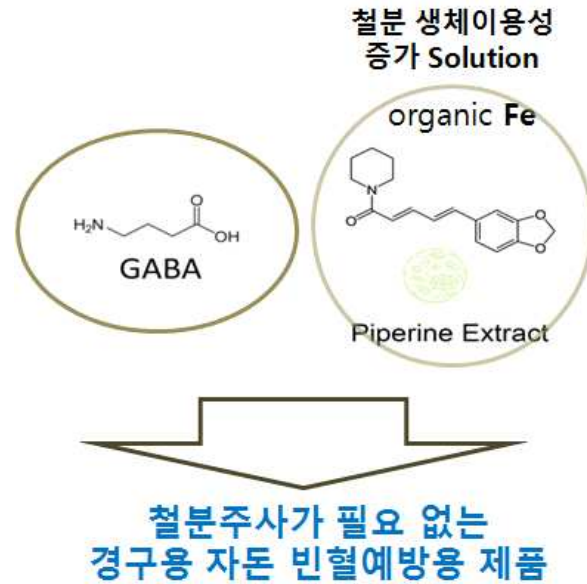
- 1) 빈혈의 교정에 의한 저산소증의 완화로 세포외 기질의 생성을 감소시키고 nephron 소실을 방지
- 2) 산화성 스트레스의 감소로 간질섬유화와 상피세포의 파괴를 완화
- 3) Apoptosis를 억제하여 직접적인 신장피세포 보호기능
- 4) Proangiogenic 효과로 interstitial capillary network를 보호. 미세순환에서 EPO는 vascular endothelial growth factor 만큼 강력한 역가로 혈관생성을 매개.

EPO는 세계 바이오시밀러 시장에서 가장 크게 연구 및 개발되고 있는 제제이며, 1g에 67만 달러에 거래되는 초고가의 의약품 성분이다.



(그림) EPO의 조혈작용 모식도

- 이미 거의 모든 양돈농장에서 시행하고 있는 철분주사제의 효과는 인정되고 있으며, 당연하게 사용되고 있다. 본 과제에서 사용될 제제들의 경구투여가 빈혈예방 제제이지만, 근육주사로 철분을 투여하는 것 만큼의 혈중 철분 농도를 유지하는 것이 불가능 할 것이라 예상된다. 하지만, 양돈전문가를 통한 조사에 의하면 갓 태어난 새끼 돼지의 가장 큰 스트레스는 철분주사제 스트레스라고 하였다. 따라서, 본 과제의 GABA, piperine, 유기태 철의 혼합 제제가 철분주사제 만큼의 탁월한 빈혈예방제제의 목표는 아니며, 새끼돼지의 미세한 빈혈을 일으킬 수 있으나 단시간에 회복하고 주사에 대한 스트레스로부터 자유롭게 하고자 한다.
- 본 과제에 목표는 GABA의 EPO 증가 효능과 유기태 철 및 철분 흡수증진 제제 등의 철분 생체이용성 (bioavailability) 증가 solution을 이용하여, 적용 단계는 임신돈, 포유모돈, 이유자돈의 사료 혹은 음수에 첨가하는 경구용 자돈 빈혈 예방 제품의 개발이다.



2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 수행내용 - 미래생명자원

1) 용혈성 빈혈 rat 모델에서 GABA의 조혈기능 연구

가) 배경

일반 환경 실험에서 GABA가 조혈에 미치는 영향을 SD rat을 이용하여 규명하였다. 따라서, 이어지는 연구과제로 빈혈모델 동물을 제작하여 GABA와 piperine, 유기태 철분의 영향을 분석하였다.

인체에서 빈혈은 혈액이 조직에 필요한 산소를 충분히 공급하지 못하는 것으로 적혈구 또는 헤모글로빈의 결핍으로 정의된다. erythropoietin (EPO)란 사람의 신장에서 주로 생성되는 것으로 적혈구 계열 전구세포의 성장 및 분화를 촉진시켜 성숙한 적혈구의 생성을 도와주는 역할을 하는 호르몬으로써 전 세계 인구 5%에 해당하는 신부전증, 빈혈관자 뿐 아니라 자사수혈, 항암제투여 및 AIDS의 치료에까지 쓰이는 의약품이다.

본 연구에서는, rat의 꼬리정맥을 통해 phenylhydrazine을 투여하여 용혈성 빈혈을 유도하고, GABA를 투여함으로써 적혈구 생성 조혈인자의 erythropoietin의 생성 증진을 기대하고 있으며, erythropoiesis 관련 유전자 및 단백질 발현 등을 분석하였다.

나) 방법

사용한 동물의 종은 rat이며 4주령 수컷을 사용하였다. 그룹 당 8마리를 진행하였으며 고려대학교 동물윤리위원회에 요청 내용에 따라 윤리적으로 실험을 진행하였다.

GABA의 투여량은 0.5mg, 1mg, 2mg/100g body, day의 용량으로 2주간 투여하였으며, 실험 종료 4일 전부터 phenylhydrazine을 10mg/100g body으로 복강주사 하였다. 실험에 사용한 마취제는 CO₂가스를 사용하여 윤리적으로 희생시켰다.

실험 그룹은 대조군(NC), 양성대조군(PC), GABA 0.5mg/100g body 투여군(G5), GABA 1.0mg/100g body 투여군(G1), GABA 2mg/100g body 투여군(G2), 무기태 철분 30ppm 투여군 (IO), 유기태 철분 30ppm 투여군(O)으로 나누었다.

다) 결과

다)-1 혈청 내 철분 함량 및 철분대사 관련 지표

	Iron (ug/dL)	UIBC (ug/dL)	TIBC (ug/dL)	Erythropoietin (mlU/mL)
NC	237.1	371.6	609.0	52.1
PC	213.1	412.6	625.8	48.8
G0.5	237.5	405.9	643.3	54.8
G1	243.5	395.1	638.6	52.0
G2	229.7	403.1	632.7	55.6
IO	212.9	421.1	633.9	53.0
O	208.1	396.9	605.0	56.6

→ 2주간 GABA를 그룹별 차등을 두어 경구투여하고, 종료 4일전 phenylhydrazine을 매일 복강주사 하여 용혈성 빈혈을 유도하였다. 실험 종료 후 채혈을 하여 Iron, UIBC, TIBC, EPO 수치를 측정하였다.

혈청 내 철분 분석 결과 NC 그룹에서 237.1ug/dL (이하 단위 삭제) 이었으나 PC 에서는 213.1로 철분 농도가 10% 정도 감소하였다. 하지만 G0.5 그룹에서는 237.5, G1에서는 243.5, G2에서는 229로 PC 그룹에 비해 월등히 증가하였다. 또한, EPO 수치에서는 NC 그룹에서 52.1이었으며, PC에서는 48.8로 약 6.3%가 감소하였다. 하지만 G0.5, G1, G2 그룹에서는 각각 54.8, 52.0, 55.6으로 모든 GABA 투여군에서 다시 증가하는 수치를 확인하였다. GABA를 투여한 그룹 뿐만 아니라 유기태 철과 무기태 철분을 급여한 그룹에서도 EPO의 수치가 회복되었다. 본 결과 용혈성 빈혈 모델에서 phenylhydrazine 복강주사 후 용혈된 혈액 내 철분이 소실되었을 거라 예상되며, 그 외 GABA를 투여한 그룹에서 철분수치가 회복된 것으로 보아 용혈된 혈액 외에 새로운 조혈작용이 있을거라 예상되며, 이 조혈작용 중 철분이 결합되어 혈액 내 철분수치가 상승한 것으로 예상된다.

다)-2 적혈구 분석 및 적혈구 index

	RBC	Hgb	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT	MPV
NC	7.86	15.59	49.03	62.34	19.80	31.79	9.56	906.57	9.13
PC	6.63	16.06	50.51	76.76	24.28	31.80	18.11	734.63	10.21
G5	6.32	15.58	49.59	78.58	24.69	31.41	18.08	731.13	10.59
G10	6.37	15.64	49.90	78.48	24.61	31.38	18.19	769.75	10.09
G20	6.33	15.67	44.65	78.40	24.75	31.56	18.82	776.09	10.36
IO	6.43	15.66	49.50	77.08	24.39	31.64	18.15	761.88	10.43
O	6.39	15.60	49.06	76.54	153.00	31.84	18.03	677.14	10.01

→ 적혈구 분석 결과 정상 개체에서는 7.86으로 각 주령에 맞는 수치가 확인되었다. 하지만 빈혈유도를 한 그룹에서는 6.63으로 약 16%가 감소하여 빈혈이 유도된 것을 확인하였다. Phenylhydrazine을 복강주사하여 용혈성 빈혈을 유도한 그룹들의 개체를 모니터링 한 결과 공통적으로 혈뇨를 배출하였고, 약간의 고통을 동반한 움직임이 포착되었다. 그 후에 GABA를 포함한 유효물질을 투여한 그룹에서 적혈구의 수치가 회복되는 것은 확인되지 않았다. 또한, MCV가 NC에 비해 나머지 투여군에서 모두 유의하게 증가한 것으로 보아 적혈구의 부피만 증가하고 적혈구의 수가 감소하는 전형적인 빈혈의 특징을 보여주었다. 이외의 적혈구 index에서도 유의할 만한 차이는 나타나지 않았다.

다)-3 백혈구 differential counts

	WBC	NE	LY	MO	EO	BA
NC	11.03	9.46	85.70	3.33	0.47	0.36
PC	8.01	13.01	81.79	3.86	0.65	0.26
G5	7.69	10.85	85.38	2.51	0.46	0.35
G10	9.22	8.84	87.02	2.81	0.40	0.34
G20	8.62	14.80	80.79	3.04	0.41	0.32
IO	7.90	12.41	83.09	3.11	0.53	0.28
O	8.08	10.14	85.50	2.73	0.79	0.33

→백혈구 counts 결과 역시 NC에서 11.03이었으나 PC에서 8.01로 유의하게 감소하였다(-27%). 적혈구 수치의 패턴과 마찬가지로 백혈구 수치가 회복되지는 않았다.

라) 고찰

본 실험 결과 용혈성 빈혈을 유도한 상태에서 EPO의 증가는 확인하였으나 GABA 및 기타 철분제제의 적혈구 수치 회복은 확인 할 수 없었다. GABA의 최초 목적은 EPO의 증가 확인 및 조혈기능 촉진이었으나, 용혈성 빈혈유도 과정에서 과도한 용혈이 유도되어 유효물질들의 효과를 확인하지 못하였다. 반복적인 실험을 통해 적절한 빈혈 유도 및 GABA의 적정 투여량을 선택하여야 한다. 하지만 여러차례 실험이 필요하고, 용혈성 빈혈모델 보다 추후 계획으로 잡혀있는 철결핍성 빈혈 모델과 저산소 환경 노출 실험이 더 중요하다고 판단되었다. 따라서, 용혈성 빈혈 모델에서도 GABA 투여시에 EPO가 증가하는 것을 확인하였고, 다음 빈혈모델 실험을 진행하였다.

2)철결핍성 마우스 모델에서 GABA의 조혈 기능 및 유기태 철분의 효능 연구

가) 배경

본 철결핍성 마우스 모델 실험은 mouse purified diet 내에 철분을 1/10로 결핍시켜 철결핍성 빈혈을 유도하고, GABA 및 유기태 철분, 무기태 철분을 급여함으로써, 적혈구 생성 조절인자의 erythropoietin의 생성 중진을 기대하고 있으며, erythropoiesis 관련 유전자 분석 등을 실시할 예정이다.

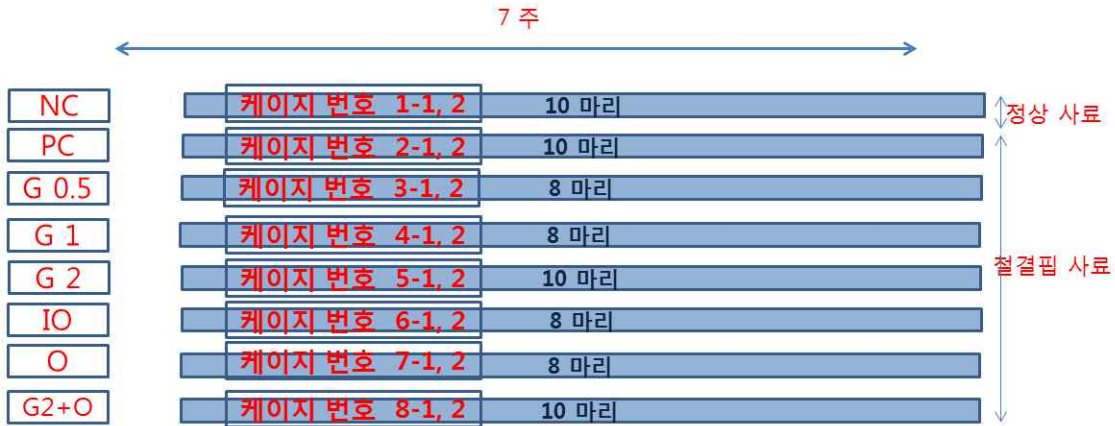
나) 방법

→사용한 동물의 종은 마우스이며 3주령 수컷을 사용하였다. 그룹당 8마리를 진행하였으며 고려대학교 동물윤리위원회에 요청 내용에 따라 윤리적으로 실험을 진행하였다.

→실험 그룹은 대조군(NC), 양성대조군(PC), GABA 0.5mg/100g body 투여군(G5), GABA 1.0mg/100g body 투여군(G1), GABA 2mg/100g body 투여군(G2), 무기태 철분 투여군 (IO), 유기태 철분 투여군(O)으로 나누었다(실험 그룹은 용혈성 빈혈 모델 실험과 동일).

→기간은 7주간 진행하였으며 NC그룹은 정상사료를 급여하였고, 나머지 그룹은 철분 함량이 1/10으로 감소된 철분결핍사료를 급여하였다. 철분 결핍사료의 철분 함량은 4.5ppm이며 정상 사료의 철분함량은 45ppm이었다. 철분은 무기태, 유기태 철분 모두 4mg/100 body weight/ day로 하루 1회 경구투여하였다. piperine은 NC와 PC 그룹을 제외한 모든 그룹에 9ug/day 을 경구투여하였다. 실험 설계시 piperine 투여 그룹을 따로 분리하여 진행하여야 하지만, 동물윤리위원회의 지적 및 통과불과에 따라 부득이하게 모든 그룹에 첨가하여 실시하였다. G2+O 그룹은 G2 그룹에 유기태 철분을 투여한 그룹으로 연구과제의 최종 제제의 주요물질을 합제한 그룹이다.

→그룹 중 NC, PC, G2, G2+O 그룹의 마릿수가 10마리씩 (두 마리 추가) 넣은 이유는 실험 중간에 철결핍성 빈혈이 유도되었는지 확인하기 위해서이다. 총 실험 기간은 7주 였으며, 4주차가 종료되는 시점에 위 네 그룹에서 2마리씩 희생하여 철분 및 혈구분석을 실시하여 철결핍성 빈혈 유무를 확인하였다.



정상 사료 철 함량: 45ppm
 철 결핍사료 철 함량: 4.5ppm
 유기태, 무기태 철 투여량: 40mg/kg/d
 G1 : GABA 1mg/100g/d

Piperine 3ppm 사료 : 마우스 4주령, 무게 20g, 사료 3g 섭취/day
 3ppm은 3ug/g. 따라서, 3g 사료 섭취에는 9ug 첨가. 하루에 9ug씩 주사
GABA : 0.5, 1, 2mg/100g BW/day
Fe : 4mg/100g BW/day
Male C57BL/6

다. 결과

다)-1 빈혈 유도 예비실험 결과 (그룹당 2마리, NC, PC, G2, G2+O)

	Iron	TIBC
	(ug/dL)	(ug/dL)
NC	300	638
PC	121	693
G2	158	618
G2+O	336	619

→ 분석결과 NC는 300ug/dL 였으나 빈혈유도그룹은 121로 약 60%가 감소하여 철결핍성 빈혈유도가 적절히 이루어진 것을 확인하였다. G2 그룹에서는 158로 증가하여 PC에 비해 약 30% 정도 철분 함량이 증가하였다. 한편, GABA와 유기태 철분 합체 그룹인 G2+O 에서는 336으로 정상사료를 섭취한 NC보다도 약 12%가 증가하였다.

본 결과는 마릿수가 매우 적은 데이터이며, 빈혈이 유도되는 것을 확인하기 위한 예비실험일 뿐이다. 하지만, 유기태 철분을 급여한 그룹의 철분함량이 NC보다도 높은 수치가 분석된 것은 매우 고무적이다.

다)-2. 철결핍성 빈혈유도 마우스 내 철분 함량

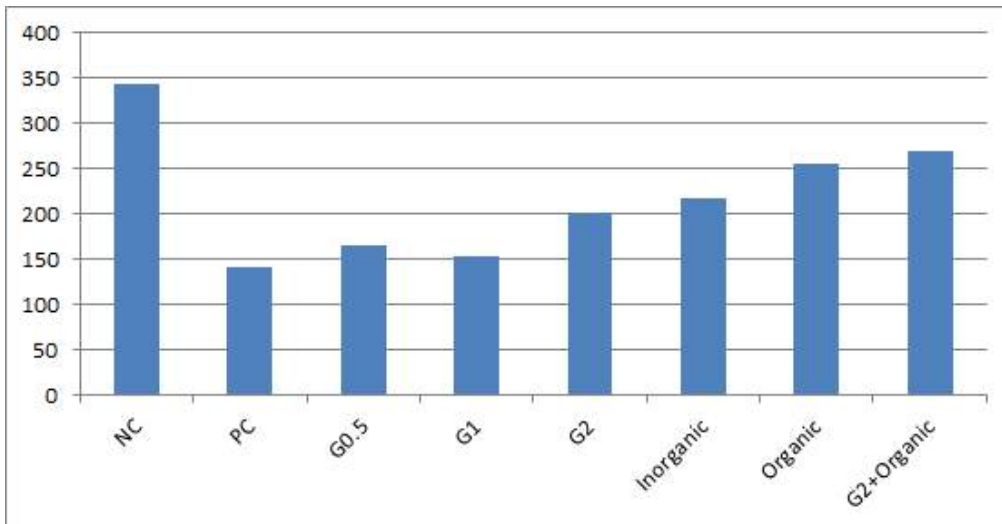
I.D(환자명)	Iron	TIBC	I.D(환자명)	Iron	TIBC
	(ug/dL)	(ug/dL)		(ug/dL)	(ug/dL)
NC1	301	726	PC1	193	1146
NC2	407	1765	PC2	160	989
NC3	399	1322	PC3	115	655
NC4	255	770	PC4	97	638
NC5	268	969	PC5	147	969
NC6	357	1196	PC6	135	890
NC7	396	1248	PC7	155	847
NC8	375	1368	PC8	143	874
G2-1	164	860	IO-1	227	713
G2-2	193	697	IO-2	210	722
G2-3	248	775	IO-3	257	735
G2-4	231	714	IO-4	224	698
G2-5	241	758	IO-5	174	785
G2-6	184	811	IO-6	222	667
G2-7	196	786	IO-7	196	697
G2-8	180	826	IO-8	234	722

I.D(환자명)	Iron	TIBC	I.D(환자명)	Iron	TIBC
	(ug/dL)	(ug/dL)		(ug/dL)	(ug/dL)
G0.5-1	158	627	G1-1	168	651
G0.5-2	174	1120	G1-2	174	638
G0.5-3	171	754	G1-3	158	701
G0.5-4	148	689	G1-4	152	637
G0.5-5	168	806	G1-5	167	662
G0.5-6	164	859	G1-6	174	731
G0.5-7	174	809	G1-7	151	758
G0.5-8	159	774	G1-8	169	701
O-1	276	960	G2+O-1	289	680
O-2	268	804	G2+O-2	271	811
O-3	275	571	G2+O-3	259	732
O-4	224	720	G2+O-4	267	743
O-5	241	950	G2+O-5	271	685
O-6	259	845	G2+O-6	284	758
O-7	239	863	G2+O-7	274	724
O-8	257	802	G2+O-8	243	804

	Iron (ug/dL)	TIBC (ug/dL)
NC	344	1171
PC	142	876
G0.5	165	805
G1	153	685
G2	202	778
Inorganic Fe	218	717
Organic Fe	255	814
G2+Organic Fe	270	742

→철결핍 사료를 급여한 마우스에 GABA 및 유기태, 무기태 철분을 급여한 후 혈청 내 철분 함량을 측정하였다. NC에서 344, PC에서 142로 철결핍성 빈혈이 유도된 것을 확인 할 수 있었다. GABA 그룹에서는 PC 그룹에 비해 철분함량이 다소 증가하는 경향을 확인하였다. G2 그룹에서는 유의하게 철분함량이 증가하였다. 유기태 철분 급여 그룹인 O그룹도 역시 무기태 철분 급여 그룹인 IO에 비해 철분함량이 약 17% 증가하였다. 철분함량이 가장 높은 그룹은 유기태 철분과 GABA를 동시 급여한 G2+O 그룹이었다. 본 실험 결과는 예비실험 결과와 가장 큰 차이점은 철분제 투여 그룹이 NC 보다 낮게 측정된 것인데 이는 철분의 구강투여 후 채혈시기에 따른 차이라고 예상된다. 철분의 구강 투여 이후 1시간에서 2시간 이후에 채혈을 하면 예비실험과 같은 결과가 나오지만, 본 실험에서는 해부 전날 철분 구강투여를 하고, 해부 당일에는 구강투여를 하지 않는다. 또한, 해부 실험의 universal protocol에 따르면 해부 전날 밤부터 over night으로 절식을 시키기 때문에 철분투여를 한 후 약 12시간은 지난 상태이다. 따라서, 위와 같은 분석결과나 나왔다고 예상된다.

본 수치를 그래프로 작성하면 다음과 같다.



→본 그래프에서 보면 철결핍성 빈혈이 유도된 후 GABA 투여시 철분함량이 증가하는 경향을 보이며, 무기태 철분 보다 유기태 철분을 섭취했을 때 더 높은 수치의 혈중 철분수치를 확인 할 수 있었다. 또한, GABA와 유기태 철분을 함께 투여했을 경우 가장 높은 철분수치를 나타내었다.

본 결과로 볼 때 GABA를 투여시 혈중 철분 수치가 증가한 것에 대해 추가적인 분석이 필요하다. 먼저 생각해 볼 것은, 매우 유리한 결과 이지만 추후 어떤 이유에서 GABA가 철분흡수를 증가시키는지 필요하다. 또한, 매우 유력한 예상으로는 함께 투여된 piperine의 영향이 있을 거라 예상된다. Piperine은 갈슘, CoQ10, 기타 영양소의 흡수를 증가시킬 뿐 아니라 철분 등 미네랄의 흡수도 증가시킨 다는 여러 연구보고가 있다.

→따라서, 본 실험 결과 GABA로 촉진된 EPO 상승 및 그로인한 조혈기능 촉진, 유기태 철분의 혈중 철분흡수 증대, piperine의 철분흡수 booster 역할의 조화가 적절히 이루어졌다고 예상된다.

다)-3 혈구분석 결과

	RBC	Hgb	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT
NC	9.91	14.78	54.28	54.78	14.90	27.25	13.35	1106.50
PC	10.51	12.08	49.63	47.88	11.50	24.03	16.55	1551.00
G0.5	10.63	13.05	51.43	48.53	12.33	25.38	13.90	1043.50
G1	11.39	13.71	54.43	47.83	12.03	25.17	14.27	1247.00
G2	11.55	13.63	54.90	47.75	11.85	24.83	14.28	1084.50
IO	11.01	12.30	59.60	54.10	14.60	27.10	13.30	957.00
O	10.89	15.53	57.83	37.47	14.27	26.87	12.70	1117.33
G2+O	10.65	15.63	59.50	55.85	14.68	26.28	13.33	1079.75

→적혈구 분석결과 Hb의 수치는 철 결핍성 빈혈유도군인 PC에서 현저하게 감소하여 빈혈유발을 확인하였다. GABA 투여군에서는 NC 그룹에 동일한 정도의 수치는 보이지 못하였으나 점차 증가하는 추세를 확인하였다. 또한, 무기태 철분 그룹은 Hb 회복성이 가장 떨어졌으나, 유기태 철분 그룹은 NC보다도 높은 Hb 수치를 보였다. 가장 고무적인 결과는 G2+O 그룹에서 유의적으로 가장 높은 수치를 확인하였다. 이 결과는 혈중 철분 수치와 매우 유기적으로 연결된 결과라고 볼 수 있다

다)-4 간 조직 내 철분 함량 분석 (AAS)

	mg/kg
NC	63.95
PC	33.3
G2	36.1
IO	98.15
O	142
O+G2	165.8

시험 성적서



한국과학기술연구원
특성분석센터

주소: (우)02792 서울특별시 성북구 동암로 14길6
전화: 02-958-5969, 4949 팩스: 02-958-5969
http://aao.kist.re.kr

성적서번호 :

1706S0149

접수번호	1706S0149	의뢰일자	2017-06-13
의뢰자	박근태	연락처	—
기관명	(주)미래자원업엘		
주소	서울 송파구 방이동 24-3 7층 미래자원		
시료설명			
시험기간	2017-07-18 ~ 2017-07-26		
시험방법/ 분석장비	한국과학기술연구원 자체 방법 / AAS		
시험결과	결과 별첨		

*시험결과에 사용된 샘플의 무게는 의뢰인이 직접 무게를 측정하여 보내준 값을 이용함

확인	주 성 자 성 명 : 김나래	기술책임자 성 명 : 박경수
----	-----------------------------	-----------------------

- 가) 본 성적서의 시험결과에 의뢰자가 제시한 시료에만 한정됩니다.
나) 본 시험성적서는 광고, 선전, 홍보 및 법적쟁송의 수단으로 사용할 수 없습니다.
다) 본 성적서 진위확인이 필요하신 경우, Tel. 02-958-4949로 연락주시면 확인하여 드립니다.

2017. 07. 26.

한국과학기술연구원 특성분석센터장



→ 혈중 내 철분수치를 반영하는 또 다른 지표로 간 조직 내 철분 침착정도를 볼 수 있다. 간 조직 내 철분 수치는 GABA와 PC 그룹 간에 차이는 없었다. 하지만 유기태, 무기태 철분의 수치는 혈중 철분 수치와 Hb의 수치의 경향과 일치하는 결과이며, 간조직 철분 침착 수치는 비율로 봤을 때 위의 두 결과보다 더 증가된 수치였다.

다)-5 비장 조직 내 ferritin immunostain

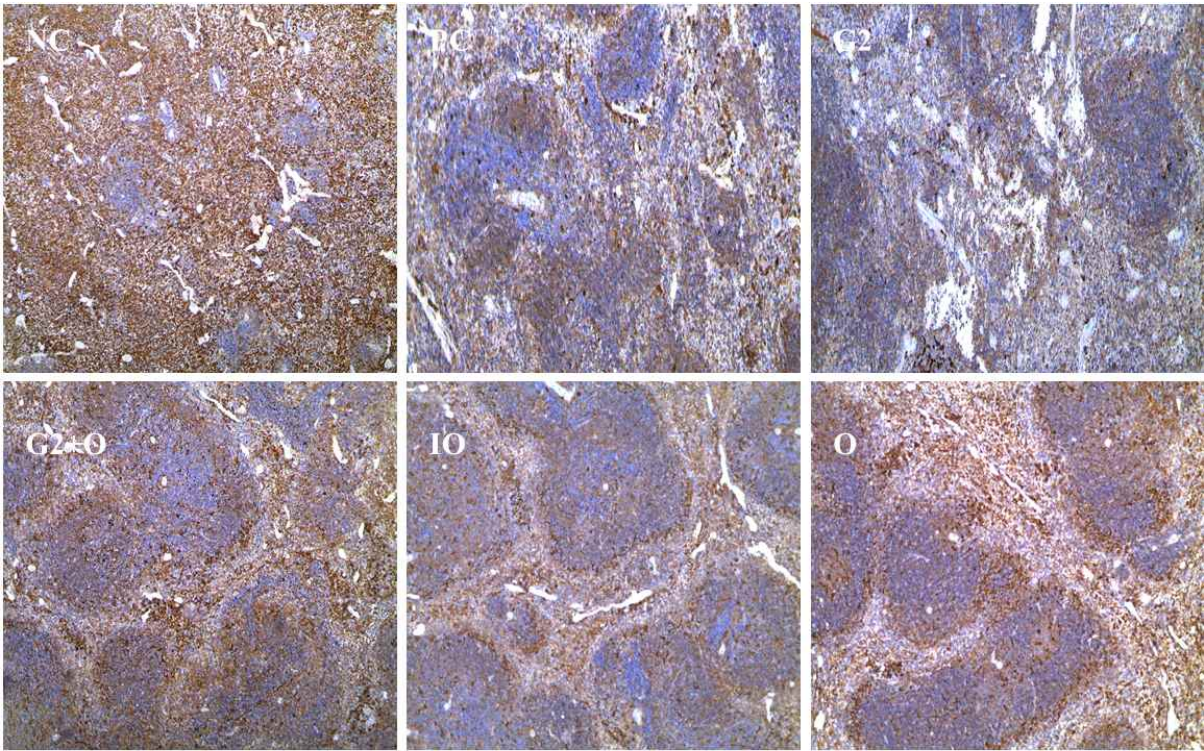


Fig. Ferritin storage in the spleen of mice(C57BL/6). Brown colored spots is ferritin, All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control(Iron content of diet are 45ppm), PC: Iron-deficient anemia(Iron content of diet are 4.5ppm), G2: GABA(2mg/100g BW/day), IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G2+O: GABA(2mg/100g) + Organic

→ 1차 Ab을 ferritin을 사용하여 면역염색을 실시하였다. Ferritin에 부착된 2차 Ab은 DAB를 사용하였고, 본 figure에 나타난 색상을 갈색이다. 현재까지 결과와 마찬가지로 우수한 ferritin 발현을 확인 할 수 있었다.

