(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0011777
(43) 공개일자 2015년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 1/175 (2006.01) *A23K 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0092466
(22) 출원일자 2014년07월22일
심사청구일자 2014년07월22일
(30) 우선권주장
1020130086344 2013년07월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김현준
경남 진주시 신안들말길 17, 112동 103호 (신안동, 주공1차아파트)
김민희
경남 진주시 신안들말길 17, 112동 103호 (신안동, 주공1차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

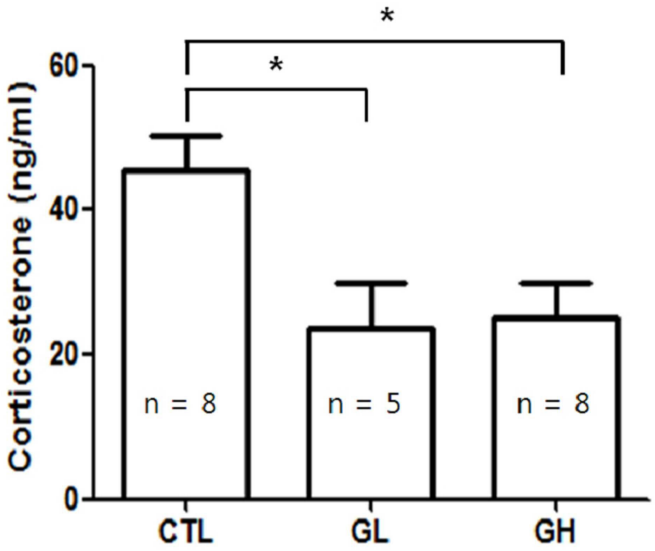
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **코르티코스테론 저하용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 글루타민을 유효성분으로 포함하는 코르티코스테론 저하용 식품 조성물, 사료 조성물, 글루타민을 포함하는 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 글루타민을 포함하는 조성물을 이용하여 코르티코스테론의 과다분비를 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 부작용을 나타내지 않으면서도, 코르티코스테론의 과다분비를 억제할 수 있으므로, 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

정순웅

경남 진주시 강남로189번길 25, 201호 (칠암동, 성채원룸)

손현위

경남 하동군 악양면 소축길 12-17

특허청구의 범위

청구항 1

글루타민을 포함하는 코르티코스테론 저하용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 코르티코스테론의 과다분비에 의해 유발되는 질환의 개선효과를 나타내는 것인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 코르티코스테론의 과다분비에 의해 유발되는 질환은 당뇨병, 고지혈증, 쿠싱 증후군, 이소성 ACTH 증후군, 저 칼륨혈증, 면역저하증, 면역결핍증, 고체온증, 공간인식장애, 골다공증 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환인 것인 조성물.

청구항 4

글루타민을 함유하는 사료첨가제를 포함하는 코르티코스테론 저하용 사료 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 코르티코스테론의 과다분비에 의해 유발되는 질환의 개선효과를 나타내는 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 코르티코스테론의 과다분비에 의해 유발되는 질환은 당뇨병, 고지혈증, 쿠싱 증후군, 이소성 ACTH 증후군, 저 칼륨혈증, 면역저하증, 면역결핍증, 고체온증, 공간인식장애, 골다공증 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환인 것인 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 글루타민은 사료첨가제 총중량에 대하여 20 중량% 내지 80 중량%로 포함되는 것인 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 사료첨가제는 사료 조성물 총중량에 대하여 0.05중량% 내지 2.0중량%의 함량으로 포함되는 것인 조성물.