다)-6 간 조직 H&E stain

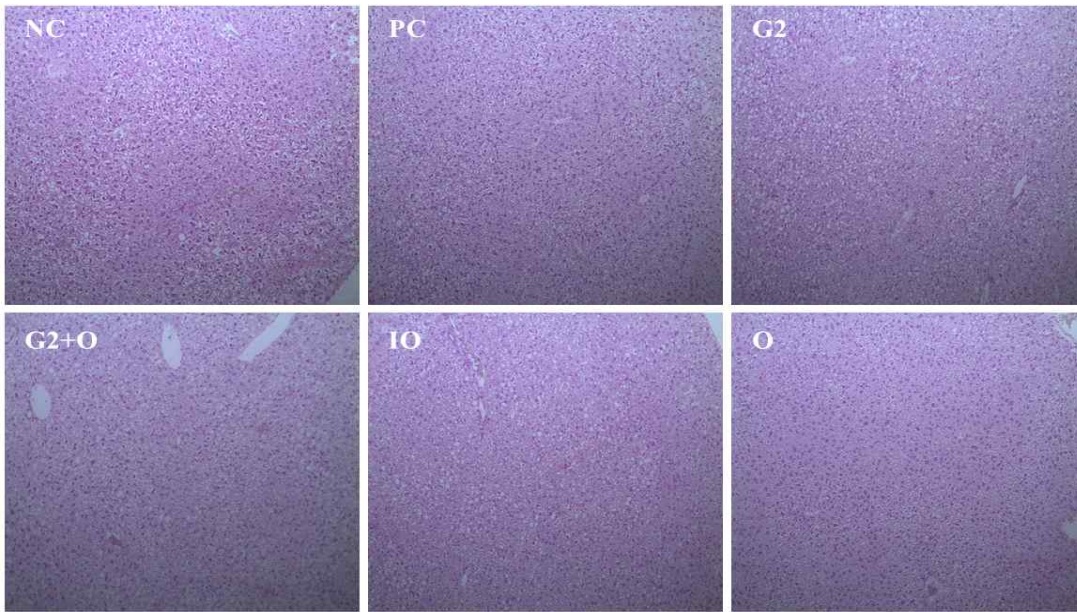


Fig. H&E Stained sections from livers of 3-month-old mice (C57BL/6). All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control(Iron content of diet are 45ppm) , PC: Iron-deficient anemia(Iron content of diet are 4.5ppm), G2: GABA(2mg/100g BW/day), IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G2+O: GABA(2mg/100g BW/day) + Organic Iron.

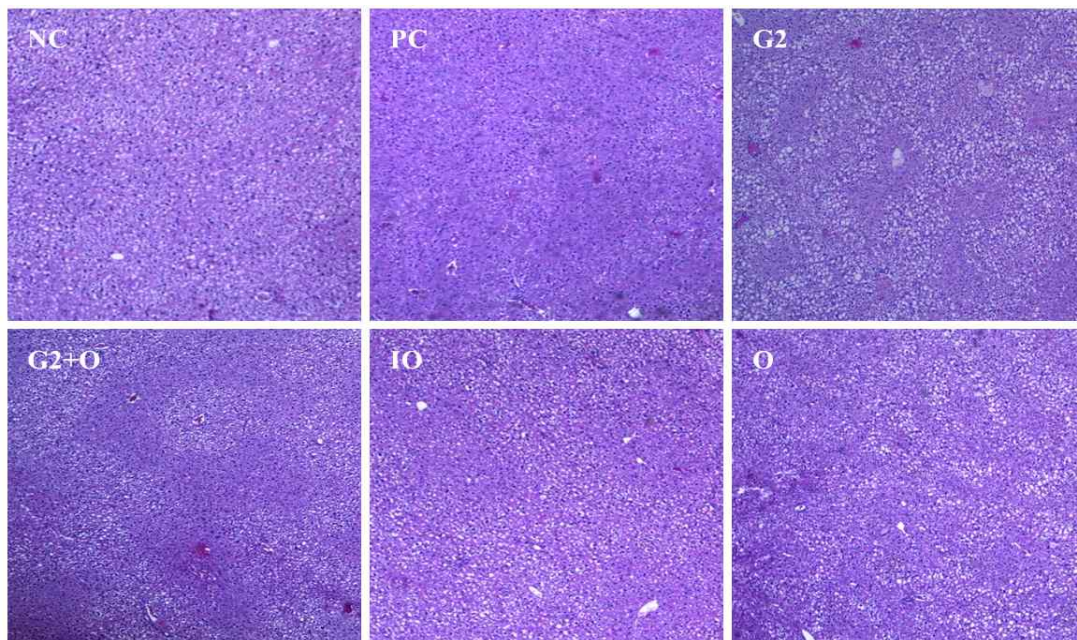


Fig. H&E Stained sections from livers of 3-month-old mice (C57BL/6). All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control(Iron content of diet are 45ppm) , PC: Iron-deficient anemia(Iron content of diet are 4.5ppm), G2: GABA(2mg/100g BW/day), IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G2+O: GABA(2mg/100g BW/day) + Organic Iron.

→ 본 연구에 사용된 동물 투여물질이 마우스의 간독성을 평가하고자 간 조직 H&E stain을 실시하였다. 검경 결과 어떠한 염증, 괴사 등 임상적인 소견은 확인되지 않았다.

다)-7 비장 조직 H&E stain

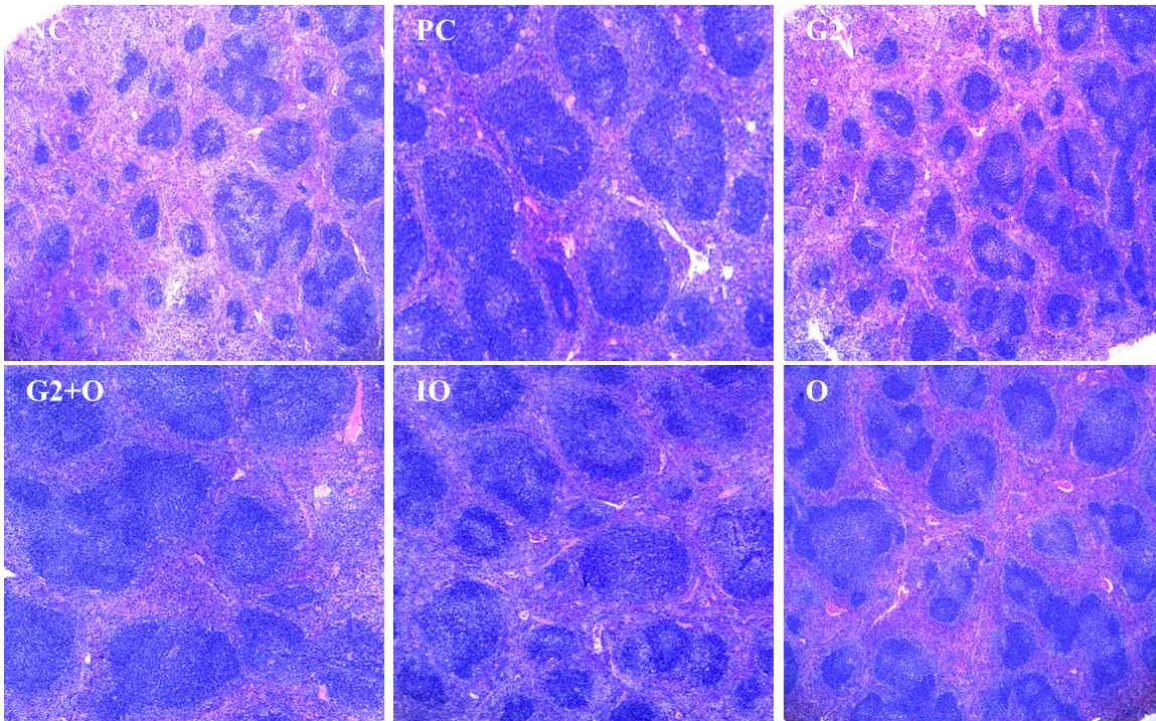


Fig. H&E Staining of spleen from C57BL/6 mice. All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control(Iron content of diet are 45ppm), PC: Iron-deficient anemia(Iron content of diet are 4.5ppm), G2: GABA(2mg/100g BW/day), IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G2+O: GABA(2mg/100g BW/day) + Organic Iron.

→ 비장 조직을 H&E stain 한 결과 특이할 만한 소견을 보이지 않았다.

다)-7 무게 변화 측정

Duration -months	NC	PC	G0.5	G1	G2	IO	O	G2+IO
1	25.59±2.	28.32±2.0	27.91±3.4	26.9±1.14	25.23±2.4	24.4±0.63	25.47±1.8	25.27±1.4
2	29.58±3.3	32.15±2.5	32.78±4.2	31.32±1.2	27.5±5.95	29.2±1.78	30.16±2.5	28.95±2.3

3) 저산소 환경 빈혈모델에서 GABA의 조혈 기능 연구

가) 배경

→ 필드에서 사육되는 가축은 양돈 뿐 만 아니라 양계도 과도하게 밀사된 환경에서 사육되기 때문에 항상 산소가 부족하게 된다. 즉, 만성적인 hypoxia에 노출된 환경에서 자라게 되지만 이러한 환경이 인간에게는 쉽게 인지되지 못하고, 사료첨가제로 인한 마땅한 해결책이 미비하다. 또한, hypoxia에 장기간 노출되면 고산지대에 생활하는 것 같은 과도한 조혈기능이 활성화되어 적혈구의 수가 증가되어 적응을 하지만, 단기간 여러 차례에 노출되면 순간적인 EPO의 증가 및 적혈구가 증가되어 체내 균형이 무너질 수 있다.

→ 따라서, 본 실험에서는 저산소 환경에 노출시킨 실험동물에 GABA가 과도한 조혈기능을 방어할 수 있는 지 확인하기 위해 진행하였다.

나) 방법



동물 반입 - 7일
실험시작(경구투여) - 11일 (9월29일까지)
Hypoxia 노출 - 25일 ~ 29일,
해부 - 29일 노출 후 해부

S.D. rat 40마리, 케이지당 8마리.
 저산소 환경 : hypoxia chamber, O2 9%, N2 92%. 1h/day (각 케이지)
GABA : 0.5, 1, 2mg/100g BW/day - 경구투여

분석항목

1. 혈청 및 전혈(plain vacuum tube & EDTA vacuum tube)
2. 신장조직(PCR & western blot) 혹은 기타 assay, 그룹 당 6마리
3. 간, 신장 조직 (H&E stain & special stain), 그룹당 2마리
4. 기타

다. 결과

다)-1 혈중 내 철분, ferritin, EPO 수치

	Iron (ug/dL)	TIBC (ug/dL)	Ferritin (ng/mL)	EPO (mIU/mL)
NC	277.4	728.0	2.59	1.03
PC	280.9	670.7	3.03	1.61
G1	277.6	642.6	2.79	1.23
G2	249.4	615.1	3.13	1.30
IO	253.9	636.9	2.81	1.40
O	265.6	605.4	2.65	1.27
G2+O	242.9	607.8	2.72	1.37

→저산소 환경에 노출된 rat에 GABA 및 철분제제를 투여하여 분석한 혈철 결과이다. 철분과 TIBC, ferritin에서는 큰 차이점은 발견하지 못하였다. 하지만 EPO 수치에서는 PC 그룹에서 EPO가 1.6배 증가하여 저산소 환경에서 EPO가 증가한다는 특이적인 반응과 일치하였다. 저산소 환경에서는 EPO의 증가 정도가 매우 다양하다. 노출 시간대 별로 EPO의 증가 수치가 다양하지만, 본 실험에서는 두시간 노출시켰으므로 약 2배 정도 높아질 것으로 예상되었다. GABA에서는 증가된 수치를 약간 감소시키는 영향을 확인하였으나 유의적이지는 않았다. 유기태 철분과 GABA를 합제한 그룹에서도 EPO를 감소시키는 경향이 있었으나 추후 추가적인 분석이 필요하다.

다)-2 적혈구 및 적혈구 index 분석

	RBC	Hgb	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT	MPV
NC	7.23	14.86	50.40	69.79	20.54	29.44	11.41	984.43	9.64
PC	6.76	13.85	47.36	70.13	20.51	29.25	11.53	927.75	10.43
G1	7.15	14.81	50.76	71.01	20.70	29.16	11.27	987.00	9.93
G2	7.23	14.76	51.19	70.84	20.43	28.85	11.50	1053.63	10.65
IO	7.02	14.49	50.50	72.01	20.63	28.69	11.48	1201.63	10.53
O	7.00	14.36	50.11	71.66	20.54	28.66	11.63	1233.25	10.64
G2+O	7.28	14.76	51.54	70.86	20.28	28.63	11.66	1069.75	10.71

→ 혈구 분석 결과 저산소 환경에 노출된 PC 그룹에서 적혈구가 유의하게 감소하였다. 실험 시작 전 예상에는 증가할 것으로 생각되었으나 감소하였으며, 이는 만성적인 노출이 아닌 하루에 2시간씩 간헐적으로 노출시키는 영향이라 생각된다. 하지만, EPO 수치와는 다르게 GABA 처리군에서는 적혈구다시 회복되는 경향을 확인 할 수 있었으며, 이러한 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. Hb의 수치도 적혈구와 비슷한 경향을 보였으며, 이를 규명하기 위해서는 오랜 연구기간이 필요할 것이라 생각된다.

다)-3 백혈구 differential counts

NC	WBC	NE	LY	MO	EO	BA
NC	8.87	10.43	85.86	2.31	0.94	0.43
PC	4.38	10.11	85.35	2.70	1.30	0.43
G1	6.79	11.69	84.71	2.27	0.97	0.39
G2	7.33	10.55	85.64	2.59	0.78	0.45
IO	7.51	8.65	87.76	2.51	0.78	0.33
O	6.05	10.76	85.58	2.59	0.78	0.30
G2+O	6.34	11.78	84.91	2.31	0.64	0.35

→ 백혈구 수치에서는 현재까지 진행되었던 빈혈모델과는 다른 경향이 나타났다. PC에서 50% 이하로 백혈구가 감소하였으며 이외의 처리군에서는 모두 회복되는 경향이 나타났다. 실제로 hypoxia에 노출시킨 동물들은 호흡에 문제가 생겨 큰 스트레스를 받는 것을 관찰할 수 있었고 이러한 스트레스로 인해 백혈구의 수치가 크게 감소하였을 것으로 예상되며, 실험군에서 특히 GABA 처리그룹에서 스트레스를 경감시켰을 것이라 예상하지만, 추후 심오한 연구가 필요하다고 생각된다.

다)-4 EPO immunostain

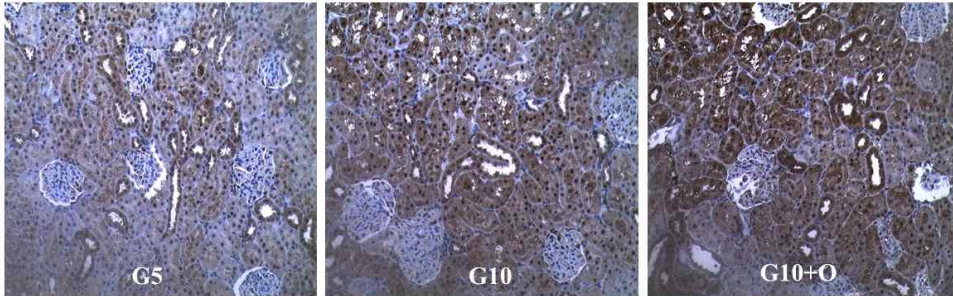
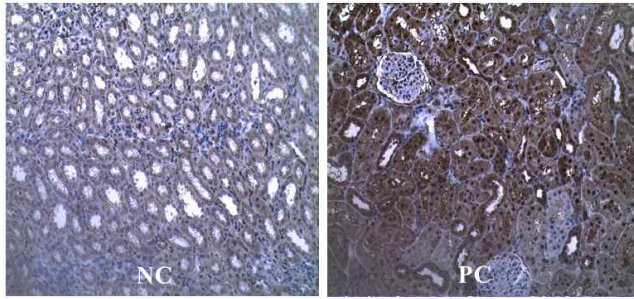


Fig. Immunolocalization of EPO in hypoxic kidney. Brown staining indicates immunostained reaction. All Samples were injected Oral administration(200x). NC: Negative Control, PC: hypoxia group, G5: GABA(5mg/100g BW/day), G10: GABA(10mg/100g BW/day), G10+O: GABA(10mg/100g BW/day) + Organic Iron.

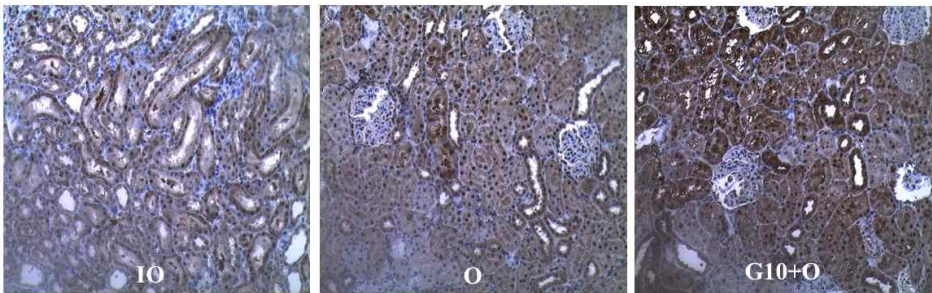
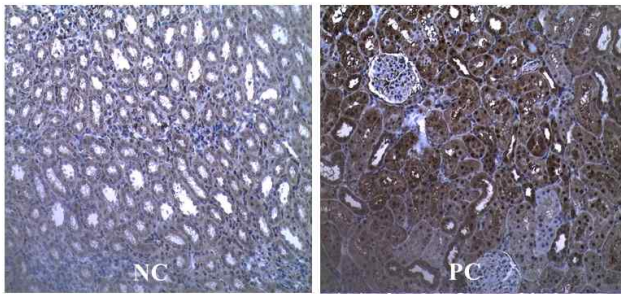


Fig. Immunolocalization of EPO in hypoxic kidney. Brown staining indicates immunostained reaction. All Samples were injected Oral administration(200x). NC: Negative Control, PC: hypoxia group, IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G10+O: GABA(10mg/100g BW/day) + Organic Iron.

다)-5 신장 H&E stain

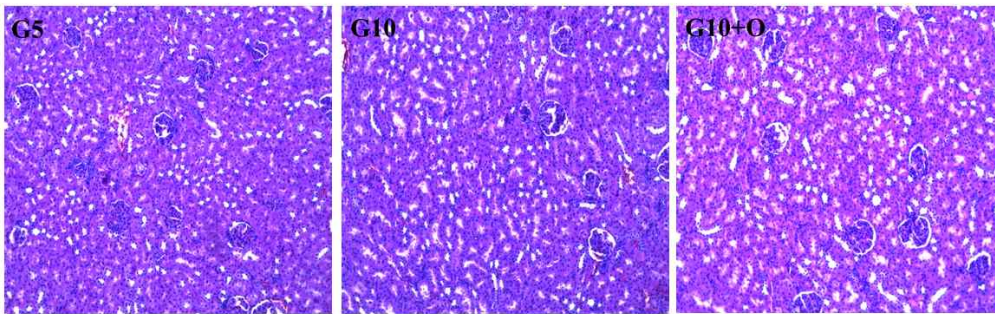
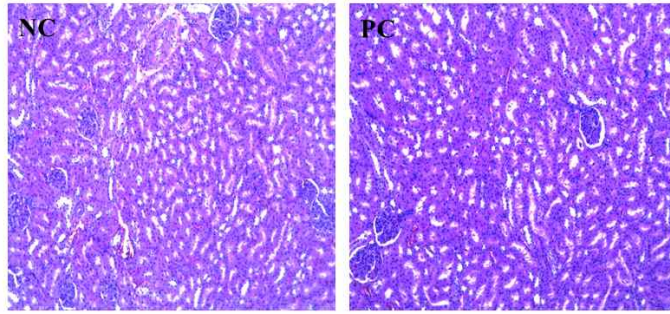


Fig2-1. H&E Stained sections from kidneys of Sprague Dawley Rats. All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control, PC: hypoxia group, G5: GABA(5mg/100g BW/day), G10: GABA(10mg/100g BW/day), G10+O: GABA(10mg/100g BW/day) + Organic Iron.

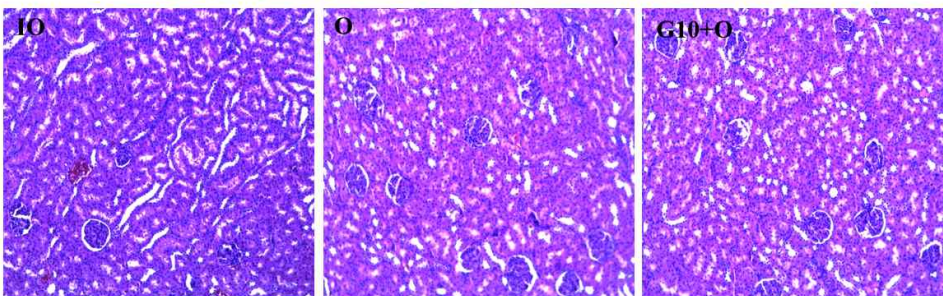
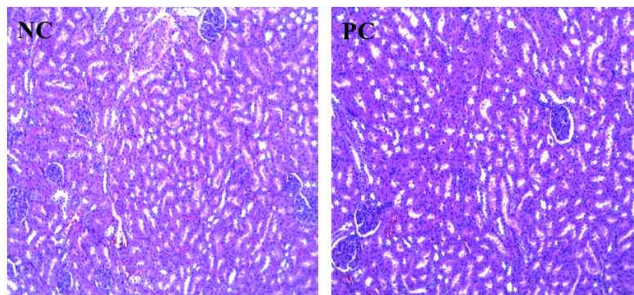


Fig2-2. H&E Stained sections from kidneys of Sprague Dawley Rats. All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control, PC: hypoxia group, IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G10+O: GABA(10mg/100g BW/day) + Organic Iron.

다)-6 간조직 H&E stain

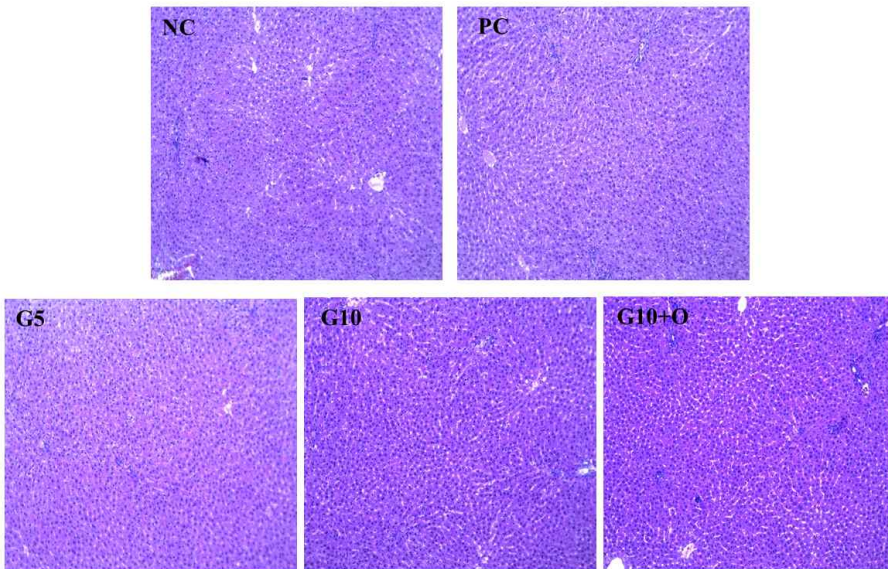


Fig1-1. H&E Stained sections from livers of Sprague Dawley Rats. All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control, PC: hypoxia group, G5: GABA(5mg/100g BW/day), G10: GABA(10mg/100g BW/day), G10+O: GABA(10mg/100g BW/day) + Organic Iron.

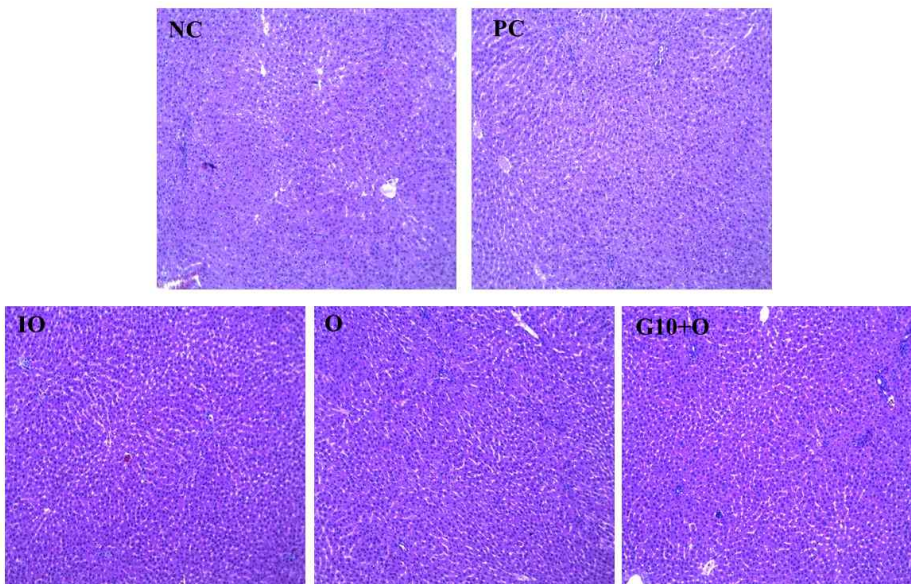


Fig1-2. H&E Stained sections from livers of Sprague Dawley Rats. All Samples were injected Oral administration(40x). NC: Negative Control, PC: hypoxia group, IO: In-Organic Iron(4mg/100g BW/day), O: Organic Iron(4mg/100g BW/day), G10+O: GABA(10mg/100g BW/day) + Organic Iron.