청구항 9

글루타민을 포함하는 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 질환은 당뇨병, 고지혈증, 쿠싱 증후군, 이소성 ACTH 증후군, 고혈압, 저 칼륨혈증, 면역저하증, 면역결핍증, 고체온증, 공간인식장애(spatial cognitive impairment), 골다공증 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

글루타민을 포함하는 조성물을 코르티코스테론이 과다분비될 가능성이 있거나 또는 과다분비된 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코르티코스테론을 저하시키는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코르티코스테론 저하용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 글루타민을 유효성분으로 포함하는 코르티코스테론 저하용 식품 조성물, 사료 조성물, 글루타민을 포함하는 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 글루타민을 포함하는 조성물을 이용하여 코르티코스테론의 과다분비를 억제하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 코르티코스테론(corticosterone, CORT)은 척추동물의 부신 피질에서 생성되는 당질 코르티코스테로이드의 일종으로서, $C_{21}H_{30}O_4$의 화학식으로 표시되고, 무색판상 결정이며, 녹는점은 180~182℃이고, 비수용성이며, 240㎚에 흡수 극대를 가지는 스테로이드 호르몬으로서, 무기질성 코르티코이드(mineralocorticoid)인 알도스테론(aldosterone)의 전구체로서도 작용한다. 이는 생체내의 프레그네놀론 또는 프로게스테론으로부터 합성되고 신장에서 배설되는데, 스트레스로부터 생체를 방어하고, 단백질 분해를 촉진하며, 탄화수소의 합성을 촉진하고, 염증을 억제하며, 인슐린에 대하여 길항작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 상기 코르티코스테론이 과다분비되면, 고혈압 및 저 칼륨혈증을 나타내는데, 이러한 증상을 야기시키는 질환으로는 쿠싱 증후군, 부신종양, 이소성 ACTH 증후군, α-히드록시다제 결손증 등을 들 수 있다. 이에 반하여, 뇌하수체부전증, 에디슨(addison)병 등이 발병된 경우에는 코르티코스테론의 분비가 억제된다.

[0003] 가축의 사육시에는 좁은 공간, 과다한 식이 등의 사육조건으로 인하여 가축의 스트레스가 증가하게 되는데, 이처럼 증가하는 스트레스에 대항하기 위하여, 가축의 체내에서 코르티코스테론이 과다하게 분비되는 것으로 알려져 있다. 이처럼 코르티코스테론이 과다분비된 가축은 스트레스에 대한 저항성이 증가하는 반면, 체내 호르몬 시스템이 교란되어, 가축의 품질이 저하되는 문제점이 있다. 또한, 사람의 경우에도, 코르티코스테론이 과다분비되면 인슐린의 기능을 억제하여 당뇨병 증상이 발병하거나 또는 악화되고, 지방이 비정상적으로 체내에 축적되며, 혈압이 증가하고, 쿠싱 증후군, 이소성 ACTH 증후군 등이 발병되는 것으로 알려져 있다.

[0004] 이러한 코르티코스테론의 과다분비로 인하여 발병되는 질환을 치료하기 위한 제제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 없는 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 부작용이 없으면서도 코르티코스테론의 과다분비를 억제하거나 또는 저하시

킬 수 있는 제제를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 글루타민을 투여할 경우, 부작용이 나타나지 않으면서도 코르티코스테론의 혈중수준이 저하됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 글루타민을 포함하는 코르티코스테론 저하용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 글루타민을 함유하는 사료첨가제를 포함하는 코르티코스테론 저하용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 글루타민을 포함하는 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 글루타민을 포함하는 조성물을 이용하여 코르티코스테론의 과다분비를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상술한 목적을 달성하기 위한 하나의 실시양태로서, 본 발명은 글루타민을 포함하는 코르티코스테론 저하용 식품 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 부작용이 없으면서도 코르티코스테론의 과다분비를 억제할 수 있는 제제를 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 글루타민에 주목하게 되었다. 천연 아미노산의 일종인 글루타민은 단백질 또는 펩타이드를 구성하는 용도 이외에도 우울증 치료 등의 다양한 용도로 사용되고 있으므로, 상기 코르티코스테론 과다분비에 영향을 미칠 수 있는지를 확인하고자 하였다.

[0012] 그 결과, 글루타민을 지속적으로 섭취시킬 경우, 체중이 증가하고 글루타민 합성효소의 발현량이 변화하지 않으며, 별다른 부작용이 나타나지 않으면서도, 코르티코스테론의 혈중수준이 저하됨을 확인하였다.

[0013] 이처럼, 글루타민을 투여할 경우에는 별다른 부작용이 발생하지 않아, 안전성을 확보하면서도, 코르티코스테론의 혈중수준을 저하시킬 수 있으므로, 상기 글루타민을 코르티코스테론 과다분비를 억제하고 혈중 코르티코스테론을 저하시키기 위한 유효성분으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 상기 글루타민은 음식 등을 통하여 일반적으로 섭취가 가능하므로, 상기 글루타민을 코르티코스테론 저하용 식품 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어 "코르티코스테론(corticosterone)"이란, 척추동물의 부신 피질에서 생성되는 당질 코르티코스테로이드의 일종으로서, $C_{21}H_{30}O_4$의 화학식으로 표시되고, 무색판상 결정이며, 녹는점은 180~182℃이고, 비수용성이며, 240㎚에 흡수 극대를 가지는 스테로이드 호르몬을 의미한다. 이는 생체내의 프레그네놀론 또는 프로게스테론으로부터 합성되고 신장에서 배설되는데, 스트레스로부터 생체를 방어하고, 단백질 분해를 촉진하며, 탄화수소의 합성을 촉진하고, 염증을 억제하며, 인슐린에 대하여 길항작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 상기 코르티코스테론이 과다분비되면, 고혈압 및 저 칼륨혈증을 나타내는데, 이러한 증상을 야기시키는 질환으로는 쿠싱 증후군, 부신종양, 이소성 ACTH 증후군, α-히드록시다제 결손증 등을 들 수 있다. 이에 반하여, 뇌하수체부전증, addison 병 등이 발병된 경우에는 코르티코스테론의 분비가 억제된다.

[0015] 본 발명의 용어 "코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환"이란, 체내에서 코르티코스테론이 과다분비되어 유발되는 질환 또는 장애를 의미한다. 상기 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 과다분비된 코르티코스테론에 의하여 단백질과 지방이 포도당으로 전환되고 이로 인하여 혈당이 증가하여 발병되는 당뇨병, 지방의 분해로 인하여 생성되는 중성지방의 혈중농도 증가로 인하여 발병되는 고지혈증, 코르티코스테론이 과다분비되어 유

발되는 쿠싱 증후군 또는 이소성 ACTH 증후군, 과다한 심박수 증가에 의한 고혈압, 장내 칼륨흡수 억제에 의한 저 칼륨혈증, 과다한 염증억제에 의해 유발되는 면역저하증 또는 면역결핍증, 혈당증가로 인한 고체온증, 뇌기능손상에 의한 공간인식장애(spatial cognitive impairment) 또는 정신질환, 칼슘의 배출촉진으로 인한 골다공증 등이 될 수 있다.

[0016] 상기 글루타민은 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함된다. 식품이 음료인 경우에는 100㎖를 기준으로 1 내지 30g, 바람직하게는 3 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크륨(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[0017] 한편, 글루타민을 포함하는 식품 조성물을 이용하여 코르티코스테론 저하용 기능성 식품을 제조할 수 있다.