다)-7 체중변화

Group	Duration(Weeks)			
	1	2	3	4
NC	83.2±4.44	139.9±3.58	194.9±7.63	233.7±10.25
PC	86.3±6.15	140.1±10.72	191.8±13.98	227.8±16.53
G1	86.6±4.51	137.7±8.79	189.7±10.72	227.2±10.69
G2	88.2±4.8	141.1±8.5	192.3±11.1	232.7±14.04
IO	83.5±3.33	132.9±5.19	184.2±6.72	221.9±7.63
O	90.7±5.47	143.8±9.06	194±14.41	238±12.13
G2+IO	87.1±6.12	141.1±8.4	190.8±7.8	230.1±7.44

4) Hep3B cell line에 GABA가 조혈관련 유전자에 미치는 영향 연구

가) 배경

Hep3B cell line에 GABA가 조혈관련 유전자에 미치는 영향

나) 방법

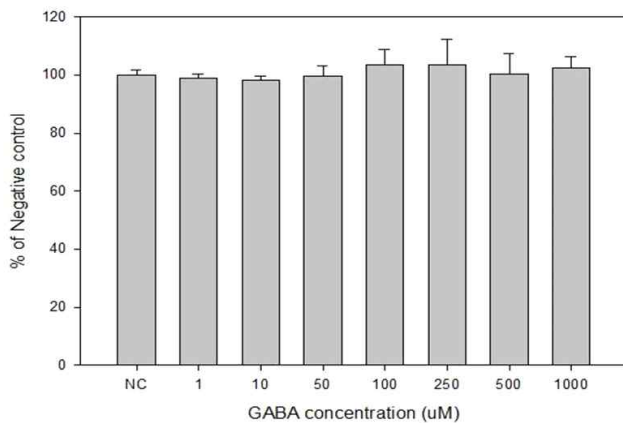
Cell line- 본실험에서사용한Human hepatoma cell line, Hep3B cell은한국세포주은행(Seoul, Korea)에서분양

100mm culture dish에서 10% fetal bovine serum, 1% penicillin /streptomycin을함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을사용하여 37°C, 5% CO₂조건에서배양

다)결과

다)-1 Hep3B cell에 대한 GABA의 영향

❖ MTT assay



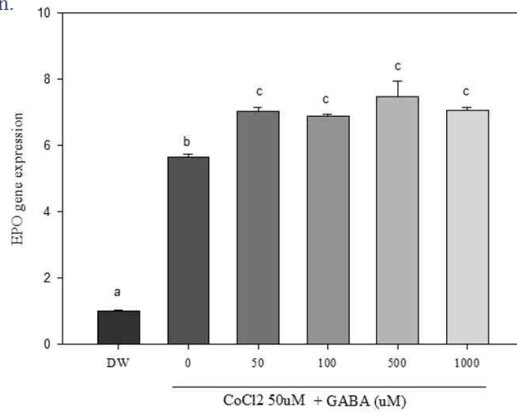
Hep3B cells were treated with GABA(uM) for 24 h and the viability was measured by MTT assay.

Hep3B cells did not show any significant decrease in viability.

다)-2. Hypoxia treatment and EPO gene expression

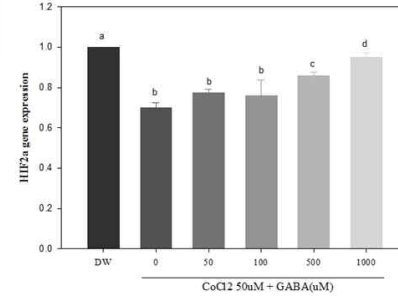
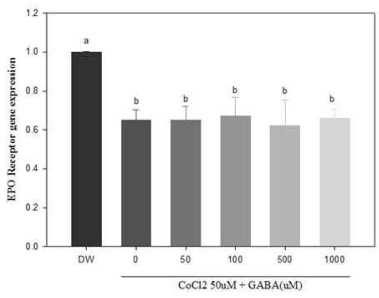
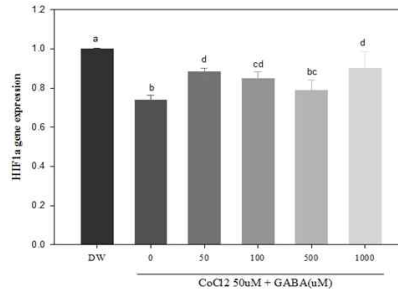
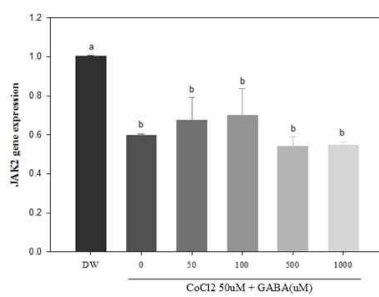
❖ Hypoxic treatment and EPO gene expression

Cobalt(II) chloride(CoCl₂) is a chemical inducer of hypoxia-inducible factor. The cells were stimulated to produce EPO by growing them in the presence of CoCl₂(50uM), in the absence or in the presence of the GABA. EPO mRNA level were determined by quantitative PCR(qPCR) after 5h incubation.



ㄷ)-3. Hypoxia treatment and EPOR, JAK2, HIF1a, HIF-2a gene expression

❖ Gene expression – EPOR, JAK2, HIF1a, HIF2a

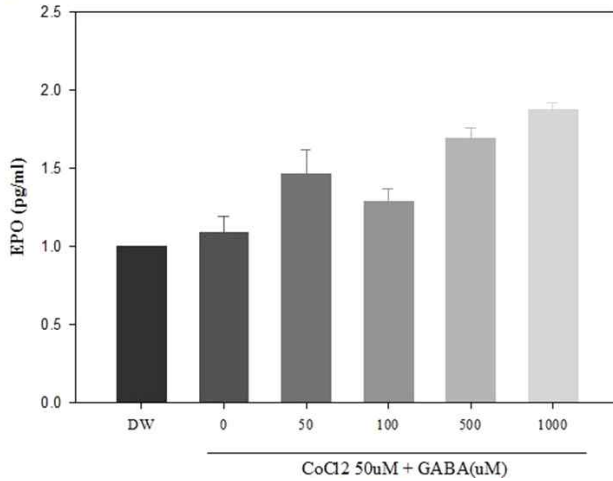


다)-4 EPO ELISA 분석

❖ EPO ELISA

After hypoxic treatment, culture conditioned media were collected for the EPO production assay.

EPO production was assessed using an ELISA kit from Elabscience according to the manufacturer's protocol.



2. 연구범위 및 연구수행 방법 (3차년도 계획)

		코드번호	C-04
연구범위	연구수행방법 (이론적, 실험적 접근방법)	구체적인 내용	
●양돈 최종 필드 실험	<ul style="list-style-type: none"> ●총 2회에 걸쳐 양돈 필드 농장에서 GABA 및 유효물질의 성능 평가 ●첨가제와 철분주사의 동등성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ●필드농장에 적용하여 실제 철분주사제 대체 가능성 판단 ●포유모돈 및 자돈 사료에 첨가하여 철분주사의 동등성 평가 	
●품질관리 시스템 구축 및 시제품 출시	<ul style="list-style-type: none"> ●제품생산 라인 구축 및 배합비 완료 ●생산비에 의한 가격 산정 ●제품 등록 및 시제품 출시 	<ul style="list-style-type: none"> ●생산공정과정 및 배합 직원 교육 ●원가, 부형제 등 생산비에 의한 제품 가격 산정 ●이천시청 제품 등록 	

나-2. 3차년도 연구개발 수행내용 - 미래생명자원

1. 일반 환경에서 GABA가 Rat의 조혈기능에 미치는 영향 연구
가)배경

1차년도 수행하였던 연구 데이터에 추가 분석을 실시하여 GABA와 조혈작용간의 메커니즘을 규명하였다. 추가로 분석한 항목은 RNA microarray와 2DE 단백질 분석을 통해 관련 유전자의 발현양상을 확인하였고, 2DE 단백질 분석을 통해 protein-protein interaction을 연구함으로써 GABA가 조혈기능에 미치는 영향 메커니즘을 규명하였다.

나)방법

스트레스를 주지 않은 일반 환경에서 SD rat을 사육하였다. GABA는 음수에 50, 100, 200ppm을 첨가하여 자유롭게 섭취토록 하였으며, 3주간 급여하였다. 조명은 12시간 주기였으며, 사육실 내 온도는 22°C를 유지하였다. 분석항목은 체중변화, 사료섭취량, 사료효율, 혈청 내 EPO 수치, 혈액 내 혈구분석(적혈구, 백혈구), EPO관련 유전자 발현, EPO, EPO-R confocal microscopy, 간 조직 H&E stain, RNA

microarray, 2DE electrophoresis, protein-protein interaction 이다.

다) 결과

다)-1 증체, 사료섭취량, 사료 효율

Supplementary table 1. Effects on body weight, feed intake and feed efficiency of rat fed various GABA concentration for 3 weeks

	Feed intake (g/head)	Weight gain (g/head)	FCR
NC	386.3±35.2	119.6±11.5	3.23±0.02
G50	376.7±31.1	118.1±17.19	3.19±0.02
G100	378.6±25.1	118.3±12.21	3.20±0.01
G200	378.5±40.2	117.9±26.03	3.21±0.01

→GABA를 음수에 각각 50, 100, 200ppm을 첨가하여 3주간 급여시 동물의 체중증가와 사료섭취량, 사료효율에서는 유의한 차이를 보이지 않았다.

다)-2 혈청 내 erythropoietin 수치

Table 1 Effects of GABA on serum erythropoietin in rats

	NC	G50	G100	G200
Erythropoietin (mIU/mL)	59.9 ± 10.3	97.2 ± 10.7**	97.7 ± 11.2**	120.1 ± 14.9***

→ GABA를 섭취한 그룹에서 모두 유의한 EPO의 증가를 확인하였다. 특히, 저농도에서 고농도까지 농도 의존적인 증가추세를 확인하였다.

다)-3 백혈구 differential counts

Supplementary table 3. The WBC differential cell counts in rat fed various GABA concentrations for 3 weeks

	White blood cell (10 ³ cell/uL)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)
NC	11.18±0.86	79.77±5.25	3.49±0.47	6.22±0.91	2.77±1.61	0.35±0.07
G50	11.31±1.17	79.63±2.44	3.39±0.71	6.60±1.72	2.56±1.12	0.33±0.06
G100	10.89±3.06	80.62±4.37	3.33±0.86	6.41±1.40	2.88±2.38	0.39±0.18
G200	11.44±1.54	80.06±4.00	3.73±0.67	6.91±1.45	2.28±0.90	0.38±0.11

*A p-value< 0.05 was considered the threshold for statistical significance.

→ 실험 종료 후 혈액을 EDTA vacumm tube에 채혈하여 응고가 없는 상태에서 5시간 내에 백혈구 및 differential counts를 실시하였다. 백혈구와 이와 관련된 인자들에서는 유의한 차이를 보이지 않았다.

다)-4 적혈구 counts

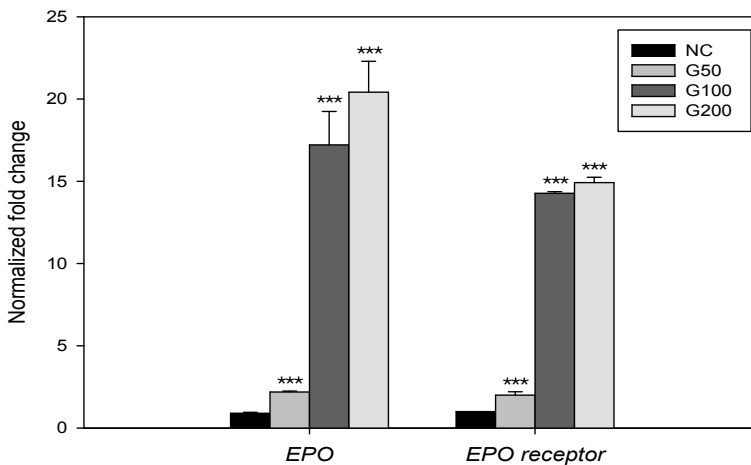
Table 2 The Red blood cell indices counts in rat fed various GABA concentrations for 3 weeks

	Red blood cell (M/mm ³)	MCV (fl)	HCT (%)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Hemoglobin (g/dL)	PLT (K/uL)
NC	5.9 ± 0.23	60.0 ± 2.57	37.2 ± 1.52	22.1 ± 0.50	36.3 ± 1.42	13.5 ± 0.25	726.6 ± 74.81
G50	6.2 ± 0.13*	60.7 ± 1.60	37.1 ± 0.86	22.7 ± 2.07	37.7 ± 3.08	13.7 ± 0.29	757.6 ± 48.57
G100	6.2 ± 0.24	61.3 ± 1.01	37.4 ± 1.41	21.9 ± 1.12	36.1 ± 1.72	13.3 ± 0.32	679.5 ± 116.00
G200	6.3 ± 0.28*	60.7 ± 2.33	38.2 ± 1.98	22.1 ± 0.63	37.2 ± 1.66	13.5 ± 0.31	690.3 ± 188.65

NC, negative control; G50, 50 ppm GABA; G100, 100 ppm GABA; G200, 200 ppm GABA; MCV, mean corpuscular volume; HCT, hematocrit; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, platelet; **P* < 0.05, compared with control group.

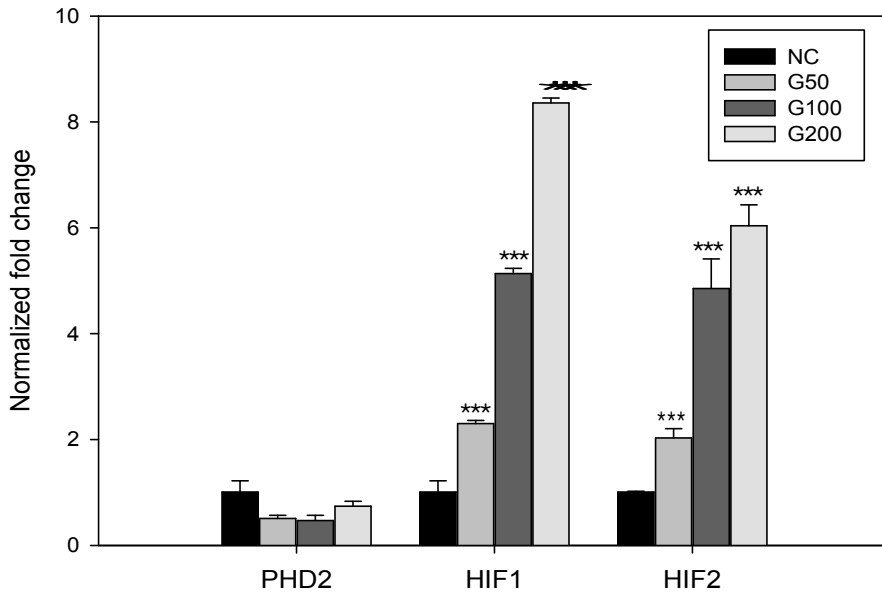
→ 적혈구 분석결과 대조군에 비해 실험군에서 증가하는 경향을 보였으나 G50, G100 그룹에서는 유의하지 않았으며, G200 실험군에서만 유의한 증가를 확인하였다. 혈청 분석 결과 GABA로 인해 EPO의 증가를 확인하였으며, 이로 인해 적혈구 수치가 증가한 것으로 확인되었다. 혈청 EPO에서도 농도의존적으로 증가하였으며, G200에서 가장 높았으며, 그 결과 적혈구에 반영되어 G200 실험군에서 유의하게 증가된 것으로 판단된다.

다)-5 신장 피질 조직 내 EPO 및 EPOR gene expression



→ 실험 종료 후 신장 조직을 적출하여 겔부분인 피질부분을 떼어내어 total RNA를 분리 후 qPCR 분석을 실시하였다. Target 유전자는 EPO와 EPO receptor였으며, 각 개체별로 모두 분리 및 분석에 사용하였다. 분석 결과 GABA의 농도의존적으로 각 유전자 발현양이 증가하였다. 특히 G100, G200 실험군에서 약 15~20배 정도의 유전자 발현양이 증가하였다.

다)-6 신장 피질 조직 내 PHD2 및 HIF-1, HIF-2 gene expression



→ 같은 RNA에서 PHD-2a와 HIF-1a, HIF-2a를 각각 분석하였다. PHD-2a (HIF prolyl hydroxylase)는 정산산소 환경에서 HIF-1a와 HIF-2a를 불활성화 시키는 유전자이며(hydroxylated by the PHD2a), 저산소 환경에서는 이 잠금이 풀려 HIF-1a(hypoxia inducible factor)와 HIF-2a가 활성화된다. HIF-1a와 HIF-2a는 erythropoiesis의 key factor로서 매우 중요한 역할을 한다. 본 실험에서는 저산소 환경에 노출된 것이 아니지만, HIF-1a와 HIF-2a의 gene expression이 증가하였으며, PHD-2a는 아무런 차이가 없었다. 특이한 점은 GABA로 인해 저산소환경이 아닌데도 HIF family gene들이 증가하여 조혈기능을 활성화 시켰을 것이라 추측되며, 추가적인 분석으로 그 경로를 확인하였다.

다)-7. Immunofluorescence for EPO and EPO receptor protein

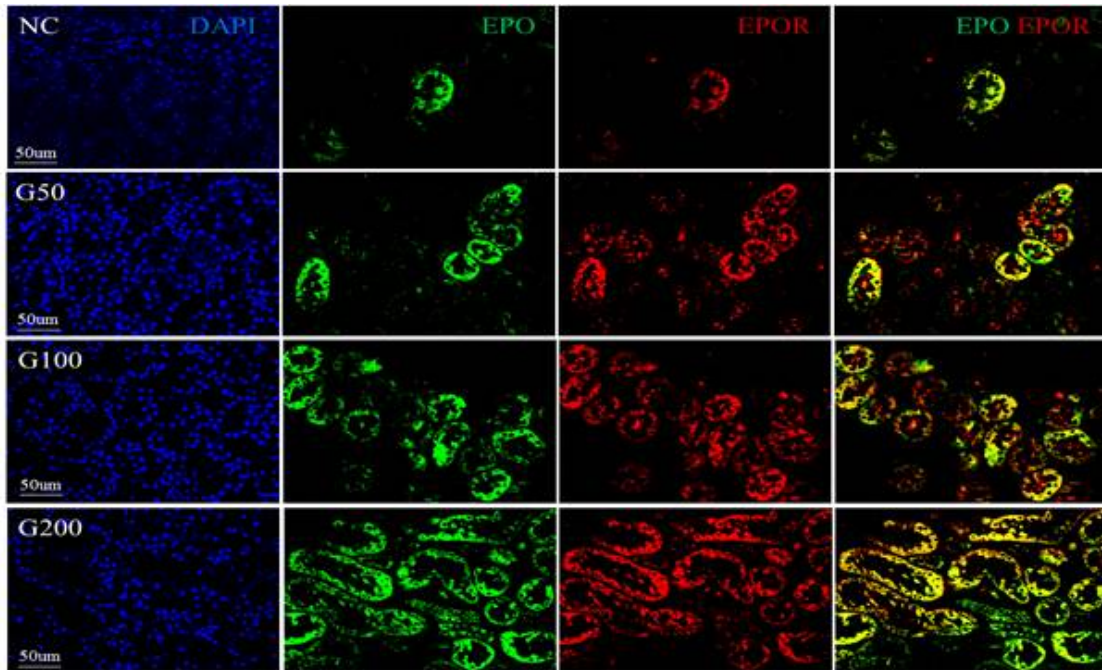
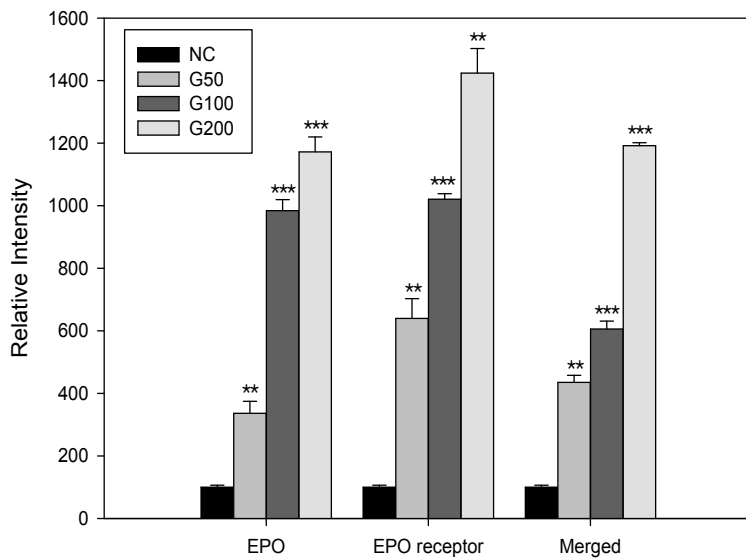
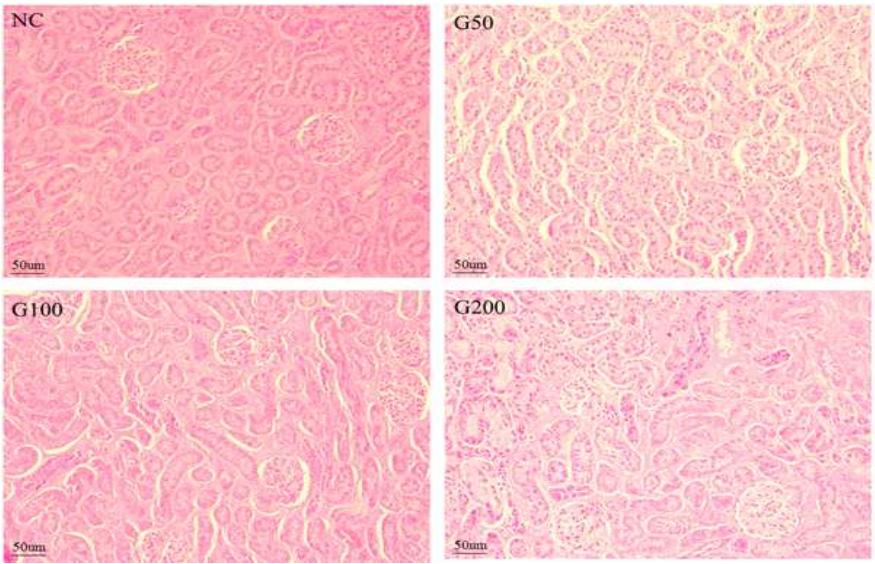


Figure. Immunofluorescence for EPO and EPO receptor protein in GABA treated rat kidneys. Paraffin sections were fixed and stained with anti-EPO, and anti-EPOR. All bars are 50 are 50 µm(Magnification X40).



→실제 신장 조직에서 EPO와 EPO receptor 단백질의 발현을 보기 위해 immunofluorescence confocal microscopy를 진행하였다. 1차 Ab는 EPO와 EPO receptor를 사용하였으며, 2차 Ab는 Alexa 계열의 형광 Ab를 부착하여 검경하였다. 검경 결과 섭취시킨 GABA의 농도가 높아질수록 두 단백질 모두 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 이 결과 역시 농도 의존적으로 발현양이 증가하였다.

다)-8 GABA의 신장 독성 여부를판단하기 위한 H&E stain



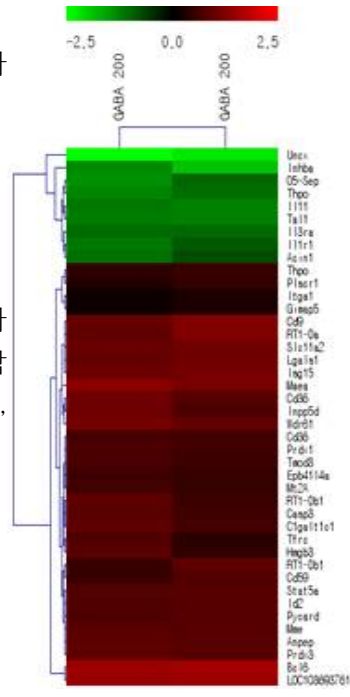
→ 실험 종료 후 간독성 여부를 판단하기 위해 간조직을 적출 후 H&E stain을 실시하였다. 간 조직의 morphology 변화, 염증 등을 판별하기 위해 검경을 하였으나 어떠한 변화도 나타나지 않았다.

다)-9 신장 조직의 RNA microarray 분석

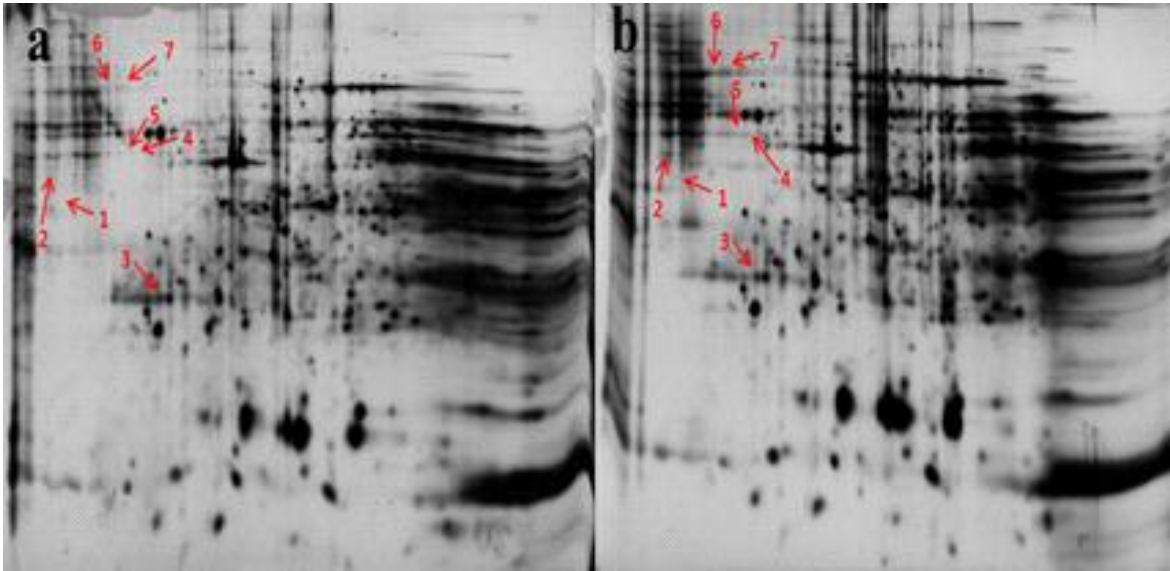
→ 신장 조직 내의 microarray 분석결과 내에서 erythropoiesis와 hematopoiesis 와 관련된 유전자를 선별하여 그림에 나타내었다.

erythropoiesis 관련 유전자 25개, hematopoiesis 관련 유전자 16개가 검색되었으며 이 중 78%의 유전자가 유의하게 증가하는 것이 확인되었다. 그림에 나타나 있는 색은 검은색일수록 대조군과 차이가 없는 것을 나타내며 녹색은 발현이 감소된 것, 빨강색은 발현이 증가된 것을 나타낸다.

RNA microarray 분석은 3개의 신장조직을 분석되 하였으며 이 중 오차가 큰 1개 샘플을 제외하고 2개의 샘플을 분석에 사용하였다. 2배 이상 증감이 있던 유전자는 모두 758개 였으며, 2배 이상 증가는 나타낸 유전자 550개, 2배 이하로 감소한 유전자는 208개 였다.



다)-10 2 Dimensional electrophoresis 분석



→ 2 DE 분석 결과모두 6개의 단백질이 증가 발현하는 것을 확인하였다. 증가된 단백질은 아래 표와 같다.

Table5. MS identification of differentially expressed protein spots in GABA-treated rat kidney

Spot NO.	Protein name	gi NO.	matched peptides	Protein sequence coverage	Protein score	MW (Dalton)	M/H
1	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 9 (Ndufa9)	564349298	21	43%	188	42252	239.3
2	DOPA decarboxylase, isoform CRA_b (Ddc)	149016961	15	33%	131	55109	256.7
3	Leukemia inhibitory factor (Lif)	4235628	8	23%	70	35344	48.6
4	isocitrate dehydrogenase[NADP], mitochondrial precursor (Idh2)	62079055	12	29%	99	51391	23.2
5	Serum albumin (Alb)	124028612	26	39%	238	70682	4.3
6	transketolase isoform X1 (Tkt)	564387998	16	40%	113	68314	5.7
7	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit (Sdha)	18426858	17	35%	102	72596	4.8

→ 단백질 spot 선정 후 MALDI-TOF를 사용하여 단백질을 규명하였다. 규명된 단백질은 6개 였으며 증가율은 4.8배에서 239배 까지 증가하는 경향을 보였다. 단백질의 종류로는 (크게 증가한 순서대로) NADH dehydrogenase, DOPA decarboxylase, Leukemia inhibitory factor, isocitrate dehydrogenase mitochondria precursor, serum albumin, transketolase, succinate dehydrogenase subunit 이었으며, 이 중 NADH dehydrogenase와 DOPA decarboxylase는 대조군에서는 없었던 spot이었다.