[0018] 구체적인 예로, 상기 조성물을 이용하여 농산물, 축산물 또는 수산물의 특성을 살려 변형시키는 동시에 저장성을 좋게한 가공식품을 제조할 수 있다. 이런 가공식품에는 예들 들어, 과자, 음료, 주류, 발효식품, 통조림, 우유가공식품, 육륙가공식품, 국수 등을 포함한다. 과자는 비스킷, 파이, 케익, 빵, 캔디, 젤리, 껌, 시리얼(곡물 푸레이크 등의 식사대용품류 포함) 등을 포함한다. 음료는 탄산음료, 기능성이온음료, 쥬스(예들 들어, 사과, 배, 포도, 알로에, 감귤, 복숭아, 당근, 토마토 쥬스 등), 식혜 등을 포함한다. 주류는 청주, 위스키, 소주, 맥주, 양주, 과실주 등을 포함한다. 발효식품은 간장, 된장, 고추장 등을 포함한다. 통조림은 수산물 통조림(예들 들어, 참치, 고등어, 꽁치, 소라 통조림 등), 축산물 통조림(쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 칠면조 통조림 등), 농산물 통조림(옥수수, 복숭아, 파일애플 통조림 등)을 포함한다. 우유가공식품은 치즈, 버터, 요구르트 등을 포함한다. 육류가공식품은 돈까스, 비프까스, 치킨까스, 소세지. 탕수육, 너겟류, 너비아니 등을 포함한다. 밀봉포장생면 등의 국수를 포함한다. 이 외에도 상기 조성물은 레토르트식품, 스프류 등에 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어 "기능성 식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 쿠싱 증후군의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0020] 상술한 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 글루타민을 함유하는 사료첨가제를 포함하는 코르티코스테론 저하용 사료 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 글루타민을 추가하지 않은 대조군, 저-글루타민 식이군 및 고-글루타민 식이군의 산란계를 각각 설정하고(실시예 1) 이들 산란계의 혈액을 검사한 결과, GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 활성, GGT(gamma-gluatamyl transpeptidase) 활성, 빌리루빈 수준 및 LDH(lactate dehydrogenase) 활성은 각 군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았고(도 2), 혈장내 글루코스 수준 및 콜레스테롤 수준은 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며(도 3), 단백질 수준 및 무기염류 수준은 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 5). 그러나, 신장기능에 영향을 미치는 혈중 질소화합물인 요산(Uric acid)과 요소질소(Urea nitrogen) 수준은 대조군 보다는 글루타민 식이군에서 높은 수준을 나타내었고, 글루타민 식이군 중에서도 고-글루타민 식이군 보다는 저-글루타민 식이군이 높은 수준의 혈중 요산 및 요소질소 수준을 나타내었으며(도 4), 코르티코스테론 수준은 대조군 보다는 글루타민 식이군에서

현저히 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다(도 6). 즉, 글루타민을 투여할 경우에는 혈중 코르티코스테론의 수준이 저하됨을 알 수 있었다.

[0022] 그에 따라, 추가로 산란계 뿐만 아니라 포유류인 생쥐에서도 코르티코스테론의 혈중 농도를 확인한 결과, 글루타민 식이군에서는 급성 스트레스에 따른 코르티코스테론의 증가 반응 자체를 억제하지는 못하지만, basal level의 혈중 코르티코스테론을 저하시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 11 내지 13).

[0023] 또한, 부작용을 확인하기 위하여, 상기 각 군의 산란계에서 간조직 및 뇌조직을 각각 적출하고 광학현미경으로 병변의 발생여부를 확인한 결과, 간과 뇌에서 특별한 병변이 발생되지 않았고(도 7 및 도 9), 상기 간조직과 뇌조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 활성을 비교한 결과 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 8 및 도 10).

[0024] 이러한 글루타민을 함유하는 사료첨가제를 포함하는 사료 조성물은 가축에서 코르티코스테론의 과다분비로 인하여 유발되는 질환을 예방 또는 개선시킬 수 있다. 이때, 코르티코스테론의 과다분비에 의해 유발되는 질환은 상술한 바와 같이, 당뇨병, 고지혈증, 쿠싱 증후군, 이소성 ACTH 증후군, 저 칼륨혈증, 면역저하증, 면역결핍증, 고체온증, 공간인식장애, 골다공증 등이 될 수 있다.

[0025] 한편, 상기 글루타민을 산란계에 투여할 경우, 산란계의 체중을 효과적으로 증가시킬 수 있었다. 즉, 알에서 갓 깨어난 산란계 수컷 병아리를 대상으로 상적인 병아리 사료를 먹인 대조군, 상기 사료에 사료 100g 당 15mg의 글루타민을 첨가한 사료를 먹인 저-글루타민 식이군 및 상기 사료에 사료 100g 당 30mg의 글루타민을 첨가한 사료를 먹인 고-글루타민 식이군을 각각 설정하고, 이들의 체중 증가량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 글루타민 식이군의 체중이 증가하였고, 고-글루타민 식이군 보다는 저-글루타민 식이군의 체중이 더욱 증가함을 확인하였다(도 1). 이때, 고-글루타민 식이군 보다는 저-글루타민 식이군에서 체중이 더욱 증가함을 알 수 있었으므로, 적절한 양의 글루타민 식이는 코르티코스테론의 혈중수준을 저하시킬 뿐만 아니라 가축의 성장을 촉진시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이때, 가축의 성장을 촉진시킬 수 있는 글루타민의 함량은 바람직하게는 사료 100g 당 1 내지 30mg, 보다 바람직하게는 사료 100g 당 11 내지 20mg, 가장 바람직하게는 사료 100g 당 15mg이 될 수 있다.