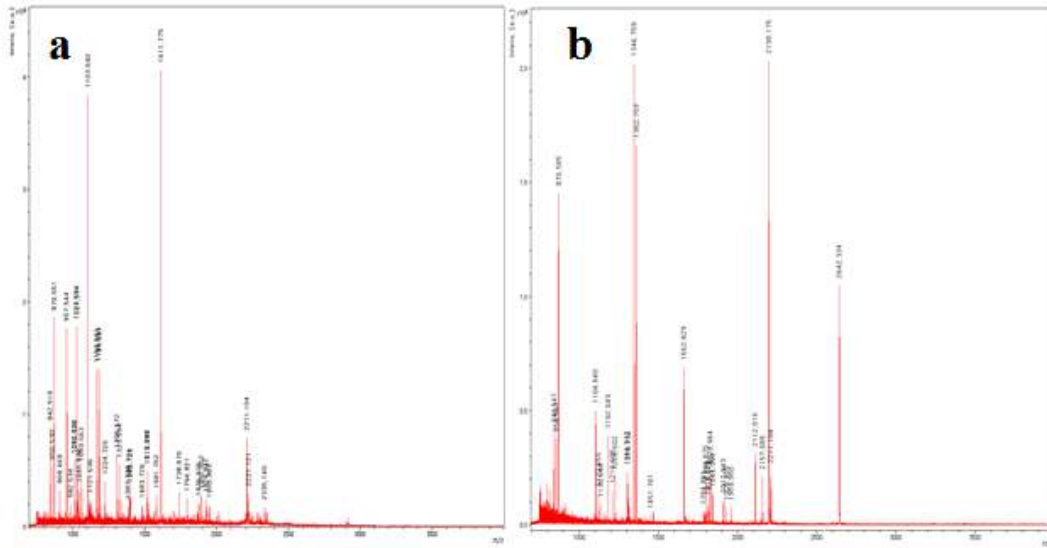


Figure 7. The representative MALDI-TOF-MS maps. (a) PMF of NADH dehydrogenase 1 alpha. (b) PMF of DOPA decarboxylase.

→ NADH dehydrogenase와 DOPA decarboxylase 의 MALDI-TOF maps.

다)-11 Gene Ontology classifications

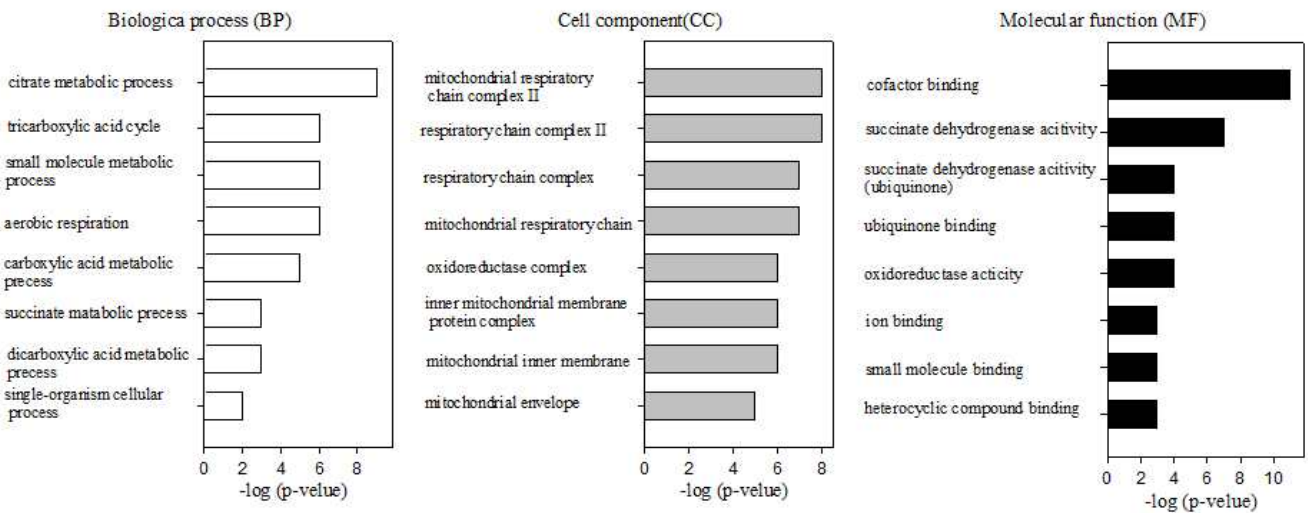


Figure 8. Gene Ontology classifications of proteins differentially expressed between normal rat kidney and treated with 200ppm GABA in water. The differentially expressed proteins were grouped into three hierarchically structured GO terms; biological process, cellular component, and molecular function.

→ 동정된 단백질을 기준으로 Gene ontology 분석을 실시하였다. 단백질 상호분석 데이터베이스를 기초로 분석한 결과 ontology를 세가지 카테고리로 나누었고, 각 카테고리에서의 역할은 위와 같다. 맨 위부터 가능 가능성이 높은 순서로(p value가 낮은 순서대로) 배열하였다.

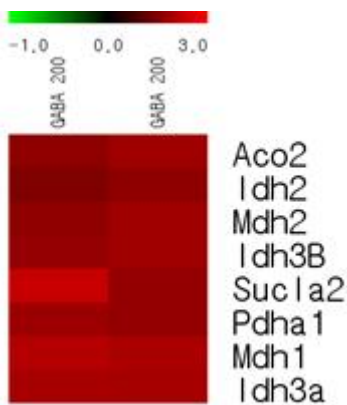
다)-12 KEGG pathway

Table 6. Significantly enriched KEGG pathway of differentially expressed proteins

pathway ID	Pathway name	Gene symbol	count	P-value
20	Citrate cycle (TCA cycle)	Acly, Idh2, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd	6	8.E-13
1100	Metabolic pathways	Acly, Ddc, Idh2, Ndufa9, Ndufab1, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd, Tkt	10	8.E-10
1200	Carbon metabolism	Idh2, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd, Tkt	6	8.E-10
190	Oxidative phosphorylation	Ndufa9, Ndufab1, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd	6	3.E-09
5012	Parkinson s disease	Ndufa9, Ndufab1, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd	6	3.E-09
4932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	Ndufa9, Ndufab1, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd	6	4.E-09
5010	Alzheimer s disease	Ndufa9, Ndufab1, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd	6	6.E-09
5016	Huntington s disease	Ndufa9, Ndufab1, Sdha, Sdhb, Sdhc, Sdhd	6	8.E-09
1120	Microbial metabolism in diverse environments	Acly, Idh2, Tkt	3	2.E-03
1230	Biosynthesis of amino acids	Idh2, Tkt	2	2.E-02

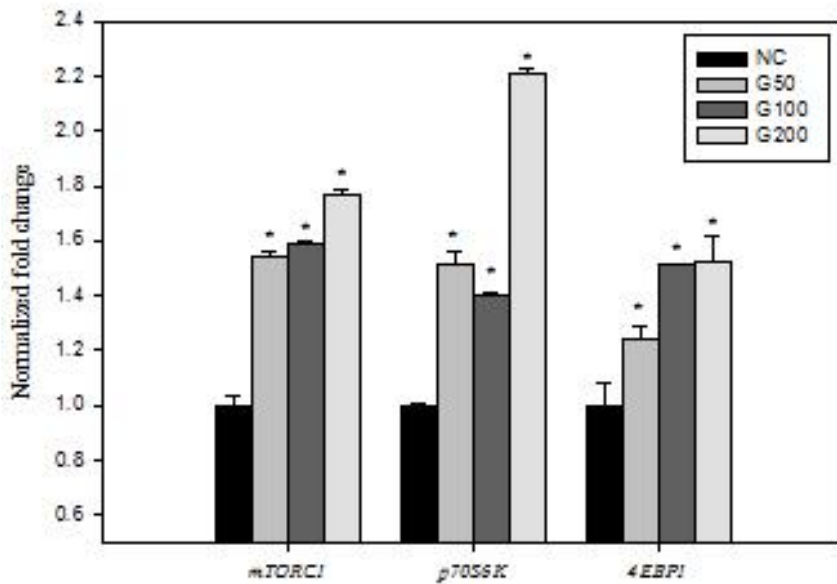
→ KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 데이터베이스에서 각 단백질 spot 분석 결과 총 10개의 pathway 가 검색이 되었으며 TOP 1 경로는 Citrate cycle(TCA cycle)이었다. 본 연구결과를 종합하였을 때, 모든 데이터 분석 후 GABA와 EPO로 인해 citrate cycle이 up-regulation 시킨다는 결론에 이르렀으며, 이 결과를 뒷받침하기 위해서는 추가적인 실험이 필요하였다.

다)-13 Citrate cycle과 관련된 Heat map



→ Microarray 분석 결과를 바탕으로 citrate cycle 과 관련된 유전자를 추출하여 증가, 감소를 heatmap으로 표시하였다. 추출된 유전자는 유의한 차이가 나는 유전자만 추출되었으며, 8개의 유전자 모두가 유의하게 증가하였다. 이 데이터로 인해 GABA가 신장 내 citrate cycle regulation에 긍정적인 영향을 준다는 근거가 제시되었다.

다)-14 mTORC1, p70S6k, 4EBP1 gene expression



→ TCA cycle activation의 증거로 위의 세가지 유전자의 발현을 측정한 결과 모든 그룹에서 대조군비에 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

→ Gene expression of mechanistic target of rapamycin complex 1(mTORC1), Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K), and Eukaryotic translation inhibition factor 4E-binding protein (4EBP1). Data were normalized by using actin as a control. Results are expressed as mean SD (n = 3). *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, compared with control group.

다)-15 신장 조직 내 mitochondria ATP content & NADH dehydrogenase

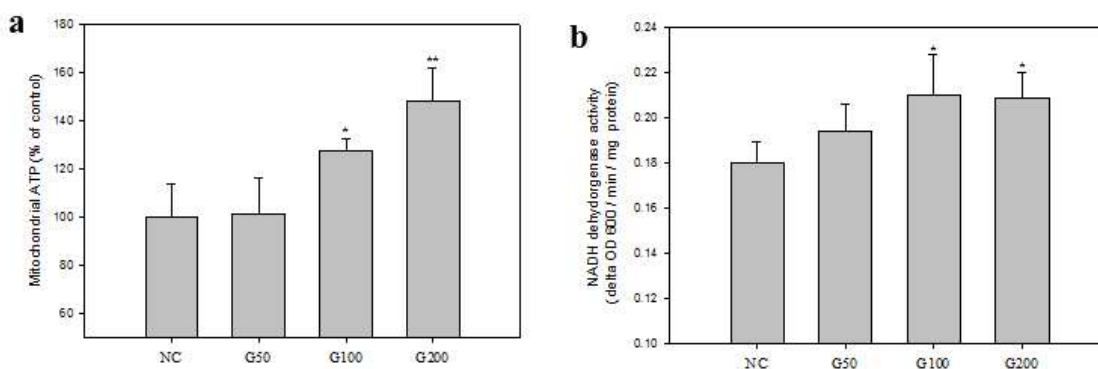


Figure 4. Effects of GABA on the content of ATP production and NADH dehydrogenase activity from kidney mitochondria. (A) ATP quantification assay. (B) NADH dehydrogenase activity assay. *P < 0.05, **P < 0.01, compared with control group.

→ 신장 조직에서 mitochondria를 추출하여 세포 내 ATP를 정량하였다. Citrate cycle의 직접적 증거가 될 수 있는 ATP 정량 결과 G50 부터 농도의존적으로 증가하였다.

→ Citrate cycle이 증가하게 되면 NADH가 세포 내에서 증가하게 되면, 세포 내 항성성으로 인해 과도한 NADH를 분해하기 위해 NADH dehydrogenase를 분비하게 된다. Mitochondria 추출물에서 NADH dehydrogenase 활성을 측정하였고, 그 결과 대조군에 비해 GABA 그룹에서 증가하는 것을 확인하였다. 이는 2DE spot identification 결과 중 NADH dehydrogenase 단백질이 비정상적으로 크게 증가한 것과

일치한다.

다)-16 2DE protein- STRING analysis

→ 발현된 단백질들과의 상호작용을 분석한 결과 아래 그림과 같다. 분석에 사용된 툴은 Search Tool for the Retrieval of Interacting Gene/Protein database version 10.5이며, 표시된 선들의 두께는 각 단백질의 상호연관성을 나타낸다.

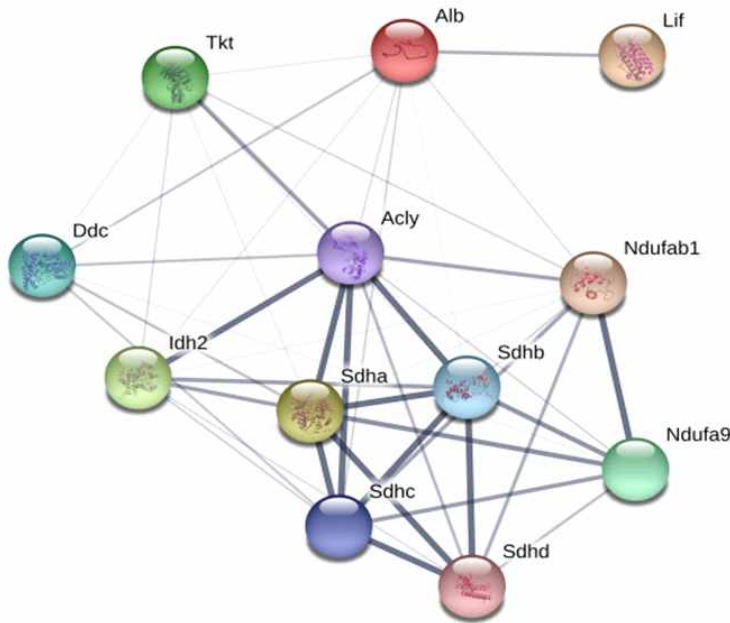


Figure 5. STRING analysis reveals protein interaction network. Effects of GABA on the content of ATP production and NADH dehydrogenase activity from kidney mitochondria. Interactions of the identified proteins were mapped by searching the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Gene/Protein) database version 10.5 with a confidence cutoff of 0.15. In the resulting protein association network, proteins are presented as nodes which are connected by lines whose thickness represents the confidence level.

다)-17 Primers

본 연구에 사용된 primer는 다음 테이블과 같다.

Additional file 1. Table S1. Primer sequences for PCR amplification

Gene symbol	Description	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
<i>EPO</i>	Erythropoietin	TACGTAGCCTCACTTCACTGCTT	GCAGAAAGTAT CG TGTGAG TGT TC
<i>EPOR</i>	Erythropoietin receptor	AGGTGGACGTGTCAGCAGGC	CGTACCTTGTGGCGTATGCAG
<i>PHD-2</i>	prolyl hydroxylated-2 α	CCATGGTCGCC TGTACCC	CGTACCTTGTGGCGTATGCAG
<i>HIF-1α</i>	Hypoxia inducible factor-1 α	CACTGCACAGGCCACATTCAT	AAGCAGGTCATAGGCGGTTTC
<i>HIF-2α</i>	Hypoxia inducible factor-2 α	GTCACCAGAACTTGTGC	CAAAGATGCTGTT
<i>mTORC1</i>	Mechanistic target of rapamycin complex 1	TTGAGGTTGCTATGACCAGAGAGAA	TTGAGGTTGCTATGACCAGAGAGAA
<i>p70S6K</i>	Ribosomal protein S6 kinase	GGA GCC TGG GAG CCC TGA TGTA	GAAGCCCTCTTTGATGCTGTCC
<i>4EBP1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein	TAGCCCTACCAGCGATGAGCCT	GTAACAACAGAGGCCACAAGGAGGTAT
<i>Actin</i>	Actin	CTTCTACAATGAGCTGCGTG	TCATGAGGTAGTCTGTGAGG

→

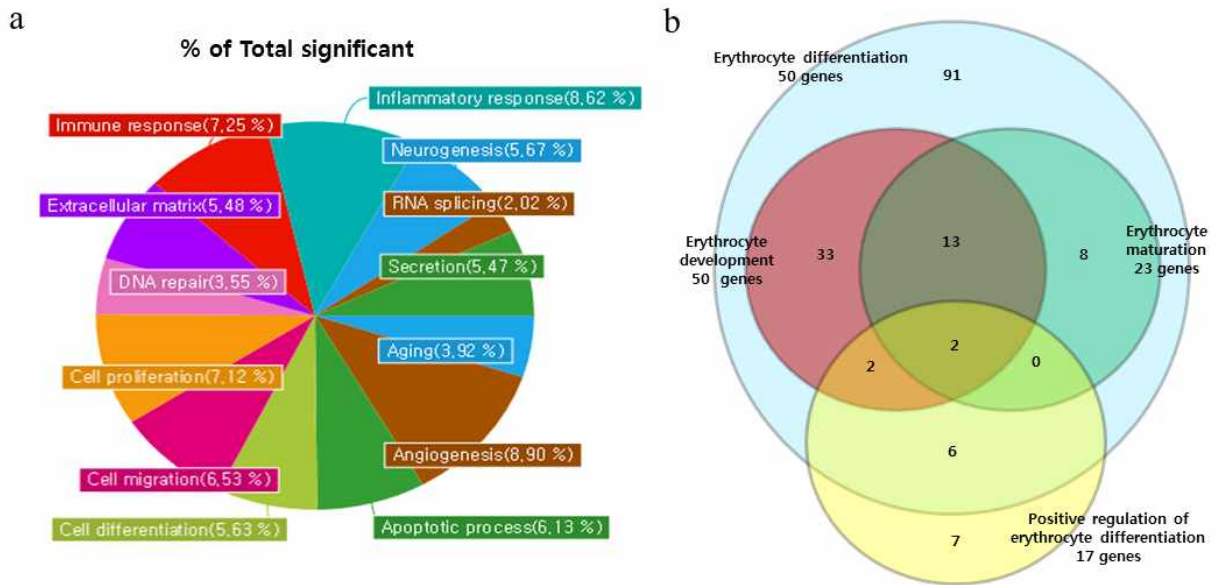
다)-18 GABA가 신장 독성에 미치는 영향 (serum creatinine value)

Table. Effects of GABA on serum creatinine in rats

	NC	G50	G100	G200
Creatinine (mg/mL)	0.48 ± .006	0.49 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.49 ± 0.05

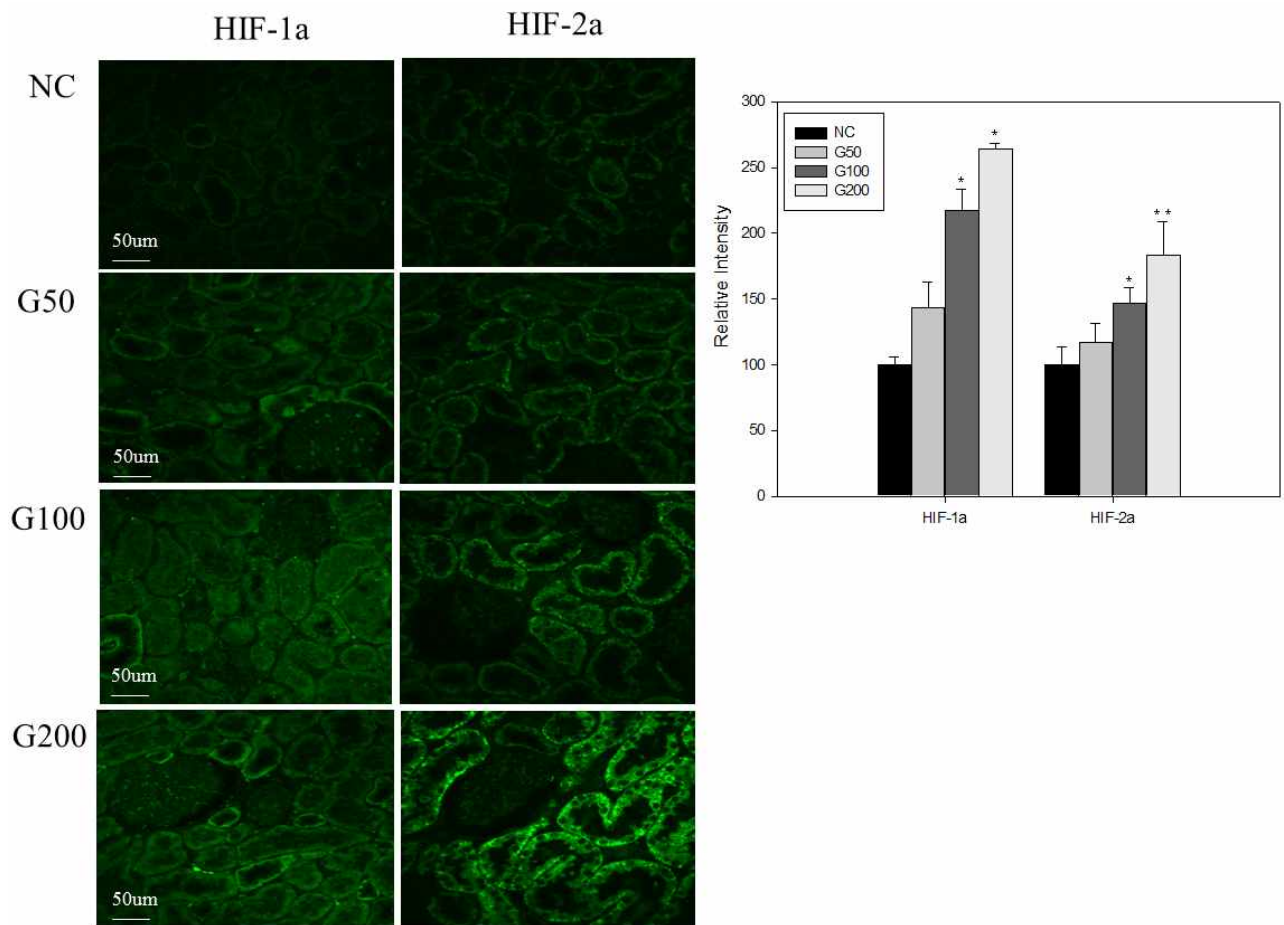
NC, negative control; G50, 50 ppm GABA; G100, 100 ppm GABA; G200; 200 ppm GABA.

다)-19 mRNA microarray 결과를 바탕으로 한 major categorization, Erythrocyte 관련 유전자 분류



- Pie chart representation of Gene ontology for genes differentially expressed in microarray analyses and summarized according to major categories. A venn diagram displaying overlap of significant genes found in the erythrocyte differentiation. (a) Gene expression in GABA-treated kidney tissue was compared to normal tissue, and the criterion for differential expression was choosing the 2-fold change with ad adjusted $P < 0.05$ of the DEGs. Fifteen of major functional categories were obtained using GO annotation. (b) Diagram representing the number of genes their expression differed from controls. Gene numbers were obtained by GO annotation generated by 2-fold, $P < 0.05$ criterion.

다)-20 신장 조직 내 HIF-1a, HIF-2a 단백질 발현 및 relative intensity 측정



다)-21 GABA 섭취에 의한 사료섭취량 및 증체량

Additional file2. Table S2. Effects on body weight, feed intake and feed efficiency of rat fed various GABA concentration for 3 weeks

	Feed intake (g/head)	Weight gain (g/head)	FCR
NC	386.3±35.2	119.6±11.5	3.23±0.02
G50	376.7±31.1	118.1±17.19	3.19±0.02
G100	378.6±25.1	118.3±12.21	3.20±0.01
G200	378.5±40.2	117.9±26.03	3.21±0.01

FCR, feed conversion ration; NC, negative control; G50, 50ppm in water, G100, 100ppm in water, G200; 200ppm in water.

나-2. 3차년도 연구개발 수행내용 - 양돈 필드실험
 2. 실제 농가 적용 필드실험 - GABA-유기태 철 complex

가) 서론

돼지의 철분 결핍증

- 철분은 혈액의 혈색소 (헤모글로빈)를 구성하는 성분으로 산소의 운반과 조직호흡에 관한 기능과 대사 과정에 직접적으로 관여한다. 철분이 부족할 때는 철분 결핍성 빈혈을 일으키게된다.

새끼 돼지는 발육속도가 매우 빨라서 출생시 체중은 1.0 ~ 1.5 kg에 불과하지만 1주령 시에는 약 2배, 3주령 시에는 약 4배가 되며, 따라서 각 장기 및 신체 조직도 급속도로 발육하게 된다. 이 때 외부로부터 공급되는 철분의 함량이 부족하게 되면, 적혈구의 구성성분인 혈색소 생산량이 감소되고, 자돈의 체중증가율을 따라잡지 못하므로 생후 3주령 이내에 생리적 빈혈이 오게 된다.

〈돼지 성장단계별 표준체중 및 일당증체량〉								
주령	분만시	1	3	8	12	16	20	26
표준체중(kg)	1.4	2.6	5.5	17.0	31.6	51.0	75.2	113
일당증체량(g)	-	171	207	329	500	693	864	900

자돈의 혈액 중 혈색소량이 감소하게 되면 설사 발생빈도가 높아지고 항병력이 저하되어 질병에 대한 감소성과 발생이 높아지는 것 외에도 성장이 늦어지고 허약돈이 되기 쉽다.

-원인

철 결핍은 보통 원발성인데 모유가 유일한 철공급원인 신생자축에서 많이 발생된다. 왜냐하면 모유도 철 공급원으로서 빈약하기 때문이다. 신생자축의 간에 저장된 철은 정상적인 혈구형성을 2~3주 이상 유지하는데 불충분하며, 자돈에서는 현저하게 부족하다.

증상으로는 약 3주령에서 가장 발생율이 높으며 10주령까지도 발생된다. 철 결핍증을 나타내는 돼지라도 발육이나 일반적인 상태가 양호하지만, 빈혈이 있는 정상적인자돈보다 성장속도가 현저하게 느리고 사료섭취량도 저하된다. 설사가 다발하지만 분변의 색깔은 보통 정상이고 설사가 심해지면 성장률이 저하된다. 운동을 하면 심한 호흡고난, 혼수상태 및 심첨부 박동의 증가가 나타난다. 피부와 점막은 창백해지며 백돈이 종종 진한 황색으로 변색되며 두부와 전구에 부종이 생기는데 살이 찢 것처럼 부풀어 있다.

-예방 및 치료

진단의 확정은 헤모글로빈 측정이며, 철을 급여하여 치료와 예방효과를 볼 수 있다. 분만 전 최소한 2주 전에 철분제제를 모돈에 투여하면 약간의 효과를 얻을지라도 분만 후에는 효과가 없으므로 자돈에게 직접 실시하여야 한다. 통상적으로 농가에서 자돈에 철분주사시에는 3일령과 7일령 사이에 1회 근육주사한다. 덱스트란 철, 후마린산 철, 글루타민산 철이 많이 사용된다. 최소한 100mg의 철 원소를 투여하여야 한다.

덱스트란 철 주사제의 대체 방법으로서 양돈 농가가 요구하는 인력과 시간의 문제를 해결하고, 주사제가 지니고 있는 단점인 자돈 스트레스 문제, 과잉철의 병원성 미생물 이용 등의 문제를 해결하기 위하여 본

실험을 시행하였다. 본 연구는 3차에 걸쳐 진행되었고, GABA와 라이신이 결합된 유기태 철분을 사용하여 철분주사를 대체할 수 있는 근거를 마련하고자 하였다.

나) 양돈 필드 실험

나)-1 1차 (예비 실험)

(1) 개요

- GABA 및 라이신이 결합된 유기태 미네랄의 섭취로 인해 자돈의 철분주사제 대체 여부를 확인하기 위한 실험임. 급여시기는 포유기간부터 포유자돈의 사료에 첨가 급여하여, 철분주사를 처치하는 정상 자돈과 체중을 비교하고자 함. 아울러 자돈의 혈액을 채혈하여 철분 및 이와 관련된 항목을 분석하였음

(2) 방법

- 이천 소재 D농장
- 총 실험 두수 : 모돈 3두 및 모돈으로부터 분만되는 자돈들
- 계체 시기 : 자돈 64일령, 채혈 시기는 3일령, 27일령
- 급여 시기 : 분만 10일 전 포유모돈 사료에 GABA-Fe 급여 및 자돈의 이유시까지 급여
- 실험군 : 대조군 (정상 사육군, 철분 주사 O)
실험군 (철분 주사 X, GABA-Fe 급여)
- 혈액 분석 항목
: Fe, TIBC, UIBC, Ferritin

(3) 이천 D 농장 실험 결과

(1) 64일령 계체 결과

D 축산 1차 예비실험 64일령 계체 결과		
	철분주사	철분주사 X(GABA-Fe)
체중 (kg)	대조군	실험군
64일령	17.9	17.8

- 1차 실험이므로, 실험군 중 철분주사를 처치하지 않고 GABA-Fe도 첨가 급여하지 않은 그룹은 우선적으로 제외 시켰으며, 2차와 3차 실험에서 실험군을 추가할 예정이었음.

- 또한, 계체를 원하는 날짜 (원하는 일령) 에 할 수 없었으며, 농장의 여건에 맞추어 계체를 할 수 있었음. 60일령에 무게를 재고 싶었으나 농장의 여러 이유가 있었기 때문에 자돈 64일령에 계체를 하였음.

- 실험 결과 대조군의 체중은 17.9 kg 이었으며, 실험군은 17.8 kg 이었다. 실험의 시작 전 예상과는 달리 철분주사를 하지 않고도 동등한 효과를 나타내었음.

- 실험연구원은 농장에 상주할 수 없기 때문에 실험 중간중간에 농장장에게 전화를 해서 실험 진행 여부와 자돈의 상태를 파악하였음. 실험 초기 실험군의 자돈이 대조군에 비해 핏기가 없는 듯하였으나, 활동상태와 모돈의 젖을 먹는 것 및 사료 섭취에는 큰 차이는 없었다고 함. 시간이 지남에 따라 대조군과 큰 차이는 모르겠으며, 피부 혈색도 점차 대조군의 자돈과 비슷하게 돌아왔다고 하였음.

(2) 혈액 분석 결과

- 혈액분석은 돼지 전용 혈액자동분석기로 분석하였으며, Fe, TIBC, Ferritin을 분석하였다. 분석 결과는 아래 표와 같다.

	철분주사	철분주사 X(GABA-Fe)
Fe (ug/dL)	대조군	실험군
3일령	63.7±25.7	83.0±11.2
27일령	147±59	45±38.2
TIBC (ug/dL)	대조군	실험군
3일령	373±91.1	424±111
27일령	390±102	670±167
Ferritin (ng/mL)	대조군	실험군
3일령	0.72±0.1	0.77±0.08
27일령	0.70±0.1	0.68±0.1

- 철분 분석 결과 3일령에서는 대조군이 63.7 ug/dL, 실험군이 83.0 ug/dL으로 오히려 대조군이 더 낮았지만 유의한 차이는 없었음. 하지만, 27일령에는 대조군에서 147.0 ug/dL, 실험군이 45.0 ug/dL이었으며, 이는 대조군에 비해 실험군의 철분이 약 70% 감소한 수치이다.

- TIBC는 혈액에서 transferrin 으로 철과 결합할 수 있는 capacity, 즉 총 결합 가능량이다. TIBC는 혈액을 채취해서 혈액이 포함할 수 있는 최대의 iron량을 이용하여 간접적으로 transferrin을 계산하여 측정하는데, 이는 transferrin이 most dynamic carrier이기 때문이다. Iron deficiency anemia인 경우, serum Fe는 낮고, transferrin과 TIBC는 높다. 이는 간에서 거의 없는 iron이라도 이용하기 위해 transferrin을 많이 생성하기 때문. 이와는 반대로 Anemia of chronic disease인 경우는 Fe은 낮고, Transferrin과 TIBC는 낮음. 이유는 체내에서 transferrin 대신 ferritin을 더 많이 생성하는데, 이는 체내 병변에서 철을 사용하지 못하게 하기 위함임. 이는 체내의 증가된 hepcidin 생성으로 조절.

- TIBC (total iron binding capacity) 결과 3일령에서 대조군이 373 ug/dL, 실험군이 424 ug/dL으로 유의한 차이는 없었으나, 7일령에는 대조군이 390 ug/dL, 실험군이 670ug/dL으로 크게 증가하였다.

- Ferritin은 iron-free apoferritin 과 철이 결합한 철 저장 단백질로 대부분 간, 비장의 실질세포, 대식세포, 골격근, 골수의 조식구 등에서 발견되며 혈청에서는 극미량만 존재함. Ferritin이 체내 철 저장량과 상관없이 상승하는 경우는 조혈장애로 ferritin이 이용되지 않는 재생불량성 빈혈, 손상된 간세포에서 ferritin 이 유리되는 간질환, 악성종양, 신장질환, HIV를 포함한 여러 가지 감염증, 루프스와 같은 자가면역질환 등 다양하다.

- Ferritin 은 3일령과 27일령 모두 큰 차이는 없었다.

나)-2 2차 필드 실험

- 이천소재 D 축산 (동일한 농장)

- 방법은 1차 실험과 동일함, 단 계체일자는 19일령과 49일령으로, 채혈은 49일령으로 변경되었음.

D 축산 2차 실험 19, 49일령 계체 결과			
	철분주사	철분주사 X(무첨가)	철분주사 X(GABA-EPO)
체중 (kg)	대조군	실험군	실험군
19일령	6.03	5.56	5.43
49일령	14.8	12.5	14.8

2차 실험 D 농장 혈액분석 결과

Group	Total Protein	AST	T.Cholesterol	Fe
	(g/dL)	(U/L)	(mg/dL)	(ug/dL)
대조군	5.23 ± 0.84	96.1 ± 16.03	139.72 ± 13.5	196.0 ± 64.5
철분주사X (무첨가)	5.43 ± 0.5	77.4 ± 76.7	164.8 ± 29.4	38.8 ± 25.4
철분주사X (GABA-Fe)	5.27 ± 0.55	62.7 ± 22.2	163.1 ± 21.2	124.1 ± 8.1

- 혈액 내 단백질의 변화를 보기 위해 total protein (혈청 총단백량) 을 분석하였음. Total protein은 알부민, 글로불린 등의 총합으로 간질환이나 급성 간염과 같은 질환을 확인하기위해 분석함. 모든 실험군 내에서 유의한 변화는 없었음.

- AST (aspartate aminotransferase, 아스파르테이트 아미노전달효소) 는 대표적인 간기능 분석 지표이며, 간세포 내에 존재하는 효소들로 주로 간세포가 손상을 받는 경우에 혈중으로 방출되어 수치가 증가함. 간은 생체에서 단백질 합성, 포도당 및 기타 탄수화물 대사, 핵산 대사, 지질 대사, 약물 대사 등을 담당하는 중요 장기로서 생명 유지에 필수적인 장기임. 하지만, 여러 질환들로 인해 간에 손상을 줄 수 있고, 이러한 질환들을 정확히 진단하는 것이 치료 방침 결정에 중요한 토대가 되며, 여러 가지 생화학적 검사들을 종합적으로 해석하는 것이 필요.

- 간 내 병변을 확인하기 위해 AST를 확인하였으나 유의한 차이는 나타나지 않았음. 사료 외에 첨가된 제제로부터 간 세포의 손상여부를 확인 하였으나 간손상은 나타나지 않았음.

- Total cholesterol 도 AST와 동일한 결과가 확인됨.

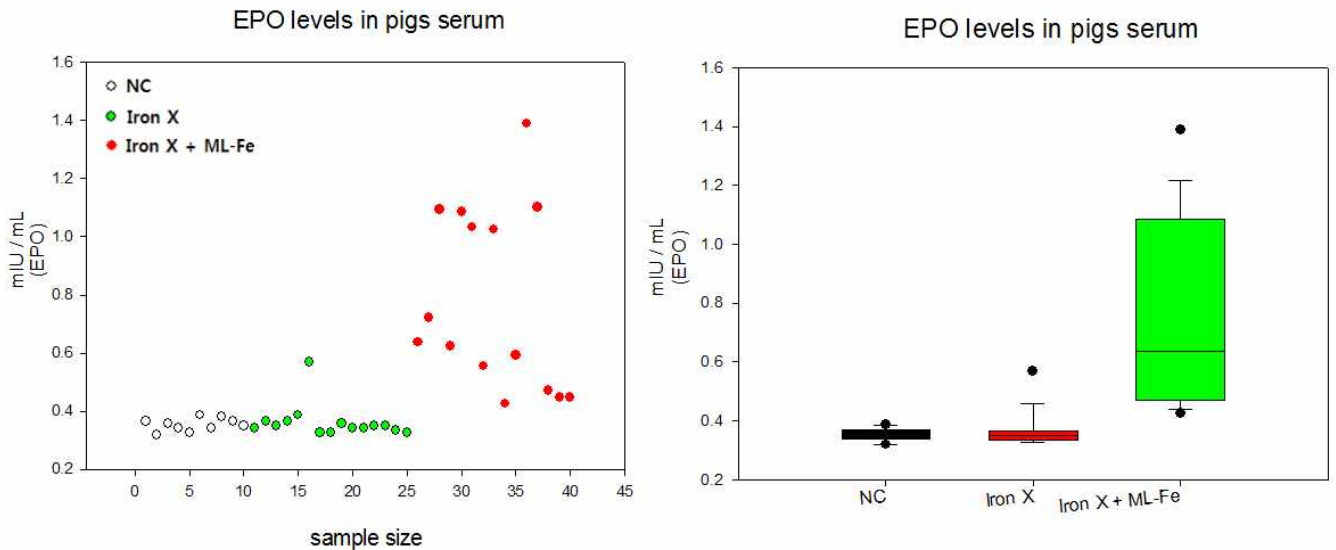
- Fe은 대조군인 196.0 ug/dL, 양성대조군은 38.8 ug/dL, GABA-Fe 군은 124.1 ug/dL이었음. 1차 실험 결과에서는 Fe의 수치가 대조군과 GABA-Fe 군은 매우 큰 차이였으나, 2차 실험에서는 차이가 크게 감소하였음. 1차 실험 채혈은 27일령이었으며, 2차 실험 채혈은 49일령이라는 차이가 있으며, 일령이 지날수록 체내 철분량이 증가되는 것으로 확인됨.

Group	RBC	HGB	HCT	RBC Indices		
	(×10 ⁶ cells/μL)	(g/dL)	(%)	MCV	MCH	MCHC
				(fL)	(pg)	(g/dL)
대조군	6.3 ± 0.46	13.1 ± 0.37	41.1 ± 0.91	65.5 ± 3.34	20.9 ± 0.80	31.9 ± 0.72
철분주사X (무첨가)	5.4 ± 0.64	7.8 ± 0.88	26.0 ± 2.71	48.0 ± 3.29	14.5 ± 1.27	30.2 ± 1.43
철분주사X (GABA-Fe)	5.9 ± 0.46	10.1 ± 1.23	32.8 ± 3.94	54.5 ± 53.03	17.6 ± 1.79	31.0 ± 3.51

- 각 군당 전혈 내 CBC분석 결과 빈혈에 가장 중요한 수치인 RBC (적혈구) 과 HGB (hemoglobin) 는 양성대조군에서 모두 빈혈에 해당하는 수치를 나타내었음. GABA-Fe 그룹의 수치는 대조군에 비교할 때 두 항목 모두 감소하였으나, 양성대조군에 비해서는 유의하게 증가하였음. 1차 실험과 2차 실험의 결과 모두 철분 근육주사를 한 그룹보다 첨가제 Fe을 섭취시킨 그룹이 철분과 RBC, HGB 수치가 높을 수 없다는 것을 보여준다.

	WBC Differential Counting (%)					
	NEU	LYM	MONO	GRANULE	BASO	LUC
대조군	0	82.6 ± 2.47	3.36 ± 0.44	14.02 ± 2.09	0	0
철분주사X (무첨가)	0	77.2 ± 2.41	4.04 ± 0.34	18.8 ± 2.34	0	0
철분주사X (GABA-Fe)	0	79.1 ± 1.64	4.1 ± 0.33	16.7 ± 1.83	0	0

- 자돈 혈액 전혈을 slide smear 기법을 활용하여 백혈구 differential counting을 실시하였음. 분석 결과 neutrophil (호중구), monocyte (대식구)에서는 실험군 별 차이는 없었다. Basophil (호염기구), LUC (large unstained cell)는 검출되지 않았다. Lymphocyte (림프구)와 granulocyte (과립구)는 대조군과 비교시 양성대조군과 GABA-Fe 군에서 다소 차이가 있었지만, 정상범위 이내였다.



- 자돈 혈액 내 erythropoietin (EPO) 수치

- EPO란? (Wikipedia) : 적혈구 생성에 관여하는 당단백질 호르몬으로 적혈구 생성에 관여한다. EPO는 단백질 신호 분자인 cytokine으로 적혈구의 전구체의 형태로 골수에 존재한다. 헤마토포이에틴으로도 불리며, 신장의 간질세포 섬유아세포와 간에서 만들어진다. 태아의 시기동안은 간에서 생성이 되지만, 성체의 시기에는 신장에서 주로 생성된다. 추가적으로 EPO는 다른 생체 기능도 있다. 신경손상에 대한 뇌의 반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 상처의 회복과정에도 포함된다고 알려져 있다.

외인성 EPO (endogenous EPO)는 신체 성능을 향상시키는 약물로 사용될 수 있으며, erythropoiesis-stimulating agent (ESA)로 분류되어 도핑테스트 물질이기도 하다.

EPO는 적혈구 생성에 필수적인 호르몬이다. 이것이 없다면 적혈구를 생성할 수 없으며, 체내가 저산소증의 상태라면, 신장은 EPO를 생산, 분비하여 적혈구의 생산을 늘리게 한다. EPO는 인간의 골수에 있는 적혈구의 전구체세포에 영향을 주어 세포를 세포자살로부터 보호하게 된다. 또한, hepcidin의 흡수를 억제시켜 철이온의 흡수를 증가시킨다.

나-3. 제품 안정성 시험

1. GABA의 안정성

- GRAS Notice for gamma aminobutyric acid, NO. 595.

Lot Number	Specification (%)	Initial (%)	After stored at 20°C (%)	Difference (%)
GABA Content				
7B09	>80	85.2	87.0 (at 11 weeks)	1.8
6L25		88.1	90.1 (at 17 weeks)	2.0
6K22		87.4	87.8 (at 18 weeks)	0.4
Moisture				
7B09	<5	1.9	2.0 (at 11 weeks)	0.1
6L25	<5	1.6	1.5 (at 17 weeks)	-0.1
6K22	<5	1.7	1.6 (at 18 weeks)	-0.1

GABA = gamma-aminobutyric acid

Bulk stability studies also indicate that the GABA 20 formulation is stable for up to 27 months under ambient conditions (Table II.C-8). Based on this the shelf-life was set at 2 years.

Figure II.C-1 Bulk Stability of GABA Powder (Lot No. 4H11) Under Heated Conditions Over a Period of 60 Minutes

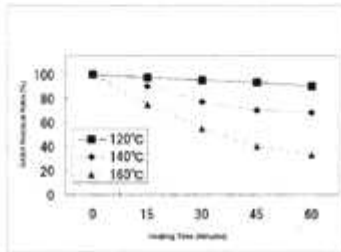
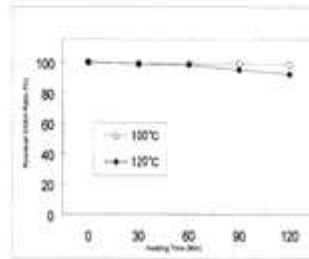


Figure II.C-2 Stability of a 5% GABA Solution (Lot No. 4H11) Under Heated Conditions for a Period of 120 Minutes



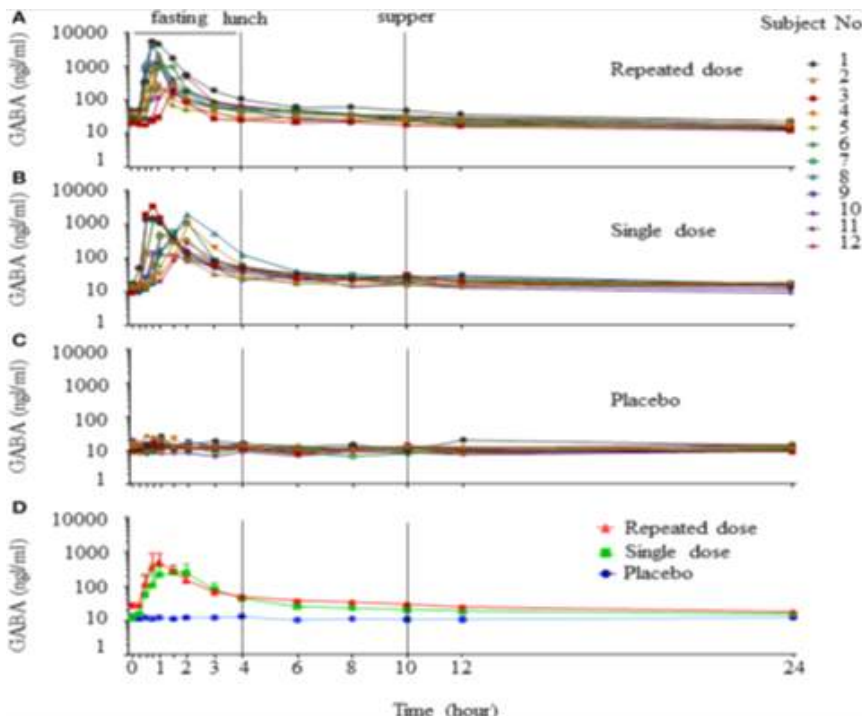
- GABA 체내 잔류 문헌

- Frontier in Pharmacology, 2015. November 10; 6:260

Study of GABA in healthy volunteers: Pharmacokinetics and pharmacodynamics.

- A: 3회 반복섭취, B: 단회 섭취, C: Placebo (투여량: GABA 2g tablet)

- GABA 경구 섭취시 약 5시간 후면 분해되어 혈중농도 검출이 안됨.



나-4. 제조 공정 표준화를 위한 지표성분 함량 측정 확립

1. GABA 분석 방법

가) 시료 전처리 - 아미노산 추출

- 1) 시료 1.0g을 칭량하여 100mL 정량플라스크에 넣은 후 mess up (3차 D.W.)
- 2) sonicatin 30 min, 20°C
- 3) 방냉 후 표준용액에 맞추어 희석하여 사용 (희석 - 3차 D.W.)
- 4) 0.45 um 필터로 여과하여 시료액 제조
- 5) 표준물질도 같은 방법으로 제조

*표준품 : GABA (sigma - 3차 증류수로 용해)

농도 1, 3, 5, 7, 10 ug/mL (3차 D.W. 희석)

나) 유도체화

- 1) 10 ul 시료 + 50 ul borate buffer+ 640 ul 3차증류수 + 10 ul O-phthalaldehyde(opa)

solution

- 2) 혼합액을 injection
- 3) ***OPA 반응 후 Injection 반응까지는 5분 이내에 진행되어야 함(일정한 시간으로 진행
- **borate buffer(0.4N in water, ph 10.2

다) 분석 조건

1) HPLC 기기 : waters

2) FLDetector : Emission 450nm, Excitation 340 nm (OPA)

3) Column : ZOBRAx Eclipse AAA (4.6 x 150 mm, 5um)

4) 용매 조건

Mobile Phase A : 40mM Sodium phosphate 0.1% phosphoric acid , pH 6.8

Mobile Phase B : 3차DW / Acetonitrile / Methanol(10 : 45 : 45 v/v%)

Time	Flow Rate	Mobile phase A	Mobile phase B
0.0	1.5	90	10
1.90	1.5	90	10
18.10	1.5	43	57
18.60	1.5	20	80
22.30	1.5	20	80
23.20	1.5	90	10
26.00	1.5	90	10

4) Injection Volume : 5uL

5) Column Temperature : 40°C

6) Sample Temperature : 20°C

7) Running time : 30 min

* GABA (A2129)

** borate buffer (sigma 5061-3339)

***OPA Reagent (sigma 5061-3335)

나-5. 제품 첨가비

철분주사제		철분 대체제 첨가제			
		원료비(kg)	첨가량 (ppm)	첨가비 (원/kg)	
		GABA	10,000	50	0.50
		유기태 철분	12,000	100	1.20
가격	25,000	piperine	700,000	0.5	0.35
용량	100	부형제 및 가공	600(/ton)		0.6
mL 당 가격	250				2.65
투여량 (mL)	1	사료섭취량	포유모돈	자돈	
투여 횟수	1		70kg(2주간)	20kg (4주간)	90
주사제 첨가비	250			첨가비	238.5

- 일반적으로 사료회사에서 사료첨가제의 첨가비로 허용할 수 있는 금액은 3원/kg 이하이다.
- 본 연구개발 제품의 첨가비 계산시 2.38원/kg 으로 사료회사 마케팅 시 접근가능한 금액으로 계산되었다.

나-6. GABA의 사료내 안정성

- 사료 내 첨가된 GABA의 안정성 테스트는 주관기관의 제품 출시 전 수행되었었다. 본 제품의 적정 보관온도에서 6개월간 보관하였고, 1개월 간격으로 샘플링하여 GABA 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석 결과 53 page에 나와 있는 GABA의 안정성 결과와 같은 결과를 확인하였다. GABA는 체내에 들어가기 전 외부에서는 그 함량이 매우 소량만 감소된다는 연구결과는 이미 발표되어 있으며, 본 제품 내 GABA 함량 변화 실험에서도 동일한 결과가 확인되었다.

나-7. 돼지에서의 GABA 섭취에 의한 부작용 가능성

- 돼지에게서 GABA에 대한 부작용은 보고되고 있지않다.
- 인체에 대한 GABA의 부작용은 매우 드물게 보고되고 있으며 그 증상으로는 호흡곤란, 심박수 증가, 얼굴 및 목의 욱신거림, 빠른 호흡, 졸음 있다. 인체에 대한 부작용 보고는 GABA tablet을 복용할 때 나타나며 일반적으로 1회 이상 700mg의 GABA를 섭취하였을 때 나타난다.
- 본 실험에서 돼지에 급여한 GABA는 그 함량보다 낮으며, 더욱 중요한 것은 단회에 많은 양을 섭취시키는 것이 아니고 사료에 첨가하여 소량씩 섭취된다. 또한, 앞서 작성한 내용을 토대로 소량씩 섭취하는 기간에도 GABA는 체내에서 분해되므로 인체에서 같은 부작용은 발생하지 않을것이라 예상된다.

1. 성분등록 제출 서류

사료검정증명서						
(34025) 대전광역시 유성구 테크노2로 199(용신동, 미전테크노월드1차 401호, 408호, 411호) 한국단미사료협회 사료연구소 담당부서 품질안전관리 책임자 김충익 담당자 강영규 전화번호 (044) 863-5790 팩스번호 (044) 863-5795						
문서 번호 한단월 분석(검정) 제2018-19850호						
시행일 2018년 10월 11일						
수신 (주)미래생명자원						
접수번호	기9-633	접수연월일	2018년 09월 28일			
검정번호	4009-594	검정일	2018년 10월 11일			
제조수입업자	회사명 (주)미래생명자원 성명 김성진 주소 서울시 송파구 법원로9길 26 D동 506-512호 (문정동, 에이치비즈니스파크) 전화번호 02-2203-7397 팩스번호 02-2203-7398					
제품명	ML-Fe					
사료명칭	양축용배합사료					
사료상태	개봉					
제조 또는 수입 년월일						
의뢰성분	단위	검정결과	검정방법	비고		
수분(135도,2시간)	%	10.52	사료표준분석방법			
조단백질	%	14.52	사료표준분석방법			
조지방(도E)	%	0.95	사료표준분석방법			
조섬유	%	31.24	사료표준분석방법			
조회분	%	15.66	사료표준분석방법			
칼슘(Ca)	%	0.21	사료표준분석방법			
인(P)	%	0.03	사료표준분석방법			
라이신	%	0.08	사료표준분석방법			
위 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 분석결과이며 용도여의의 상업적인 광고 및 선전 등에 사용할 수 없습니다.						
2018년 10월 11일						
한국단미사료협회 사료연구소						
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">용도</td> <td style="width: 50%;">기타 참고용</td> </tr> </table>					용도	기타 참고용
용도	기타 참고용					
<small> * 시험목적 : 성분등록용의 동시인 "사료명칭"을 기재 * 시료상태 : 양(질)의 균질성으로 균질한 상태로서 표준화된 시료여야 하며, 불균질 시료는 시험결과를 할 수 없다(광부) * 제조 또는 수입 연월일 : 제품 포장재에 표시하지 않은 제조 또는 수입 연월일 기재 </small>						

210mmx287mm [복사지 80g/㎡ (대용량판)]

시험(검사) 성적서

접수번호(문서번호)	성-18-1016(마-18-1016)		결 재	담당	승인
의뢰자/의뢰업체명	박근태 / ㈜미래생명자원			10월 23일	10월 23일
분석자	지기쁨	접수일자	2018.10.16		
시료명	ML-Fe	통보일자	2018.10.23		
분석항목	유익균 발효 추출물 (GABA)				
주소	서울시 송파구 법원로 9길 26, D동 506~512호(문정동, 에이치비즈니스파크)				
전화번호	02-2203-7397	팩스번호	02-2203-7398		
실험방법	HPLC Determination of GABA (Agilent)				
번호	시료명	가비함량(%)	비고		
4	ML-Fe	11.11	2018.10.12 생산		

위의 내용은 의뢰자가 제공한 시료에 대한 시험 결과이며, 이 시험 성적서는 용도 이외의 상업적인 광고 및 선전, 소송 및 기타 법적 요건으로 사용할 수 없습니다.

2018. 10.23.

(주) 미래생명자원
신소재연구소(인)

MILAE BIORESOURCES Co., Ltd.

New Materials and Resources Development Research Center
서울시 송파구 법원로 9길 26, D동 506~512호(문정동, 에이치비즈니스파크)
Tel: 02-2203-7397 Fax: 02-2203-7398



사료검정증명서

(34025)	대전광역시 유성구 대덕로2로 199(유산동, 미진테크노빌드1차 401호, 408호, 411호)			
한국담미사료합계 사료연구소	담당부서	품질인진관리 책임자	김종익	담당자 김영규
	전화번호	(044) 863-5790	팩스번호	(044) 863-5795
문서 번호	한단체 분석(검정) 제2018-21763호			
시행일	2018년 11월 05일			
수신	(주)미래생명자원			
접수번호	기11-20	접수연월일	2018년 11월 01일	
검정번호	4011-1	검정일	2018년 11월 05일	
제조·수입업자	회사명 (주)미래생명자원			
	성명 김성진			
	주소 서울시 송파구 법원로9길 26 D동 506-512호 (문정동, 에이치비즈니스마크) 전화번호 02-2203-7397 팩스번호 02-2203-7398			
제품명	엘엘에프이			
사료명칭	기초에합사료(배합사료원료)			
사료상태	개봉			
제조 또는 수입 연월일	2018년 10월 02일			
의뢰 성분	단위	검정결과	검정방법	비고
철(Fe)	%	5.60	사료표준분석방법	



미래자원 ML

MILAE RESOURCES ML Co., Ltd.

서울특별시 송파구 오동로 11길 7제이타워 7층
J-Tower 7FL, 7, Oyeum-ro 11-gil Songpa-gu, Seoul 138-827, Korea
tel: 82-2-2203-7397 fax: 82-2-2201-7398 www.milaeML.com

제조 공정도

제품명 : ML-Fe

ML-Fe 제조 공정도는 하기의 사항이 틀림없음을 증명합니다



Han Jong-kwon
QC Manager

2-2. 연구개발 수행내용 - 건국대학교

1) Piperine에 의한 세포 독성, 세포증식 변화 확인

가) 배경

세포는 Porcine Kidney와 면역세포로부터 유래된 LLC-PK1 (ATCC), LLC-PK13 (ATCC), LLC-PK15 (ATCC)를 사용하여 Gamma-Amino Butyric Acid (GABA)와 Piperine을 농도별로 처리 시, cell viability, cell proliferation 를 확인.

나) 결과

→ ABA는 0.01ug/ml 부터 4mg/ml까지 처리한 뒤 세포 독성을 확인하였는데, 고농도인 4mg/ml까지 처리 시 세포 독성을 나타나지 않았으며, 오히려 cell growth에 증가를 보임.

→Piperine은 0.1uM 부터 100uM 까지 처리 시 세포독성을 확인한 결과 50uM에서부터 cell death가 일어났으며 200uM에서는 60%이상 cell death가 일어났음. 그러므로 Piperine은 50uM 이내로 실험을 진행해야 한다고 판단되어 짐.(Figure.1)

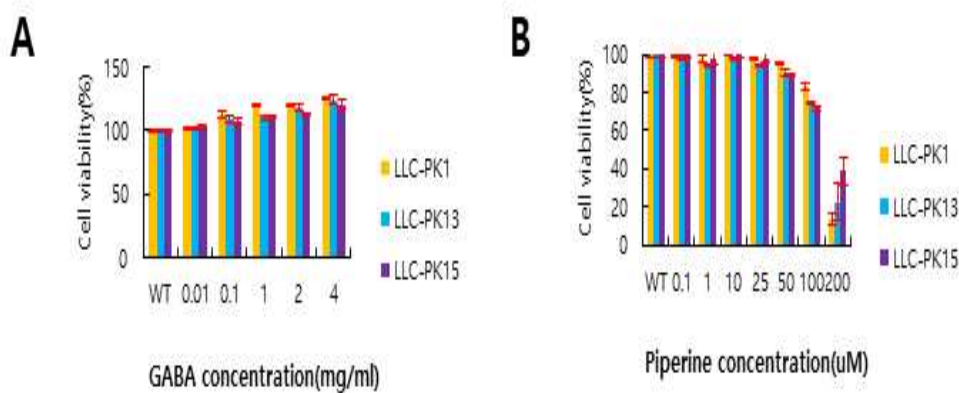


Figure 1. Cell viability of GABA and Piperine in Porcine kidney cell lines. (LLC-PK1, LLC-PK13, LLC-PK15).