[0026] 이처럼, 산란계에 글루타민을 투여할 경우, 별다른 부작용이 발생하지 않으면서도, 코르티코스테론의 혈중수준을 저하시킬 수 있었으므로, 상기 글루타민은 코르티코스테론 저하용 사료첨가제로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0027] 본 발명의 용어 "사료첨가제"란, 가축의 생산성 향상이나 건강을 증진시키기 위해서 사료에 첨가되는 물질을 의미한다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 사료첨가제는 글루타민을 포함할 수 있고, 상기 사료첨가제에 포함되는 글루타민의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 사료첨가제 총중량을 기준으로 20 내지 80 중량%일 수 있고, 바람직하게는 30 내지 60 중량%일 수 있으며, 보다 바람직하게는 35 내지 50 중량%일 수 있다. 또한, 상기 사료첨가제는 상기 글루타민 이외에 5'-아데닐산, 크산틴산, 리보핵산, 디옥시리보핵산 등의 뉴클레오티드류 및 아미노산, 칼슘, 인산, 유기산 등의, 양돈의 생산성 또는 건강 증진에 필요한 필수 영양소를 완전공급하는 데 필요한 미량 성분들을 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "사료 조성물"이란, 가축의 사육목적에 맞는 영양소를 고르게 공급할 수 있도록 필요한 영양소를 혼합하여 제조한 사료를 의미하며, "배합사료"와 혼용될 수 있다. 상기 사료 조성물에 포함되는 영양소는 가축의 생존 및 성장에 필요한 에너지와 각종 성분을 제공할 수 있는 단백질, 지질, 비타민, 탄수화물, 미량원소 등을 포함한다. 상기 사료 조성물은 영양적인 면에서 볼 때, 가축의 식욕을 증진시키고 소화기관의 정상적인 작용을 촉진시키기 위하여 적정량의 고형물(固型物)을 포함할 수 있고, 가축의 생산활동을 충분히 발휘시키기 위해 적당한 양의 단백질을 포함할 수 있으며, 가축의 체온유지와 생산활동을 정상적으로 유지하기 위한 열량을

포함할 수 있고, 기타 칼슘인과 같은 무기물과 비타민도 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 사료 조성물은 당업계에 공지되거나 시판되는 임의의 배합사료에 글루타민을 포함하는 사료첨가제를 추가함으로써 구성될 수 있고, 글루타민을 함유한 사료첨가제가 추가되기만 한다면 사료 조성물의 구성요소 및 함량은 당업자에 의해 적절하게 조절될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 사료 조성물은 가축용 배합사료에 통상적으로 사용되는 옥수수, 쌀, 대두, 유장 등을 주요 성분으로서 포함할 수 있고, 바람직하게는, 옥수수, 쌀, 발효대두분, 대두, 혈장 단백질, 어분, 유장, 복합유제품, 대두유, 아미노산 프리믹스, 산미제 프리믹스, 및 사료첨가제 프리믹스를 포함할 수 있으며, 여기에 더하여 글루타민 함유 사료첨가제를 포함한다.