2) Porcine Kidney cell lines에서 GABA와 Piperine 기능 분석 1.

가) 배경

GABA 처리 시 Erythropoietin(EPO) 와 Erythropoietin-Receptor(EPOR)의 mRNA 및 단백질 Level에서 변화 조사.

나) 결과

→ GABA를 돼지 세포주에 농도별(0/0.2/2/20/200/2000ug/ml)로 처리한 뒤 12hr incubation 후 Erythropoietin(EPO)와 Erythropoietin receptor(EPOR)의 발현 변화를 RT-PCR로 확인하였음. GABA 농도가 증가함에 따라 EPO와 EPOR 발현이 증가 하였고, 이러한 사실이 mRNA level이 아닌 Protein level에서도 증가하는지 확인하기 위해 FACs를 진행하였음.

→LLC-PK1 cell line과 LLC-PK15 cell line에서는 GABA 농도 dependent하게 EPO와 EPOR의 발현이 증가하지만 LLC-PK13 cell line에서는 EPO는 증가 경향이 있지만 EPOR는 증가함이

보이지 않았음. (Figure.2)

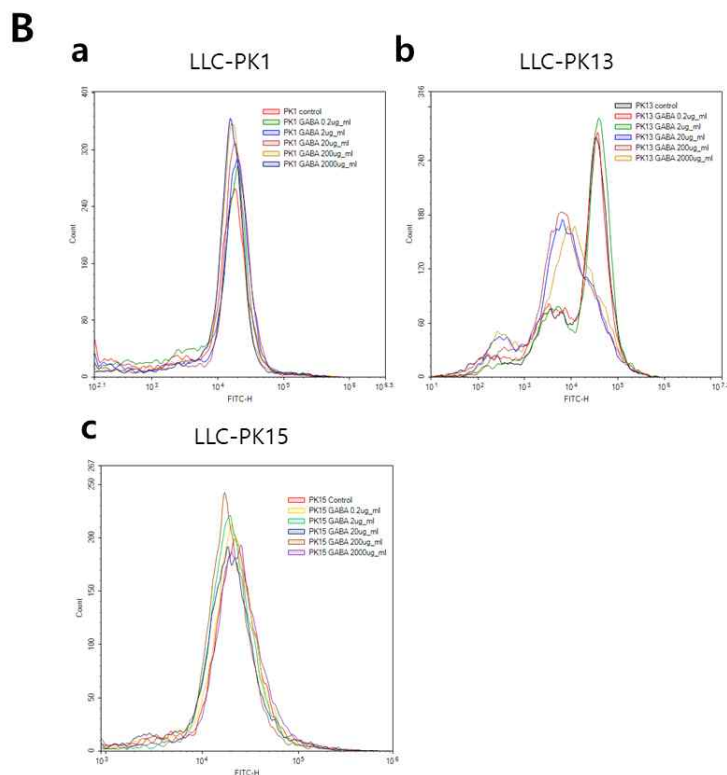
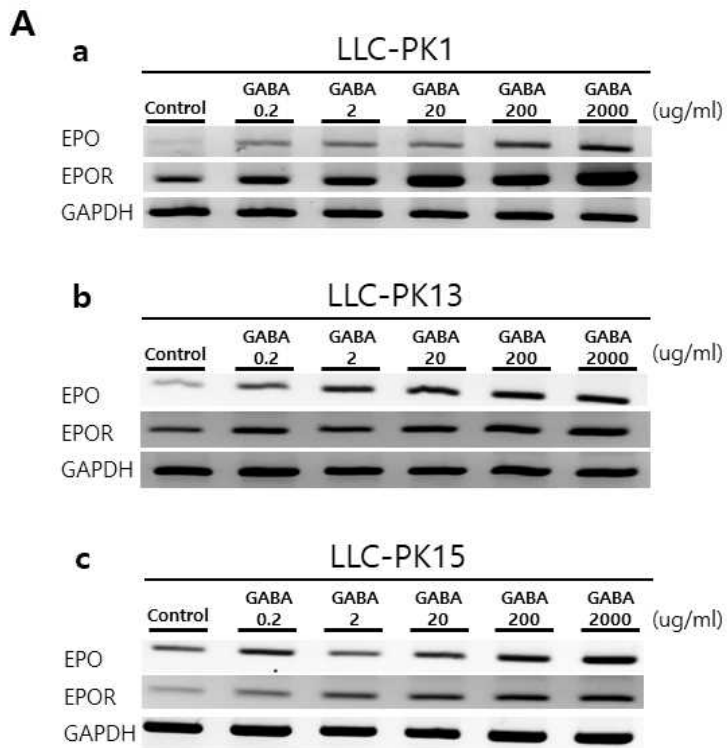


Figure 2. GABA upregulates Erythropoietin(EPO) and Erythropoietin receptor(EPOR) in Porcine kidney cell lines. (LLC-PK1, LLC-PK13, LLC-PK15)

3) Porcine Kidney cell lines에서 GABA와 Piperine 기능 분석 2.

가) 배경

Piperine 처리 시 Erythropoietin(EPO)와 Erythropoietin-Receptor(EPOR)의 mRNA 및 단백질 Level에서 변화 조사.

나) 결과

→ Piperine을 돼지 세포주에 농도별 (1/5/10/25/50uM)로 처리한 뒤 12hr incubation 후 EPO와 EPOR의 mRNA 발현 변화를 확인하였음. EPO는 piperine 5/10/25uM 에서는 농도 dependent하게 발현이 증가하였으나 세포독성을 갖는 50uM에서는 발현이 감소하였음. 이와는 다르게 EPOR은 piperine 농도 dependent하게 발현이 증가하였음. 이 결과를 통해 Piperine 또한 Porcine Kidney cell lines에서 EPO와 EPOR의 발현을 증가시키는 물질임을 확인할 수 있었음.(Figure.3)

A

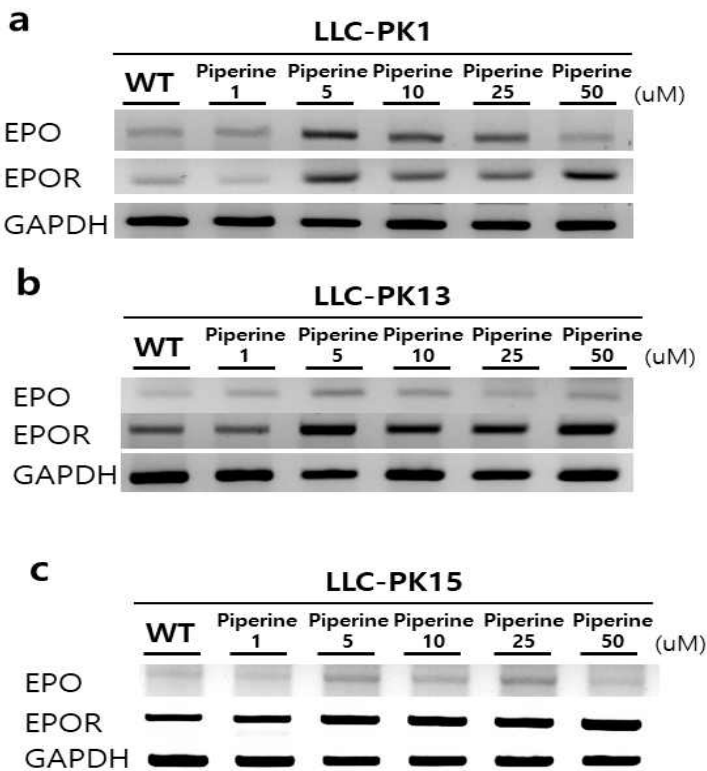


Figure 3. Piperine upregulates Erythropoietin and erythropoietin receptor in Porcine kidney cell lines (LLC-PK1, LLC-PK13, LLC-PK15).

4) Procine Kidney cell lines에서 GABA와 piperine 시너지 효과 확인

가) 배경

GABA와 Piperine의 시너지효과에 의한 Erythropoietin(EP0)와Erythropoietin-
-Receptor(EPOR)의 발현 증가 분석.

GABA와 Piperine이 시너지를 갖는다면 두 물질을 더 낮은 농도로 처리하여도 EPO와 EPOR 발현을 증가 시킬 것이기에 다음과 같은 시너지 실험을 진행함.

나) 결과

→ LLC-PK1 Cell line에 GABA(0.2/2/20ug/ml)와 Piperine(1/5uM)을 동시에 처리한 뒤 EPO와 EPOR의 발현을 확인하였음. Piperine 50uM와 GABA 0.2, 2, 20ug/ml 동시 처리한 샘플에서는 plus effect가 확인되었으며, Piperine 1uM과 GABA 20ug/ml을 동시에 처리한 샘플에서는 Synergy effect가 확인 되었음.

따라서, 돼지 사료에 GABA와 Piperine을 함께 첨가제로 사용한다면 조혈작용 증진에 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단됨. (Figure.4)

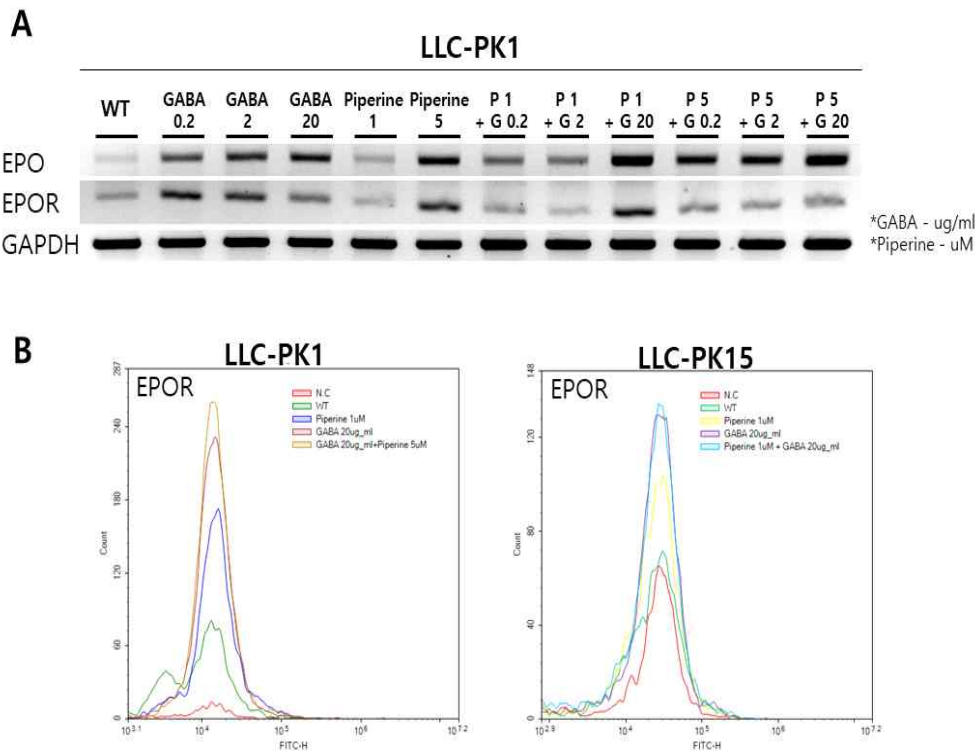


Figure 4. GABA and Piperine synergistically upregulate EPO and EPOR in Porcine kidney cell lines.

5) GABA의 EPO, EPOR 발현 기전과 MAPK pathway의 관련성에 대하여 연구

1)배경

세포에 GABA를 처리한 뒤 Proliferation과 관련 있는 MAPK를 Western blot으로 확인.

P38 inhibitor인 SB203580과 JNK inhibitor인 SP600125를 전처리 후 GABA를 처리한 뒤 RT-PCR과 FACs로 EPOR 발현 변화를 확인.

2) 결과

LLC-PK1 cell line과 LLC-PK15 cell line에서는 GABA 처리 후 1시간 이내에 MAPK의 P38, JNK phosphorylation이 증가하였으나 ERK에서는 변화가 없었음. 이를 통해 GABA 처리 후 EPO, EPOR 발현은 MAPK의 P38과 JNK pathway와 연관됨을 추측할 수 있었음.

MAPK와의 관련성을 정확하게 확인하기 위해 Inhibitor 실험 또한 추가로 진행하였는데, GABA 단독처리 시 EPOR의 발현이 증가하였으나 P38 inhibitor SB203580과 JNK inhibitor 인 SP600125를 전처리한 후 GABA를 처리시 EPOR의 발현이 증가하지 않았음. 따라서 GABA에 의한 EPOR 발현변화는 MAPK의 P38과 JNK pathway와 연관되어 있는 것을 알 수 있었음. (Figure.5)

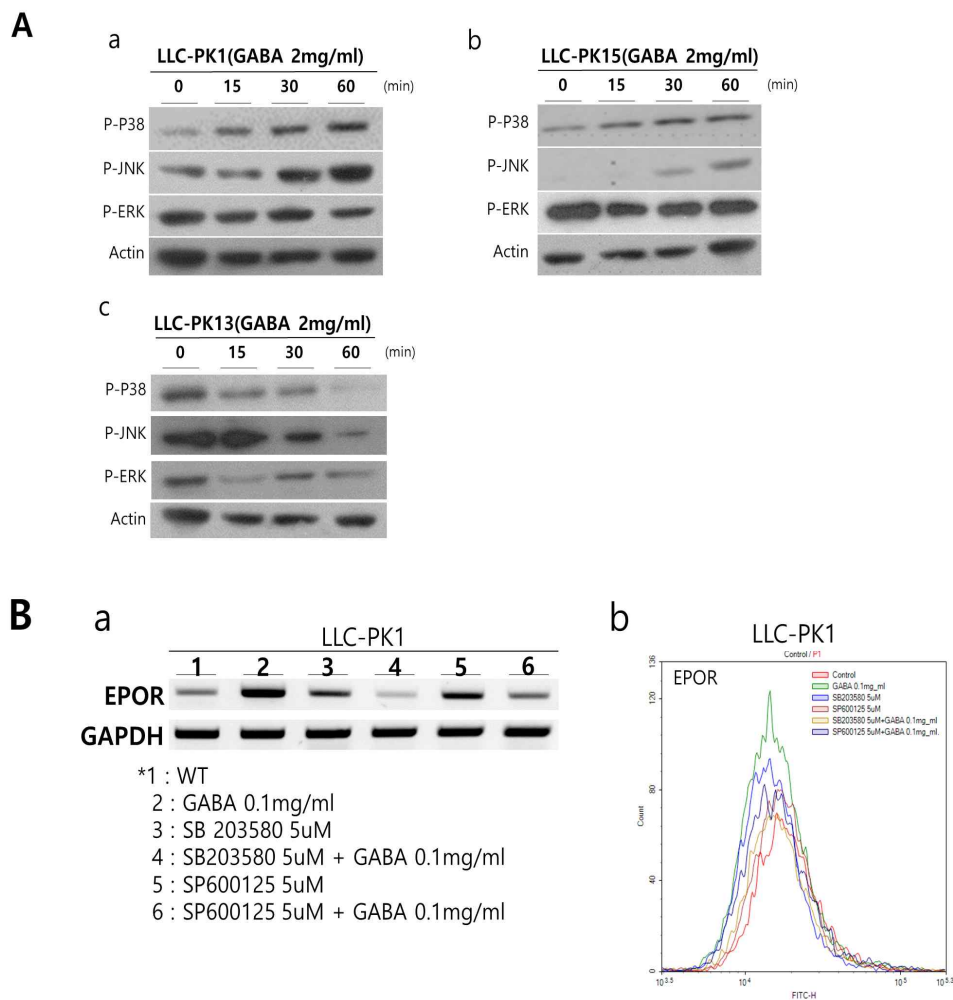


Figure 5. EPOR upregulation by GABA is dependent on P38 and JNK of MAPK.

6) 돼지세포에서 조혈작용에 관여하는 유전자 집중적 Screening

1) 배경

현재 마크로젠 사에 Micro array를 위해 LLC-PK1 cell line에 “Control / GABA 20ug/ml

/ Piperine 1uM/ GABA 20ug/ml+Piperine 1uM”를 처리한 뒤 mRNA를 prep하여 sample을 의뢰한 상태임.

2) 결과

→ GABA와 Piperine 기능과 관련된 유전자를 Screening 하기 위해 분석결과를 기다리는 중임.(Figure.6)



Original Sample QC

General Information					
Order Number	171114QE-01	Name of Customer	이윤미	Date of Order	2017-11-14
Final QC Result of DNA sample(s)					
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Final QC Result of RNA sample(s)					
Arrival Date	Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
2017-11-14	2017-11-14	4	4	0	0

The QC criteria refer to the specification requirements of a single run. In any cases, we may encounter the shortage of sample volume or amount due to various reasons such as a cDNA synthesis failure. In these cases a request of an additional sample will be inevitable. Therefore, we recommend double the amount to be supplied at first place to minimize any delay of the whole procedure.
 * Pass : Proceed with the next experimental process.
 * Fail : Further processes are on hold until the replacement samples received.
 We do not recommend in proceeding further steps until a specific instruction was given from the client.
 * Hold : A specific instruction should be given by the client for further processing as the QC pattern may be triggered by the sample nature.
 *** MacroGen does not proceed the next step until we have received your permission.

Figure 6. Micro array in progress

7) 돼지세포에서 조혈작용에 관여하는 유전자 집중적 Screening

가) 배경

조혈작용과 관련된 유전자를 집중적으로 Screening을 위한 Primer를 참고논문과 프로그램을 통해 디자인함.

나) 결과

돼지에 조혈작용에 관련된 gene의 primer 정보에 대한 참고자료는 거의 없다고 봐도 무방한 상태임. 현재 프로그램을 통해 디자인한 primer를 PCR test 진행중에 있음. (Table.1)

8) Porcine Kidney cell lines에서 GABA와 Piperine의 기능 분석 완료

가) 배경

- 2차년도 연구 결과로 Porcine Kidney cell lines에 GABA와 Piperine 처리는 Erythropoietin (EPO)와 Erythropoietin-Receptor (EPO-R) mRNA 발현을 증가시키며, 이 둘은 시너지 효과를 가진다는 것을 관찰함. 또한, GABA 처리 시 EPOR 발현변화 원인은 MAPK와 관련이 있다는 것을 western와 FACs를 통하여 확인 함. 이어서, 당해연도에는 GABA와 Piperine 처리에 의한 EPO와 EPO-R의 발현변화가 MAPK에 의해 조절되는지도 확인함.

나) 방법

- LLC-PK1을 2x10⁶ cells을 DMEM에 배양한 후에 저해제 SB203580 50 μM 혹은 SP600125 10 μM을 30분 전 처리하였음, 이에 GABA 0.1 mM와 Piperine 5 μM을 24시간 처리하였음. 이후 Western을 10-20 μg의 protein을 이용하여 진행함. RT-PCR은 위하여 RNA는 TRIzol을 이용하여 추출 후, cDNA는 AccuPower RT/PCR PreMix (Bioneer)을 이용하여 생산함. EPO와 EPO-R의 발현을 조사하기 위해 제작

한 올리고는 다음과 같다: EPO sense, 5'-GTGCAAACCTTTTCCGCAACT-3' and anti-sense, 5'-TGTTGTGGGAGTCTCCATGA-3'; EPO-R sense, 5'-AGCTGTGGCTGTACCAAACCTG A-3' 그리고 anti-sense: 5'-ACTTGTCCAGCACCAGGTAGGT-3'; 그리고 GAPDH sense, 5'-CACGACCATGGAGAAGGC-3' 그리고 anti-sense, 5'-GAAGCAGGGATGATGTTC TGG-3'. EPO와 EPO-R의 발현은 GAPDH에 비교하여 normalized 되었음.

다) 결과

SB203580는 p38 inhibitor이며, SP600125는 JNK inhibitor로 알려져 있음. RT-PCR으로 EPO와 EPO-R의 발현을 조사해본 결과, co-treatment으로 나오는 EPO와 EPO-R의 발현증가는 p38와 JNK MAPK 활성화에 의한 것으로 확인되었음. (Figure. 1)

Co-treatment가 어떤 작용으로 일어나는지를 알기 위해, 저해제에 의해 p38, JNK 그리고 ERK의 인산화 변화를 western을 통하여 조사 함. 그 결과로, 전년도 GABA 단독처리와 마찬가지로, GABA + Piperine의 처리를 통해 p38과 JNK의 인산화는 더욱 증가되고, ERK의 인산화는 증가하지 않음을 알 수 있었음. 따라서 GABA + Piperine에 의한 발현 변화는 MAPK의 P38과 JNK pathway와 연관되어 있다는 것 확인할 수 있었음. (Figure 2).

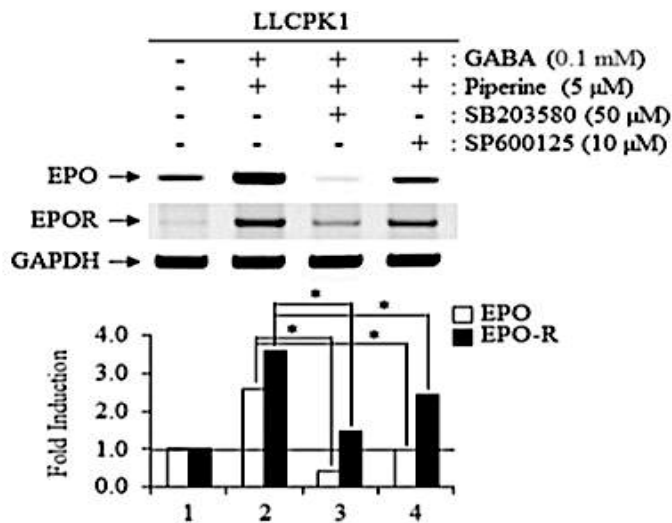


Figure 1. Effects of p38 and JNK MAPK inhibitors on EPO and EPO-R mRNA expression induced by GABA plus piperine.

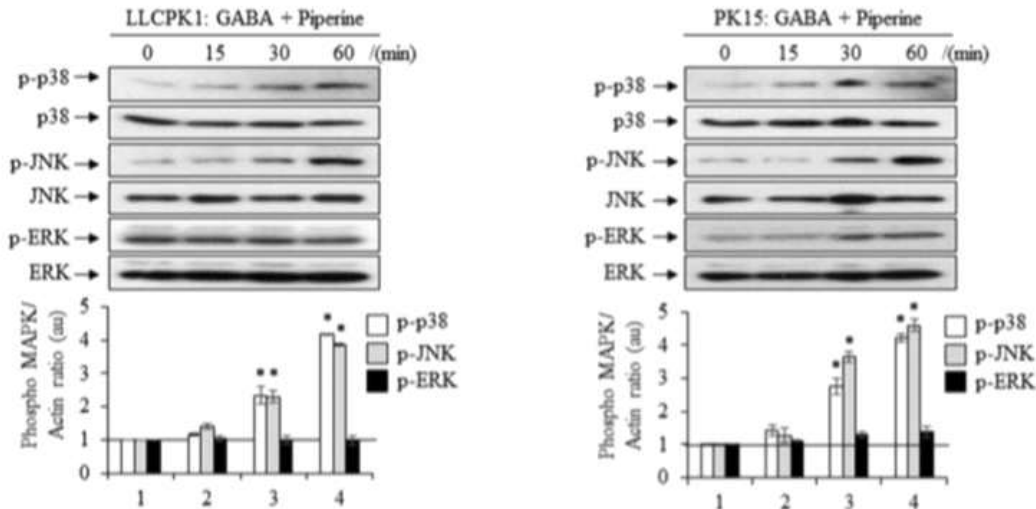


Figure 2. GABA plus piperine activates p38 or JNK MAPK, but not ERK MAPK.

2) Porcine Macrophage cell line을 이용하여

GABA+Piperine으로 발현이 증가한 EPO의 기능성 연구.

가) 배경

- 선행 연구로 GABA + Piperine을 처리한 kidney cell lines에서 EPO의 발현이 증가함을 확인하였음. 이 단백질의 기능을 연구하기 위해서 돼지의 폐에서 유래된 macrophage cell line에서 염증성 및 항염증성 유전자의 발현 변화 및 관여 receptor protein 조사함.

나) 방법

-LLCPK1을 DMEM에 12 시간 배양 후 serum-free DMEM으로 전환한 후 5 µg/mL GABA와 5 µM Piperine 처리 후 24 혹은 48 시간 동안 배양되어 conditioned medium을 회수 함. 3D4/31 macrophage cell line에 conditioned medium을 10% 혹은 50% 포함된 배지를 처리한 후. IL-6, IL-10, NF-κB의 발현을 RT-PCR로 확인함. 사용한 프라이머들은 다음과 같음:

Interleukin (IL)-10, forward 5'-CTCCAAGAGAGGGGTGTCTA-3' 와 reverse 5'-CACAGAGAGGCTCGGTAAAT-3';

IL-6, forward 5'-CTTGAGGATTTCTGCAGTT-3' 와 reverse 5'-AAGCCGTGTAGCCATTTTAC-3';

NF-κB, forward 5'-CCCACAGACGTTTCATAGACA-3' 와 reverse 5'-TGCTTCATTCCAGCATTAGA-3'.

발현은 GAPDH과 비교하여 normalization됨. Conditioned media에서 macrophage의 IL-10과 NF-κB의 발현을 조절하는 것이 EPO인 것을 확인하기 위하여, 10% conditioned medium, recombinant human EPO (rEPO) 0.5 ng/mL, 그리고 EPO를 중화 시키는 EPO antibody (anti-EPO Ab) 1 µg/mL을 전 처리 하였음. RT-PCR은 동일한 방법으로 수행됨.

다) 결과

IL-6은 염증성, IL-10은 항염증성 사이토카인으로 잘 알려져 있음, 그리고 NF-κB도 염증 조절관련 유전자로 잘 알려져 있음. EPO가 생성된 conditioned media는 macrophage cell line의 IL-10와 NF-κB 발현을 유의성 있게 변화시켰으나 IL-6의 발현에도 영향을 주지 않았음. 따라서, conditioned medium 내 EPO 사이토카인의 기능은 항염증성 유전자를 발현시킬 가능성이 높다는 것을 알 수 있었음. (Figure 3A-C)

Conditioned medium과 마찬가지로 rEPO 처리는 IL-10과 NF-κB의 발현을 증가시키며 conditioned medium 처리 혹은 rEPO 처리에 의한 IL-10과 NF-κB의 발현을 증가는 anti-EPO Ab 처리로 억제됨을 알 수 있었음. 이에 비해 IL-6의 발현은 어떠한 처리에서도 영향을 받지 않음 (Figure 3D). 따라서, porcine macrophage cell line에서 EPO는 염증성 유전자 발현을 조절할 가능성이 많으며, EPO 발현은

kidney cell에서 GABA 처리에 의해 촉진될 수 있다고 추측할 수가 있었음.

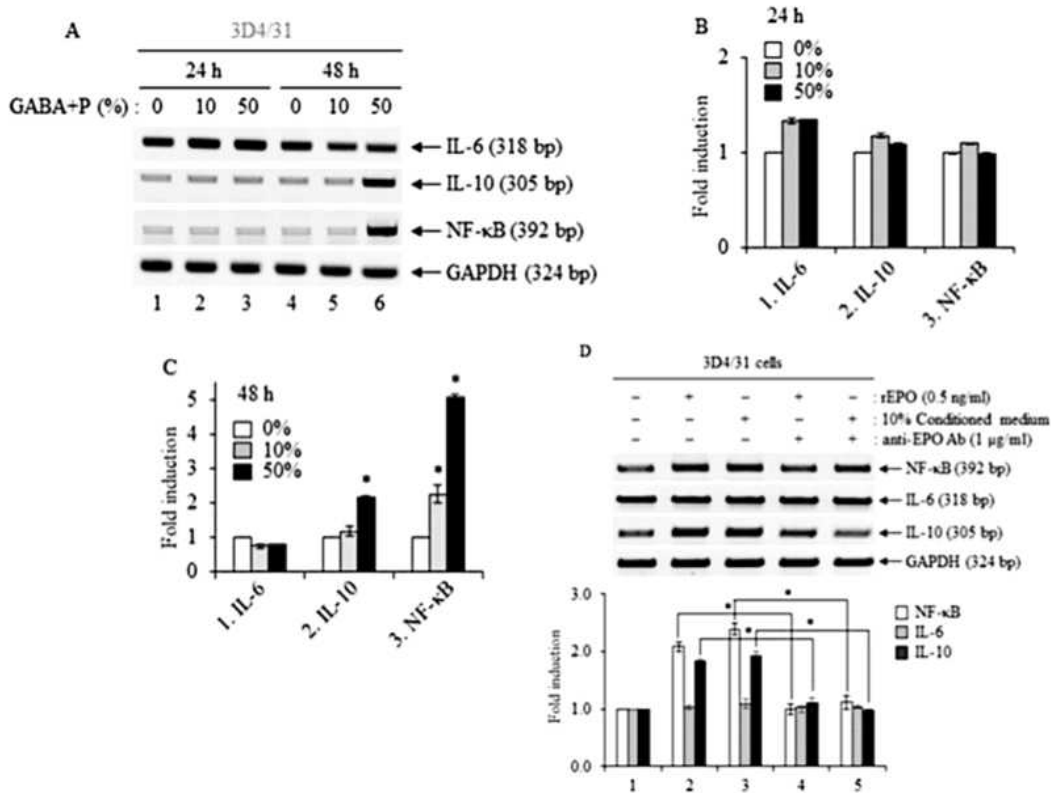


Figure 3. EPO-containing conditioned medium induction of cytokines and NF-κB expression.

9) Porcine kidney cell line에서 GABA 처리로 인한 EPO 발현조절에 관여하는 receptor protein에 대한 조사.

가) 배경

- GABA receptor는 두가지 종류로, GABAA와 GABAB가 있음. GABAA는 bicuculline methiodide (BMI) 약물의 처리로 인해 기능이 저해될 수 있고, GABAB는 3-amino-propyl-diethoxymethyl-phosphinic acid (CGP-35348) 약물에 처리에 의해 저해될 수 있음. 이 두 가지 receptor 단독 혹은 조합으로 EPO 와 EPO-R이 조절되는지를 조사함.

나) 방법

- LLCPK1 세포를 GABA 20 μg/mL, 그리고 bicuculline methiodide (BMI, 12.5 μM) 또는 3-amino-propyl-diethoxymethyl-phosphinic acid (CGP-35348, 25 μM)를 처리함. 12-48 시간 이후 EPO와 EPO-R의 발현을 RT-PCR과 FACs 실험을 통해 조사함. FACs을 위하여 1x10⁵ cells/well이 six-well plates에 2 반복으로 처리를 하였음. Trypsin을 이용하여 세포를 분리후, anti-pEPO-R antibodies와 얼음에서 한 시간 처리 후 2차 항체를 room temperature에서 30분 처리 후 NovoCyte flow cytometer (ACEA Bioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며 각 event을 위해 1x10⁴ cells이 수집됨.

다) 결과

- RT-PCR로 확인한 결과, GABA 처리로 인한 EPO와 EPO-R의 발현 변화는 BMI 처리에 영향을 받으며 CGP-35348 처리에 의해 영향을 받지 않은 것으로 확인됨. (Figure 4A). 또한 FACs를 통해 EPO-R 발현

을 조사해본 결과, GABA에 의한 EPO-R의 발현증가는 BMI 처리로 인하여 유의성 있게 감소함으로 조사됨 (Figure 4B). 따라서, porcine cell line LLCPK1에서 GABA에 의한 EPO/EPO-R 발현조절은 GABAA를 통해 조절되는 것으로 확인되었음.

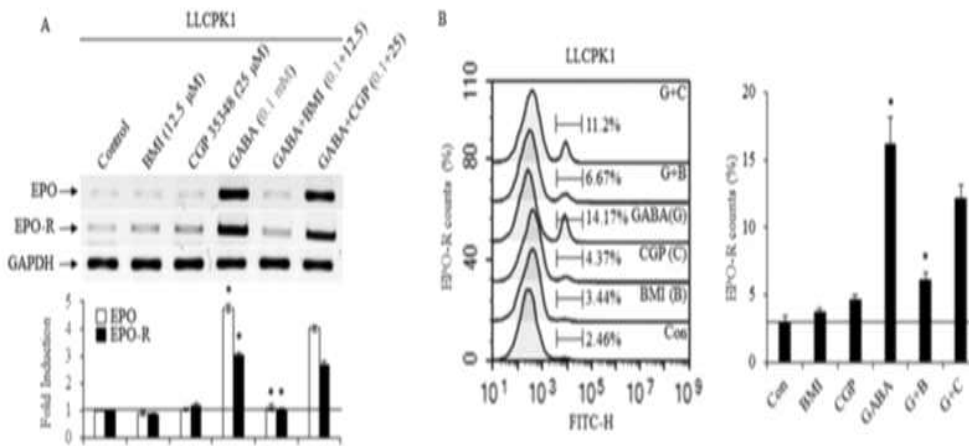


Figure 4. GABAA receptor antagonist BMI, but not GABAB receptor antagonist CGP-35348, reduced EPO and EPO-R expression.

10) Porcine cell line LLCPK1에서의 GABA와 Piperine 기능 관련 기전 연구.

가) 배경

- Porcine kidney cell line에서 GABA와 Piperine 처리는 EPO와 EPO-R의 발현을 조절하며, 이 둘은 시너지 효과가 있음을 확인하였음. GABA와 Piperine 처리에 의해 조절되는 유전자들을 분석하고 관련 기전을 연구하기 위해 부가적으로 Microarray analysis를 실시 하였음.

나) 방법

-LLCPK1 cells를 GABA 20 μg/mL 혹은/또는 Piperine 5 μM을 24시간 처리 후, RNA를 TRIZOL로 추출 함. 1~5 μg RNA를 Agilent's Quick Amp labeling kit을 이용하여 cRNA를 제작 함, 이 중 1.65 g을 Porcine Gene expression Microarray (G2519F)에 hybridization 함. Quality check 및 filtering은 Flag를 이용하여 실시하였으며 probe signal intensity에 log (base 2)을 취하였음. Normalization은 Quantile normalization으로 실시함. 총 43,603 probes 중에 22,163개의 probes가 각 샘플에서 발현이 확인되었으며, 이 중 무처리 군보다 3158개의 probes의 발현이 변화된 것으로 확인됨. Heatmap 제작은 3158 probes를 ClustVis을 이용하여 NIPAL PCA를 적용하여 제작함. Gene ontology analysis은 3158 개의 probes 중에 control(무처리군)과 normalization 후 대조군과의 probe intensity가 2.0배수 (fold change, f.c)이상인 probe를 선별하여 Gene Ontology Consortium의 Enrichment analysis를 실시하여 진행함.

다) 결과

GABA, Piperine 혹은 co-treatment를 할 경우의 발현 변화를 히트맵으로 정리 함. (Figure 5)

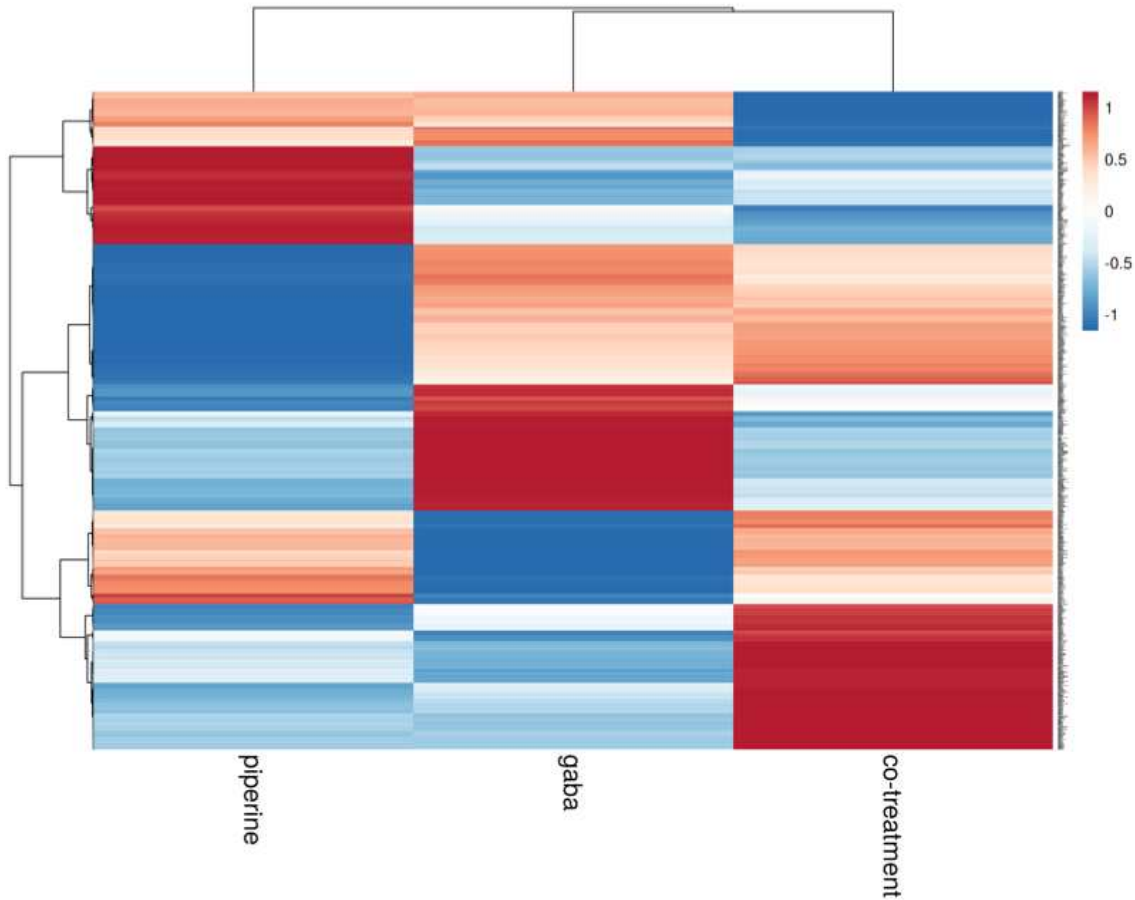


Figure 5. Hierarchical Clustering Analysis of LLCPK1 cells treated with GABA, Piperine or both.

Gene Ontology Analysis를 실시하여 각 처리 군에 따라 GABA 단독처리로 발현이 증가하는 유전자들의 관련 기전을 조사하였다. 그 결과, GABA 단독처리로 가장 많이 높아지는 기능 중에 metabolic process, response to stimulus 등이 있었으며 defense와 immune response 관련 유전자도 10개 이상 포함된 것으로 조사됨. (Figure 6) 이 중, 가장 높은 발현 변화를 보인 53 개의 유전자 중 절반 이상이 metabolic process에 관여하며, 이 중 Wilms tumor 1 (WT1)는 EPO 발현을 증가시키는 전사인자로 이미 밝혀진 바 있음. (Table 1.) 이외에 Immune process와 관련이 있는 것으로 알려진 유전자는 총 14개로 확인되었음. (Table 2)

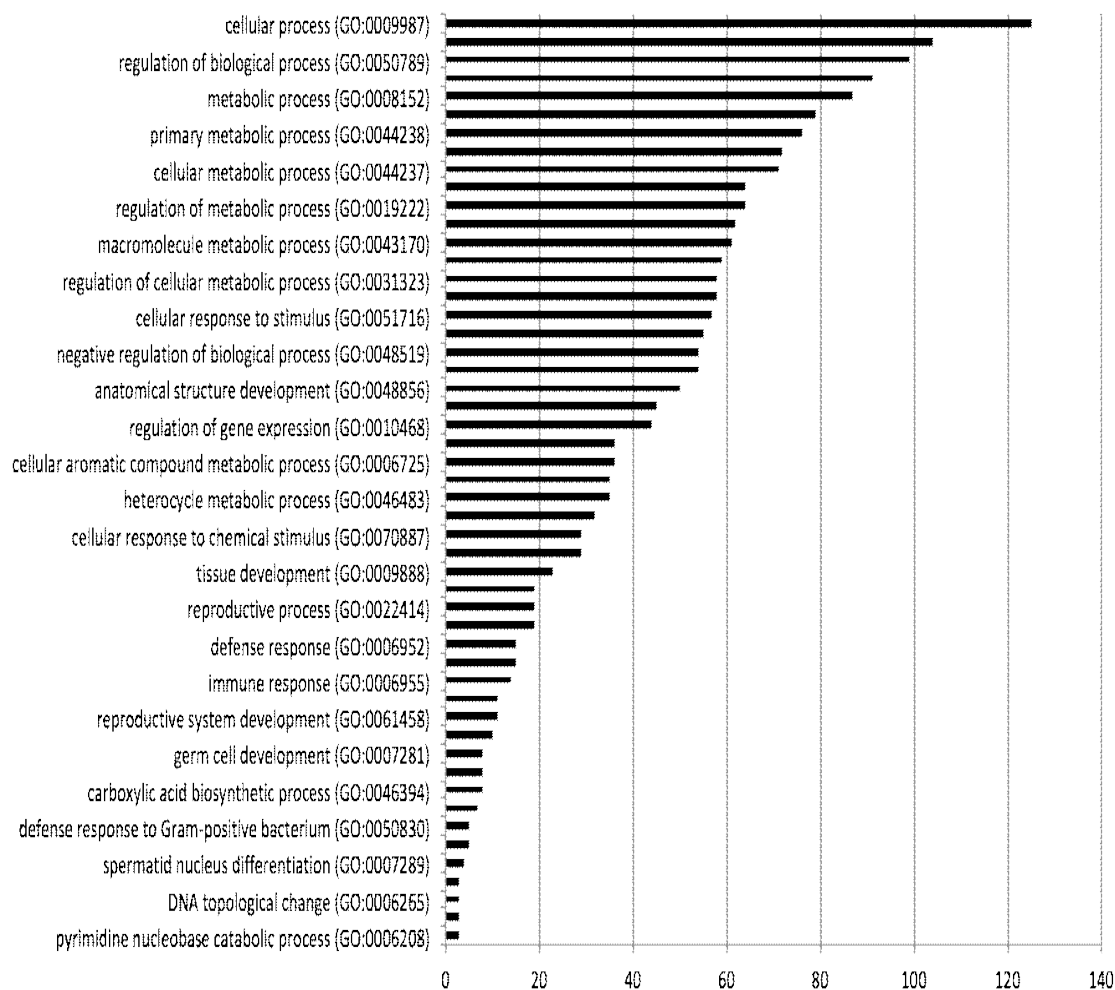


Figure 6. Gene Ontology Analysis of genes upregulated by GABA treatment in LLCPK1 cell.

ACSL4	Metabolic Process	Primary metabolic process	#N/A	#N/A	#N/A
ACTC1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	Gene expression
ADAM15	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
AGK	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	#N/A	#N/A
ALG11	Metabolic Process	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
ASTE1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
ASXL2	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
CCNK	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
CDC45	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
CDK10	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
CYP2C33	Metabolic Process	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
CYP2C49	Metabolic Process	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
DLGAP5	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
EDC3	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
FOXH1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
FOXO4	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression

G2E3	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	metabolic pathway Macromolecule metabolic pathway	#N/A
HMGB2	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
NMT1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
PANK1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	#N/A	#N/A
PAPLN	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
PCK1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
PDK4	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
PFN1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	Gene expression
PLAG1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
PPP1CA	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
PRNP	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	Gene expression
PRSS35	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
SART3	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression
SERPING1	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	Gene expression
TGM1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	#N/A
TMEM173	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	Gene expression
WT1	Metabolic Process	Primary metabolic process	Nitrogen metabolic process	Macromolecule metabolic pathway	Gene expression

Table 1. Gene list and related process of the most up-regulated genes by GABA treatment in LLCPK1.

C4A	Uncharacterized protein;C4A;ortholog	COMPLEMENT C4-A-RELATED (PTHR11412:SF86)	complement component(PC00078);cytokine(PC00083);serine protease inhibitor(PC00204)
ADAM15	Uncharacterized protein;ADAM15;ortholog	DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 15 (PTHR11905:SF130)	metalloprotease(PC00153)
HMGB2	High mobility group protein B2;HMGB2;ortholog	HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN B2 (PTHR13711:SF181)	HMG box transcription factor(PC00024);chromatin/chromatin-binding protein(PC00077);signaling molecule(PC00207)
OAS2	Uncharacterized protein;OAS2;ortholog	2'-5'-OLIGOADENYLATE SYNTHASE 2 (PTHR11258:SF3)	defense/immunity protein(PC00090);nucleic acid binding(PC00171);nucleotidyltransferase (PC00174)
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, tv1;IRAK1;ortholog	INTERLEUKIN-1 RECEPTOR-ASSOCIATED KINASE 1 (PTHR24419:SF1)	
TMEM173	Stimulator of interferon genes protein;TMEM173;ortholog	STIMULATOR OF INTERFERON GENES PROTEIN (PTHR34339:SF1)	
PLCL2	Phosphoinositide phospholipase C;PLCL2;ortholog	INACTIVE PHOSPHOLIPASE C-LIKE PROTEIN 2 (PTHR10336:SF84)	guanyl-nucleotide exchange factor(PC00113);signaling molecule(PC00207)
DEFB1	Beta-defensin 1;DEFB1;ortholog	BETA-DEFENSIN 1 (PTHR21388:SF9)	
APCS	Serum amyloid P-component;APCS;ortholog	SERUM AMYLOID P-COMPONENT (PTHR45869:SF3)	

BPIFA1	BPI fold-containing family A member 1:BPIFA1:ortholog	BPI FOLD-CONTAINING FAMILY A MEMBER 1 (PTHR47015:SF1)	
GSN	Gelsolin (Fragment):GSN:ortholog	GELSOLIN (PTHR11977:SF29)	non-motor actin binding protein(PC00165) HMG box transcription factor(PC00024):chromatin/chromatin-binding protein(PC00077):signaling molecule(PC00207)
HMGB2	High mobility group protein B2:HMGB2:ortholog	HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN B2 (PTHR13711:SF181)	
IL15	Interleukin-15:IL15:ortholog		
TMEM173	Stimulator of interferon genes protein:TMEM173:ortholog	STIMULATOR OF INTERFERON GENES PROTEIN (PTHR34339:SF1)	

Table 2. Gene list of genes up-regulated by GABA related to immune response.

LLCPK1 cell에 Piperine 단독처리로 발현이 증가하는 유전자는 전체 66개 였으며, 주로 cellular process, metabolic process, immune system process와 관련이 있었음. (Figure 7) 이 중 가장 높은 발현 변화율을 보인 19개의 유전자 중에 7개가 immune system process와 관련이 있었음. (Table 3)

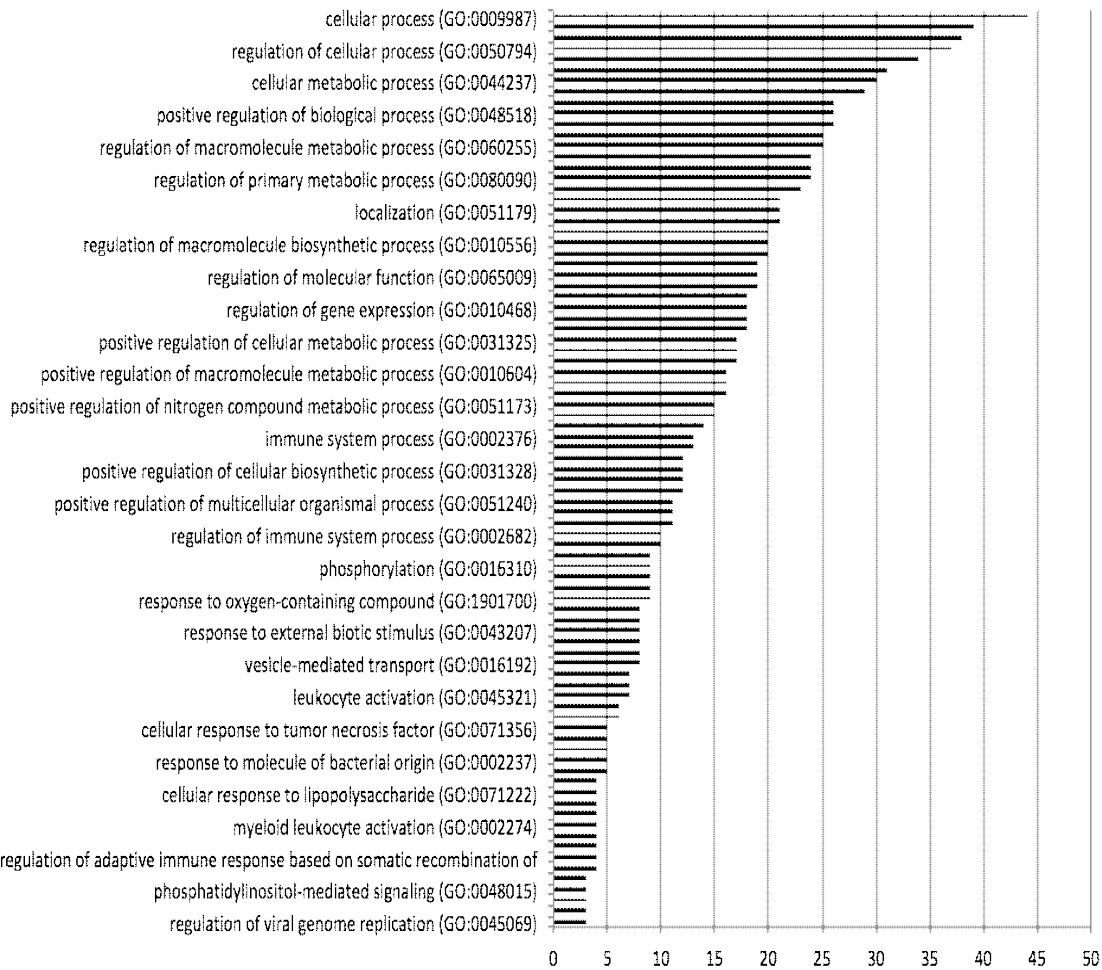


Figure 7. Gene Ontology Analysis of genes up-regulated by Piperine treatment in LLC PK1 cell.

ZMIZ1	Uncharacterized protein;ZMIZ1:ortholog	ZINC FINGER MIZ DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1 (PTHR10782:SF7)	ligase(PC00142)
SLC11A1	Natural resistance-associated macrophage protein 1;SLC11A1:ortholog	NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1 (PTHR11706:SF52)	cation transporter(PC00068)
NFKBIA	NF-kappa-B inhibitor alpha;NFKBIA:ortholog	NF-KAPPA-B INHIBITOR ALPHA (PTHR46680:SF1)	
ID2	DNA-binding protein inhibitor ID-2;ID2:ortholog	DNA-BINDING PROTEIN INHIBITOR ID-2-RELATED (PTHR11723:SF5)	transcription factor(PC00218)
CD46	Membrane cofactor protein;CD46:ortholog	SUBFAMILY NOT NAMED (PTHR19325:SF485)	
CCL5	C-C motif chemokine;CCL5:ortholog	C-C MOTIF CHEMOKINE 5 (PTHR12015:SF82)	chemokine(PC00074)
C3	Complement C3;C3:ortholog	COMPLEMENT C3 (PTHR11412:SF81)	complement component ;cytokine;serine protease inhibitor

Table 3. Gene list and related process of the most up-regulated genes by Piperine treatment in LLCPK1.

LLCPK1 cell에서 co-treatment로 시너지 효과가 나타난 유전자는 73개이며, 이들은 metabolic process, response to stress 등 다양한 기전에 관여하는 것으로 보임. (Figure 8.). 이 중 발현이 가장 높은 18개의 유전자는 다음 표에 정리함. (Table 4)

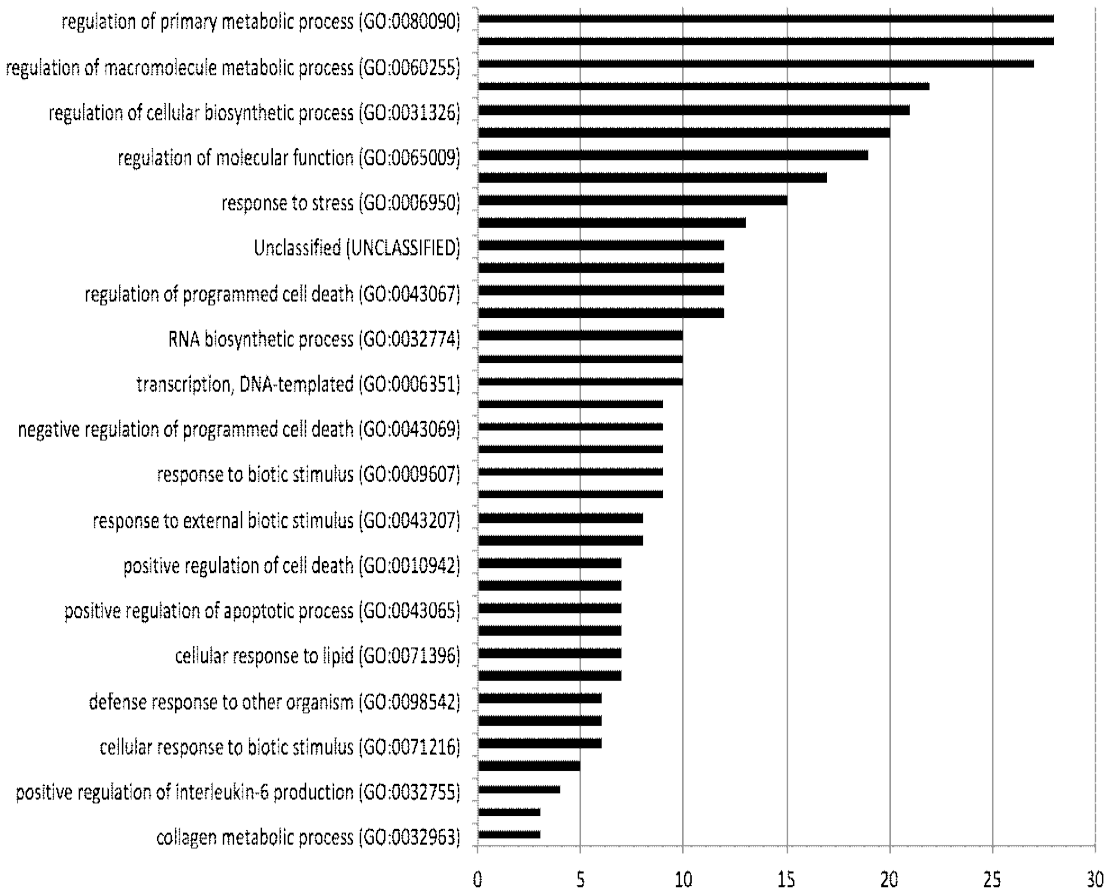


Figure 8. Gene Ontology Analysis of genes up-regulated by GABA and Piperine co-treatment in LLCPK1 cell.

ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle [Source:NCBI gene;Acc:100154254]
ASS1	argininosuccinate synthase 1 [Source:NCBI gene;Acc:414411]
CHEK2	checkpoint kinase 2 [Source:NCBI gene;Acc:100192447]
CYP2C49	cytochrome P450 2C49 [Source:NCBI gene;Acc:403215]
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 [Source:NCBI gene;Acc:503658]
HEY1	hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1 [Source:NCBI gene;Acc:100157952]
IGF2	Insulin growth factor II
ITM2A	integral membrane protein 2A [Source:NCBI gene;Acc:595131]
KLC4	kinesin light chain 4 [Source:NCBI gene;Acc:100157157]
KLF13	Kruppel like factor 13 [Source:NCBI gene;Acc:494563]
MUS81	MUS81 structure-specific endonuclease subunit [Source:NCBI gene;Acc:100511000]
NPEPL1	aminopeptidase like 1 [Source:NCBI gene;Acc:100144530]
PAQR8	progesterin and adipoQ receptor family member 8 [Source:NCBI gene;Acc:396559]
PPP1R3C	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C [Source:NCBI gene;Acc:641349]
SLC38A3	solute carrier family 38 member 3 [Source:NCBI gene;Acc:100156039]
STRIP2	striatin interacting protein 2 [Source:NCBI gene;Acc:100517565]
UTP11L	Small Subunit Processome Component
ZNF527	zinc finger protein 527 [Source:NCBI gene;Acc:102165184]

Table 4. Gene list and related process of the most up-regulated genes by GABA and Piperine co-treatment in LLCPK1 cell.