[0031] 상기와 같은 본 발명의 사료 조성물에 통상적으로 사용되는 성분들은 가축용 배합사료에 일반적으로 사용되는 적절한 범위로 포함될 수 있으며, 예를 들어, 배합사료 총중량을 기준으로 40 내지 45 중량%의 옥수수, 8 내지 12 중량%의 쌀, 3 내지 5 중량%의 발효대두분, 8 내지 10 중량%의 대두, 3 내지 5 중량%의 혈장 단백질, 4 내지 5 중량%의 어분, 5 내지 7 중량%의 유장, 7 내지 8 중량%의 복합유제품, 2 내지 3 중량%의 대두유, 0.1 내지 1 중량%의 아미노산 프리믹스, 1.5내지 3 중량%의 산미제 프리믹스, 3.5 내지 5 중량%의 사료첨가제 프리믹스의 양으로 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 사료 조성물에 포함되는 글루타민을 함유하는 사료첨가제의 함량은 특별히 제한되지 않으나, 사료 조성물의 총 중량을 기준으로 0.05 내지 2.0 중량%일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 0.4 중량%일 수 있으며, 가장 바람직하게는 0.1% 내지 0.2%일 수 있다. 따라서, 상기 사료 조성물에 포함된 글루타민의 함량은 양돈용 배합사료의 총중량을 기준으로 0.035 내지 0.14 중량%이며, 바람직하게는 0.035 내지 0.07 중량% 범위이다.

[0033] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 글루타민을 포함하는 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 상술한 바와 같이, 글루타민은 척추동물에서 분비되는 코르티코스테론의 혈중농도를 저하시킬 수 있으므로, 상기 글루타민을 포함하는 조성물은 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0035] 이때, 코르티코스테론의 과다분비에 의해 유발되는 질환은 상술한 바와 같이, 당뇨병, 고지혈증, 쿠싱 증후군, 이소성 ACTH 증후군, 저 칼륨혈증, 면역저하증, 면역결핍증, 고체온증, 공간인식장애, 골다공증 등이 될 수 있다.

[0036] 본 발명의 글루타민을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용

제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물에 포함된 상기 글루타민의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[0038] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[0039] 상술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 글루타민을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 코르티코스테론이 과다분비될 가능성이 있거나 또는 과다분비된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코르티코스테론을 저하시키는 방법을 제공한다.

[0040] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 글루타민은 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로서 사용할 수 있으므로, 상기 약학 조성물은 코르티코스테론을 저하시키고, 그의 과다분비를 억제 또는 완화시키는데 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 코르티코스테론이 과다분비될 가능성이 있거나 또는 과다분비된 모든 척추동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 코르티코스테론을 저하시키고, 그의 과다분비를 억제 또는 완화시킬 수 있다.

[0042] 본 발명의 용어 "완화"란, 본 발명에 따른 조성물의 투여로 코르티코스테론의 과다분비가 억제되거나 또는 호전되는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명의 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 코르티코스테론의 과다분비를 억제하는 방법에 있어서, 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 상기 글루타민을 포함하는 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 100 ㎎/㎏, 보다 바람직하게는 10 내

지 30 ㎎/㎏으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 약학 조성물은 부작용을 나타내지 않으면서도, 코르티코스테론의 과다분비를 억제할 수 있으므로, 코르티코스테론 과다분비에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 체중변화를 나타내는 그래프로서, (○)는 대조군을 나타내고, (●)는 저-글루타민 식이군을 나타내며, (▲)는 고-글루타민 식이군을 나타낸다.

도 2는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 효소활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 GOT 활성을 측정한 결과를 나타내고, (B)는 GGT 활성을 측정한 결과를 나타내며, (C)는 빌리루빈 수준을 측정한 결과를 나타내고, (D)는 LDH 활성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 3은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 글루코스 및 콜레스테롤 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 혈중 글루코스의 수준을 나타내고, (B)는 혈중 총 콜레스테롤의 수준을 나타내며, (C)는 혈중 HDLC(High dendity lipoprotein cholesterol) 수준을 나타낸다.

도 4는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 질소화합물의 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 혈중 요산의 수준을 나타내고, (B)는 혈중 요소질소의 수준을 나타낸다.

도 5는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 단백질 및 무기염류 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 혈중 총 단백질의 수준을 나타내고, (B)는 혈중 알부민의 수준을 나타내며, (C)는 혈중 칼슘의 수준을 나타내고, (D)는 혈중 무기인산염의 수준을 나타낸다.