Gene	Primer sequence(5' →3')	Amplicon length
IL-3	Forward : GAGCCAATCTCTATTGAGGAGG Reward : CAATTCAACAGACTCCACAGG	240bp
CSF1	Forward : GTGGATGCCATCAAAGAAGC Reward : GCTCATAGTGCTTGCCAAC	210bp
SCF	Forward : TCCTCTCGTCAGAACTCAAGG Reward : ACTGACAGTTGTTCCACCATT	177bp
EPO	Forward : GTGCAAACCTTTCCGCAACT Reward : TGTGTGGGAGTCTCCATGA	524bp
EPOR	Forward : AGCTGTGGCTGTACCAAAGTGA Reward : ACTTGTCCAGCACCAGGTAGGT	207bp
IL10	Forward : AGCCAGCATTAAGTCTGAGAA Reward : CCTCTCTTGGAGCTTGCTAA	394bp
IL-2	Forward : TCTTGTGTTGCATTGCACTAA Reward : TCAGAGTTTTGCTTTGACCTAA	280bp
IL-4	Forward : GGACACAAGTGCACATCA Reward : GCACGTGTGGTGTCTGTA	186bp
IFN- γ	Forward : CTCTCCGAAACAATGAGTTATAC AA Reward : GCTCTCTGGCCTTGAA	503bp
GATA 1	Forward : TCAAACCAGAAAACGGAAGC Reward : GCATCTCTTCACTGCTGCTG	146bp
GABA 2	Forward : CAACACAGTCCCCGTCTTT Reward : TGGTACAGGCGTCAAGAGTG	122bp
β -Actin	Forward : GAGACCTTCAACACGCCG Reward : GAAGCAGGGATGATGTTCTGG	685bp

Table 1. Construction of porcine hematopoietic gene primer

11) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Induction of functional erythropoietin and erythropoietin receptor gene expression by gamma - aminobutyric acid and piperine in kidney epithelial cells (Life Sciences)		Yoon-Mi Lee	215	미국	ELSEVIER	SCI	2018.11.12	0024-3205
2	Gamma - aminobutyric acid increases erythropoietin by overexpression of hypoxia - inducible factors in rats (Scientific reports)		Keun-tae Park		미국	Nature	SCI	2차 중	리뷰

12) 국내 및 국제학술회의 발표

				코드번호	C-06-02
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
	한국식품과학회	박근태	2017.06.22.	제주 ICC	한국
	분자세포생물학회	이윤미	2017.09.14	서울 코엑스	한국

13) 지식재산권

			코드번호			C-06-04			
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
	GABA를 이용한 에리스로포이에틴증진방법	한국	미래생명자원	2017.03.13	10-2017-031191	미래생명자원	2017.12.14	10-1810879	100%

작성요령(제출 시 삭제할 것)

- 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술
 - 연구개발 추진전략 및 방법, 연구개발 추진체계, 연구개발 추진일정, 기재
- 연구개발성과(등록·기탁 대상 연구개발성과에 대해 자세한 내용과 등록·기탁 번호를 기술)
 - 논문게재 성과(게재연도, 논문명, 저자명, 학술지명, Vol.(No.), 국내외 구분, SCI구분, 등록·기탁 번호)
 - 특허성과(출원된 특허 및 등록된 특허를 모두 기재)
 - * 출원: 출원연도, 특허명, 출원인, 출원국, 등록·기탁번호 / 등록: 등록연도, 특허명, 등록인, 등록·기탁번호
 - 기술요약정보(연도, 기술명, 요약내용, 기술완성도(아이디어 창안·특허만 신청·기술개발진행중·기술개발완료·실용화단계·시장개척단계·기타), 등록·기탁번호)
 - 보고서 원문(연도, 보고서 구분(중간·최종), 발간일, 등록·기탁번호)
 - 소프트웨어(연도, 소프트웨어명, 소프트웨어 구분(응용소프트웨어·시스템소프트웨어), 등록·기탁번호)
 - 생명정보(생물자원과 생명정보를 기재)
 - * 생물자원: 연도, 생물자원명, 기탁일, 등록·기탁 번호 / 생명정보: 연도, 생명정보명, 등록일, 등록·기탁번호)
 - 화합물(연도, 화합물명, 분자량, 기탁일, 등록·기탁번호)
- 연구결과
 - 기술적 성과 : 기술수준 및 기술개발성과, 연구실적물 등을 구체적으로 기술
 - . 기술적인 측면에서 국내외 경쟁사 기술 및 제품과의 규격, 성능, 정밀도 등 사양비교를 통한 우월성 등 서술(기술개발 의의)
 - . 선진국 대비 기술수준, 국산화율
 - 경제적성과 : 개발기술, 제품개발을 통한 생산성 향상, 시장점유율(%), 매출액증대, 고용창출, 관련 산업기여도 등을 기술
- 총괄과제가 있는 경우 세부과제별 결과를 종합 분석하고 고찰한 결론을 기술

작성예시(Sample)(제출 시 삭제할 것)

- 사업화성과 및 매출실적
 - 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	8 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 16 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0 % 국외 : 2 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			10 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			3 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	사업화 완료			
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	8	12	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	16	18
국외		0	0.2	0.3	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	애건 및 애모 빈혈예방 제품 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

GABA(γ -aminobutyric acid) 기반의 경구용 자돈 빈혈예방 제품 개발

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	사료첨가제용 GABA 생산공정 확립	●김치유산균을 이용하여 발효공정을 통해 생물전환 천연GABA 생산 공정 확립	대형 발효조를 이용한 GABA 생산 최적의 조건 확립	목표치 100% 달성
	Rat을 이용한 EPO 증가 확인	●Rat에 GABA를 투여하여, EPO 증가 확인 및 관련 유전자 분석	일반 환경에서의 Rat의 체내에서 EPO 증가 확인 및 유전자 분석 완료	목표치 100% 달성
	Hep 3B cell을 이용한 EPO 생성 촉진 및 세포독성 실험 선행	●Hep3B cell line에 MTT assay를 통한 세포 독성 여부 및 투여 농도 확립(EPO 생성 촉진 기전 연구를 위한 선행연구)	세포 독성 여부 확인 (극소량 에서도 독성 없음)	목표치 100% 달성
2차 년도 (2017)	용혈성 빈혈 유도 모델 실험	phenylhydrazine을 사용하여 Rat의 용혈성 빈혈을 유도한 후, 유효물질들의 효능 평가, 장기내의 유전자 분석	용혈성 빈혈 모델 제작 후 GABA의 효능평가 및 유전자 분석 평가 완료	목표치 100% 달성
	철결핍성 빈혈 유도 모델 실험	철 결핍 사료 급여하여, 빈혈 유도한 후, 유효물질들의 효능 평가, 장기내의 유전자 분석	철결핍성 빈혈모델 마우스 제작 후 GABA 및 유기태 Fe의 효능 평가 완료	목표치 100% 달성
	Cell을 통한 EPO 생성 기전 연구	EPO, EPO-receptor, Janus-kinase pathway 기전 연 구	저산소 환경에 노출된 세포에 유효물질 첨가 후 GABA 및 유효물질 효능 평가 완료	목표치 100% 달성
3차 년도 (2018)	임신통 및 자돈 효능 시험	총 2회에 걸쳐 양돈 필드 농장 에서 GABA 및 유효물질의 성 능 평가	예비실험 1회, 본실험 2회에 걸쳐 양돈실험 완료 및 성능평가 완료	목표치 100% 달성
		첨가제와 철분주사의 동등성 평가	철분주사제와의 동등성 비교 평가 완료	목표치 100% 달성
	품질관리 시스템 구축	제품생산 라인구축 및 배합비 완료	제품 생산 라인 구축 및 배합비 완료 분석 공정 확립(HPLC)	목표치 100% 달성
	제품 등록 및 시제품 생산	제품 등록 및 시제품 출시	제품등록 완료	목표치 100% 달성

		코드번호	C-04
연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
- GABA와 Piperine 처리로 인한 EPO와 EPO-R의 발현 증가에 관여하는 기전 연구	- 전년도 GABA 처리시 EPOR의 발현 증가는 MAPK 기전과 관련 있음을 정립했음. -GABA와 함께 Piperine co-treatment도 관련 기전과 연관성 및 EPO의 발현 증가도 조사해야 할 필요성이 있었음.	- LLC-PK1 cell line에 저해제 SB203580 (50 μM) 혹은 SP600125 (10 μM)을 30분 전 처리 후, GABA (0.1 mM)와 Piperine (5 μM)을 24 시간 처리함. - 반복실험을 통해 정확하게 분석하며 RT-PCR을 통하여 EPO 와 EPO-R의 발현 변화를 조사함.	
- Porcine Macrophage cell line에서 GABA와 Piperine 처리로 생성된 EPO의 기능성 조사	- GABA와 Piperine 증가로 인해 EPO가 증가함을 관찰하였음. 따라서, 생성된 EPO의 기능성 연구를 할 방법을 모색함. - EPO 자체가 세포 밖으로 분비하는 cytokine이므로, Kidney cell line을 GABA와 Piperine 처리 후 수집하여 배지에 macrophage cell을 배양, 염증 관련 유전자의 발현을 관찰하기로 함.	- GABA (0.1 mM)와 Piperine (5 μM) 처리 후 24 혹은 48시간 동안 배양하고 이 배지 상층액을 10-50% 포함한 배지에 3D4/31 macrophage cell line을 배양함 - 처리가 끝난 후 RT-PCR을 통하여 NF-κB, IL-6, IL-10의 발현 변화를 RT-PCR을 통하여 확인함. - 발현 변화가 배지 내 EPO에 의한 것인지 조사하기 위해서, EPO 단백질 혹은 이를 중화시킬 수 있는 EPO antibody를 처리하여 유전자의 발현 변화를 관찰함.	
- Porcine Kidney cell에서 GABA처리에 의한 EPO-R 증가에 관여하는 receptor 조사.	- GABA 신호를 인지할 수 있는 세포막 단백질 중에 GABA _A 와 GABA _B 두 종류가 있음. 이 중 kidney cell에서 EPO-R의 발현에 관여하는 것이 어떠한 receptor인지를 조사하기 위해서 각 receptor에 특이적으로 작용하는 저해제를 사용 함.	- GABA _A 는 bicuculline methiodide (BMI)에 의해 저해되며, GABA _B 는 3-amino-propyl-diethoxymethyl-phosphinic acid (CGP-35348)에 의해 저해됨. - LLCPK1 세포를 GABA (20 μg/mL), 그리고 BMI (12.5 μM) 또는 CGP-35348 (25 μM) 처리하고 12-48시간 배양함. - EPO와 EPO-R의 발현을 RT-PCR과 FACs을 통해 실험을 실시함.	
- GABA를 통한 EPO, EPO-R 발현증가에 따른 관련된 pathway의 조사 - 조혈작용에 관여하는 유전자 집중적 Screening	- 관련 pathway를 조사하던 중 가장 가능성이 크다고 판단한 MAPK pathway를 확인. - 좀 더 정확한 관련 pathway를 찾기 위해 Microarray를 진행함.	- 현재 마이크로젠 회사에 mRNA를 추출하여 sample을 보내 Microarray를 통해 GABA와 Piperine 기능과 관련된 유전자를 Screening함.	

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

작성요령(제출 시 삭제할 것)

- 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술
 - 최종 성과목표 및 평가방법, 단계 성과목표 및 평가방법, 연차별 성과목표, 개발내용 및 개발 범위, 성과목표별 가중치 (합이 100%이내), 달성도 등을 구체적으로 기술
- 목표 미달성 시 원인(사유) 및 후속연구의 필요성 등 차후대책을 구체적으로 기술

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1 활용계획

- 우선 양돈 농가 및 배합사료 회사를 상대로 하는 경구용 자돈 빈혈 예방 제품을 판매하고자 하며, 이 경우 직접적인 타겟 시장은 약 50억원 정도로 추산되는 철분 주사제를 대체하는 시장이 될 것이다. 본 제품의 경우, 추가적인 기대 효과로서 자돈의 체중 증가로 인한 돼지 생산성 증가가 가능하며 돼지 생산성 향상을 위한 추가적인 시장 형성이 가능할 것으로 예상된다.
- 전 세계적으로 돼지의 사육 두수는 약 12억두 이상으로 추정된다(2004년 FAO). 따라서 중국, 베트남, 러시아, 브라질 등 주요 양돈 활성 국가를 대상으로 수출을 추진할 예정이다.
- 본 과제를 통하여 주요 요인별 빈혈에 대한 효능 및 작용 기전 연구를 통하여 인체용 빈혈 예방 혹은 치료제 개발을 위한 기반을 구축하고자 한다.
- 지속적인 추가 연구·개발을 통하여 질병 예방·치료가 가능한 항생제 대체제, 성장 촉진 사료첨가제 등의 지속적인 제품개발을 진행하고자 한다.
- GABA 생산공정의 원가절감을 통하여 지속적인 GABA 시장 확대 (특히 축산분야)를 도모하고자 한다.
- 본 연구의 데이터를 기반으로 애견 및 애묘 빈혈 예방제품으로도 기대를 하고 있다. 주관기관인 미래생명자원은 2018년 여름에 제2공장을 준공하였으며, 애견 간식 공장을 새롭게 신설하였다. 현재 시제품 생산중이며, 본 과제로부터 파생된 GABA-유기태철분이 애견 간식 분야의 제품화가 되도록 내부적으로 논의 중이다.
- 이에 따라, 동물병원과 연계하여 빈혈증상이 있는 애완건의 혈액분석을 통해, 제품의 효능을 평가하고 마케팅 자료로 활용하여 제품화를 할 예정이다.
- 나아가 임상과제를 수주하여 인체적용실험을 통해 건강기능식품 분야로 진출을 모색하고 있다.

연구개발보고서 초록

과 제 명	GABA(γ -aminobutyric acid) 기반의 경구용 자돈 빈혈예방 제품 개발				
	Development of oral anemia-preventing materials for piglet using gamma-aminobutyric acid				
주관연구기관	미래생명자원		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 미래생명자원 신소재연구소	
참여기업	건국대학교			(성명) 한 종 권	
총연구개발비 (천원)	계	747,000	총 연구 기간	2016.09.05. ~ 2018.12.31. (2년 4월)	
	정부출연 연구개발비	560,000	총 참여 연구 원 수	총 인원	14
	기업부담금	187,000		내부인원	14
	연구기관부담금			외부인원	0

○ 연구개발 목표 및 성과

대형 발효조를 이용한 GABA 생산 최적조건 확립

In vivo 실험내에 GABA 급여에 인한 EPO 증가 확인 및 HEP 3B cell line에서의 GABA의 세포독성(cytotoxicity) 확인

돼지 세포에서 Pig EPO 발현과 EPO-Receptor 발현 정도 각각 Screening 완료.

Erythropoietin이 돼지세포에 미치는 영향 Screening 완료

○ 연구내용 및 결과

본 연구팀은 다년간 GABA를 이용한 *in vivo* 실험 연구를 하면서 gamma-Aminobutyric acid (GABA)의 포유모돈 섭취가 erythropoietin (EPO) 생성을 촉진하고, 포유자돈에게도 EPO가 증가한다는 결과를 여러 차례 확인하였을 뿐 아니라 Rat을 이용한 실험에서도 적혈구수와 EPO의 수치가 증가하는 것을 확인하였다.

본 과제의 목표는 GABA와 철 (Fe)의 생체이용성 증대 기술을 통하여 포유 모돈 및 자돈의 사료에 공급함으로써 이유자돈의 빈혈을 예방하는 경구용 제품 개발에 목표를 두고 있다.

본 과제에서 rat 뿐만 아니라 세포 실험 및 실제농가 필드실험을 수행하였고, GABA의 단독효과와 piperine 및 유기태 철분과의 시너지 효과를 확인하였으며, 성공적인 제품개발을 완료하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

우선양돈 농가 및 배합사료 회사를 상대로 하는 경구용 자돈 빈혈 예방 제품을 판매하고자 하며, 이 경우 직접적인 타겟 시장은 50억원 정도로 추산되는 철분 주사제를 대체하는 시장이 될 것이다. 본 제품의 경우, 추가적인 기대 효과로서 자돈의 체중 증가로 인한 돼지 생산성 증가가 가능하여 돼지 생산성 향상을 위한 추가적인 시장 형성이 가능할 것으로 예상된다.

전 세계적으로 돼지의 사육 두수는 약 12억두 이상으로 추정된다(2004년 FAO). 따라서 중국, 베트남, 러시아, 브라질 등 주요 양돈 활성 국가를 대상으로 수출을 추진할 예정이다.

본 과제를 통하여 주요 요인별 빈혈에 대한 효능 및 작용 기전 연구를 통하여 인체용 빈혈 예방 혹은 치료제 개발을 위한 기반을 구축하고자 한다.

지속적인 추가 연구·개발을 통하여 질병 예방·치료가 가능한 항생제 대체제, 성장 촉진 사료첨가제 등의 지속적인 제품개발을 진행하고자 한다.

GABA 생산공정의 원가절감을 통하여 지속적인 GABA 시장 확대 (특히 축산분야)를 도모하고자 한다

(별첨 2)

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호		116084-3		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	GABA(γ -aminobutyric acid) 기반의 경구용 자돈 빈혈예방 제품 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	미래생명자원			연구책임자	한종권
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.09.05.-2016.12.31	80,000	27,000	107,000
	2차년도	2017.01.01.-2017.12.31	240,000	80,000	320,000
	3차년도	2018.01.01.-2018.12.31	240,000	80,000	320,000
	4차년도				
	5차년도				
	계	2016.09.05.-2018.12.31	560,000	187,000	747,000
참여기업	건국대학교				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
미래생명자원	연구소장	한종권

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.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

본 과제는 당사가 새롭게 밝혀내고, 특허를 등록시킨 경구용 GABA(gamma-aminobutyric acid) 기반 제제의 동물의 혈액 내 erythropoietin(EPO)을 증가시키는 현상을 산업적으로 응용하기 위한 과제입니다. 세포 실험 및 동물 실험을 통하여 작용 기전을 규명하였으며, 저산소, 용혈 등 주요 모델 동물 실험을 통하여 효능을 규명하였고, 자돈을 대상으로 기존의 철분 주사 없이 본 개발 소재의 경구 투여를 통하여 정상적으로 성장이 가능함을 field(농장) 실험을 통하여 확인하였습니다. 결과적으로 당초 계획했던 자돈의 철분 주사제를 대체할 수 있는 GABA 기반의 경구용 소재를 성공적으로 개발하였으며, 관련되는 학술 자료를 확보하였습니다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

본 과제의 결과는 단순히 축산업의 양돈 분야에 한정하는 것이 아니고 인체의 건강에 적용이 가능한 연구 결과로 판단됩니다. 조혈 기능이 필요한 수험생, 격한 운동을 하는 운동선수, 임산부 등에 기능성 제품으로 개발이 가능할 것으로 판단되며, EPO를 투여받아야 하는 빈혈 환자를 대상으로 하는 빈혈 치료제 혹은 치료용 보조제로의 개발도 가능할 것으로 예상되어 전 세계적으로 3조원을 상회하는 EPO 시장에 진입이 가능할 것으로 예상됩니다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

앞서 언급한 대로 식약처와의 협의를 통하여 조혈 기능이 필요한 수험생, 격한 운동을 하는 운동선수, 임산부 등에 건강기능성 제품으로 개발이 가능할 것으로 예상되며, 추가적으로 빈혈 치료제 혹은 치료용 보조제의 개발이 가능할 것으로 판단되며, 본 과제 수행으로 얻어진 모델 동물과 field 실험에 의한 효능 평가 결과 및 작용 기전 연구 결과는 이러한 추가적인 개발에 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 판단됩니다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

주관기관인 (주)미래생명자원과 건국대학교 오재욱 교수팀은 역할 분담에 따라 주관기관에서는 소재 생산, 동물 실험 및 field 실험 등을 수행하였고 건국대학교에서는 신장 유래의 세포주 연구를 통하여 작용 기전 연구를 수행하였습니다. 특히 돼지 유래의 세포주 입수를 위하여 해외의 연구 네트워크를 최대한 활용하였으며, Microarray 연구를 통하여 새로운 현상에 대한 작용 기전 연구를 성실히 수행하였고 그 결과를 학술지에 게재하였습니다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

지적소유권 목표인 특허 1건 출원 목표를 출원 1건 및 해당 특허의 등록 1건으로 달성하였으며, 학술 발표 목표 2건도 달성하였습니다. 논문 출간 목표인 SCI 논문 1건, 비SCI 2건의 목표와 관련하여서는 SCI 논문 1건을 게재 완료하였으며(IF 2.936), 비SCI논문 2건과 관련해서는 SCI논문 1건을 심사 중에 있습니다. 심사중인 논문은 2차 review 중이며, Nature 자매지인 Scientific Reports(IF 4.122) 로서 논문 게재시 연구 결과에 대한 객관적 평가에 의해 우수한 연구 결과로 평가받을 수 있을 것으로 예상됩니다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
●임신돈 및 자돈 효능 시험	20	100	달성
●품질관리 시스템 구축	20	100	달성
●제품등록 및 시제품 생산	30	100	달성
●돼지신장세포에서의 GABA와 piperine 기능분석 완료	10	100	달성
●돼지 macrophage 세포에서의 GABA 및 piperine 병행처리시 생성된 EPO 조사	10	100	달성
●GABA와 piperine의 기능 관련 기전 screening	10	100	달성
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제는 당사가 새롭게 밝혀내고, 특허를 등록시킨 경구용 GABA(gamma-aminobutyric acid) 기반 제제의 동물의 혈액 내 erythropoietin(EPO)을 증가시키는 현상을 산업적으로 응용하기 위한 과제입니다. 세포 실험 및 동물 실험을 통하여 작용 기전을 규명하였으며, 저산소, 용혈 등 주요 모델 동물 실험을 통하여 효능을 규명하였고, 자돈을 대상으로 기존의 철분 주사 없이 본 개발 소재의 경구 투여를 통하여 정상적으로 성장이 가능함을 field(농장) 실험을 통하여 확인하였습니다. 결과적으로 당초 계획했던 자돈의 철분 주사제를 대체할 수 있는 GABA 기반의 경구용 소재를 성공적으로 개발하였으며, 관련되는 학술 자료를 확보하였습니다.

연구개발의 질적 수준과 관련해서는 특허 1건을 등록하였으며, IF 2.936의 SCI논문 게재를 완료하였으며 추가적인 SCI 논문을 투고하여 심사 중입니다.

상용화와 관련해서는 관할관청인 이천 시청에 제품 등록을 완료하였고, 본격적인 마케팅을 위하여 기술 자료 및 신제품 세미나 등을 2019년 중에 개최를 목표로 준비하고 있습니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

당초에 설정한 연구목표를 달성하여 결과를 도출하였으며 학술발표, 특허 출원, SCI 논문 출간 등의 정량 목표를 달성하였고, 논문 목표 중 비SCI 2건의 목표를 연구 결과의 질적 수준 향상을 목표로 SCI 1건 (Scientific Reports, IF 4.122)으로 변경하여 현재 2차 review를 진행 중입니다. 1차 review시 제기된 내용에 대하여 성공적으로 보완하여 제출하였으며 현재 2차 review를 거쳐 decision making 단계로 진행 중입니다. 조만간 게재 결정이 될 것으로 예상하고 있습니다. 과제 기간 내에 출간이 완료되지 못하였으나 2018년 9월에 최초로 논문을 제출하여 과제 종료 이전에 논문 출간 되도록 최대한 노력을 한 점을 참작해주시기 바랍니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- ① 당초에 목표한 대로 자돈의 철분 주사제를 대체할 수 있는 경구용 제제로서 상용화할 계획입니다.
- ② 본 소재를 활용한 반려동물용 제품을 개발할 계획을 갖고 있습니다. 참고로 반려묘의 경우 3~4%의 개체가 빈혈 증상을 나타낸다는 보고가 있으며, 국내 및 고양이를 많이 키우는 일본을 상대로 수출 가능성도 있을 것으로 예상됩니다. (주)미래생명자원은 2018년 10월 반려동물용 기능성 제품 생산을 위한 공장을 준공하고 제품을 확대하고 있습니다.
- ② 조혈기능이 관여하는 인체용 건강기능식품 개발을 추진할 예정입니다. 혈행 개선 혹은 피로회복 등이 본 GABA 기반의 소재가 획득할 수 있는 개별인정형 항목으로 예상되며, 식약처와의 미팅을 통하여 조혈기능의 신규 개별인정형 가능성도 고려할 예정입니다. 주요 예상 소비자는 조혈 기능이 필요한 수험생, 격한 운동을 하는 운동선수, 임산부 등이 될 것으로 예상됩니다.
- ③ 기존 EPO 주사제가 판매되는 신부전증 빈혈환자, 항암제를 투여받는 암환자 등 EPO를 처방받는 사람들을 대상으로 치료제 혹은 치료용 보조제의 가능성을 염두에 두고 추가적인 연구 개발을 진행하고자 합니다.
- 이러한 목표를 달성하기 위해서는 각각의 인허가 기준 및 절차를 명확히 알아야 하고, 관련되는 실험도 GLP 등 일정 규격을 갖춘 시설에서 진행해야할 필요가 있어관련 인력 및 추가적인 재원이 필요할 것으로 예상됩니다. 참고로 주관기관인 (주)미래생명자원은 2017년 12월에 코스닥 시장에 상장을 하였으며, 본 과제의 GABA와 같은 기능성 소재를 생산하기 위하여 충북 오송에 공장 부지를 매입한 상태입니다.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

본 과제 결과물의 보안을 위하여 특허를 출원하고, 조기 심사를 통하여 등록시킨 바 있음. 관련된 기술의 보호를 위하여 개별인정형 획득 혹은 의약품(치료제 혹은 치료용 보조제)으로 인허가를 획득하는 방안을 고려하고 있음. 이 경우 추가적인 특허 출원 및 등록이 필요함.

2. 연구기관 자체의 검토결과

중소기업 여건상 대기업과 같은 보안 시스템을 보유하지는 못하였지만, 사업 영역이 확대되면서 관련되는 보안 시스템을 갖추고자 함.

(별첨 3)

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	GABA(γ -aminobutyric acid) 기반의 경구용 자돈 빈혈예방 제품 개발			
주관연구기관	미래생명자원		주관연구책임자	한종권
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	560,000,000	187,000,000		747,000,000
연구개발기간	2016. 09. 05 - 2018. 12. 31 (28개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(사업화 자료) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①사료첨가제용 GABA 생산공정 확립	대형 발효조를 이용한 GABA 생산 최적조건 확립
②Rat을 이용한 EPO 증가 확인	일반환경 rat의 EPO 증가 확인 및 유전자 분석완료
③Hep 3B cell을 이용한 EPO 생성 촉진 및 세포독성 실험	세포 독성 없음
④철결핍성, 용혈성 빈혈 유도 실험	빈혈유도 모델에서의 효능평가 완료
⑤임신돈 및 자돈 효능 실험	실제 농가 실험 진행 및 효능평가 완료
⑥품질관리 시스템 구축	품질관리 시스템 구축 완료
⑦제품등록 및 시제품 생산	제품 등록 및 시제품 생산 완료 (이천시청)
⑧piperine에 의한 세포독성, 증식변화 확인	세포독성 및 proliferation 확인
⑨Porcine kidney 세포의 GABA, piperine효과확인	단백질 및 mRNA 분석 완료
⑩GABA의 EPO, EPOR 발현기전 연구	기전 연구 완료
⑪GABA와 piperine의 기능 관련 기전 screening	GABA 및 piperine 처리시 microarray 분석 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구)
												논문 SC	논문 비	논문			학술	정책	
	특허	특허	품종	건수	기술	제품	매출	수출	고용	투자	논문	학술	교육	인력	정책	홍보	기타		

	출원	등록	등록	료	화	액	액	창출	유치	I	SC I	평균 IF	발표	활용	전시	활용 등)	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건
가중치																	
최종목표	1	0								1	2	2.9	1		0		
연구기간내 달성실적	1	1								1	0	2.9	2		2		
달성율(%)	100	100								100	0	100	100		100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	다년간의 GABA 연구 및 데이터를 기반한 철분주사 대체 기술
②	철분주사를 대체할 수 있는 GABA 외 유기태 철분과 piperine의 시너지 효과 기술
③	GABA의 대량발효 돋보이는 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v	v				v				
②의 기술	v	v								
③의 기술		v								

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	자돈 내 철분주사 대체 제품 및 사업화
②의 기술	애견, 애묘 빈혈 예방제제 및 인체 빈혈 예방제제로의 발전 가능성
③의 기술	GABA 생산의 원가 절감 및 신기능 탐색

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표				연구기반지표				
	지식 재산권	기술실시	사업화	기술	학술성과	교육	인력	정책 활용·홍보	기타 (타

	(이전)										논문		학술 발표	지도	양성	정책 활용	홍보 전시	연구 활용 등	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치	인증	SCI							비SCI
												SCI							비SCI
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표					1	300	1백만원												
연구기간내 달성실적					1														
연구종료후 성과창출 계획																			

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 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)