도 6은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 코르티코스테론 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 간조직을 나타내는 사진으로서, 상단은 100배 배율로 확대한 사진이고, 하단은 200배 배율로 확대한 사진이다.

도 8의 A는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 간조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 수준을 나타내는 사진 및 그래프이고, 도 8의 B는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 간조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 활성을 나타내는 그래프이다.

도 9는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 대뇌피질을 나타내는 사진으로서, 상단은 200배 배율로 확대한 사진이고, 하단은 400배 배율로 확대한 사진이다.

도 10의 A는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 대뇌피질에서 발현되는 글루타민 합성효소의 수준을 나타내는 사진 및 그래프이고, 도 10의 B는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 뇌조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 활성을 나타내는 그래프이다.

도 11은 생쥐에서 대조군(CTL)과 글루타민 식이군(CTL+LG)에서 혈중 코르티코스테론의 수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 생쥐에 신체 구금 스트레스를 가한 직후에 대조군(STR)과 글루타민 식이군(STR+LG)에서 혈중 코르티코스테론의 수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 생쥐에 신체 구금 스트레스를 가한 후 24시간 뒤에 대조군(STR)과 글루타민 식이군(STR+LG)에서 혈중 코르티코스테론의 수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하

기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1: 글루타민 섭식에 따른 먹이 섭취량 및 체중의 변화**

[0050] 알에서 갓 깨어난 산란계 수컷 병아리를 대상으로 생후 32일간 정상적인 병아리 사료를 먹인 대조군, 상기 사료에 사료 100g 당 15mg의 글루타민을 첨가한 사료를 먹인 저-글루타민 식이군 및 상기 사료에 사료 100g 당 30mg의 글루타민을 첨가한 사료를 먹인 고-글루타민 식이군을 각각 설정하였다. 상기 설정된 각 군의 병아리를 25℃로 유지되는 상태에서, 24시간 조명이 갖추어진 상태에서 사육하면서, 이틀간격으로 이들의 체중증가량을 측정하였다(도 1).

[0051] 도 1은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 체중변화를 나타내는 그래프로서, (○)는 대조군을 나타내고, (●)는 저-글루타민 식이군을 나타내며, (▲)는 고-글루타민 식이군을 나타낸다. 도 1에서 보듯이, 대조군에 비하여 글루타민 식이군의 체중이 증가하였고, 고-글루타민 식이군 보다는 저-글루타민 식이군의 체중이 더욱 증가함을 확인하였다.

[0052] **실시예 2: 혈액검사**

[0053] 생후 32일 되던 날, 상기 실시예 1의 각 군의 병아리들을 이산화탄소 마취시키고, 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 상기 채취한 혈액을 EDTA 가 함유된 vacutaier에 적용하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리함으로써 혈장을 수득하고, 이를 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하고, 상기 보관된 혈장시료를 사용하여 다양한 혈액검사를 수행하였다.

[0054] **실시예 2-1: 혈장내 효소활성 분석**

[0055] 상기 보관된 혈장을 대상으로 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 활성, GGT(gamma-gluatamyl transpeptidase) 활성, 빌리루빈 수준 및 LDH(lactate dehydrogenase) 활성을 각각 측정하였다(도 2).

[0056] 도 2는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 효소활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 GOT 활성을 측정한 결과를 나타내고, (B)는 GGT 활성을 측정한 결과를 나타내며, (C)는 빌리루빈 수준을 측정한 결과를 나타내고, (D)는 LDH 활성을 측정한 결과를 나타낸다. 도 2에서 보듯이, 측정된 혈장내 효소활성은 모두 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0057] **실시예 2-2: 혈중 글루코스 및 콜레스테롤 분석**

[0058] 상기 보관된 혈장을 대상으로 글루코스 수준 및 콜레스테롤 수준을 분석하였다(도 3).

[0059] 도 3은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 글루코스 및 콜레스테롤 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 혈중 글루코스의 수준을 나타내고, (B)는 혈중 총 콜레스테롤의 수준을 나타내며, (C)는 혈중 HDLC(High dendity lipoprotein cholesterol) 수준을 나타낸다. 도 3에서 보듯이, 측정된 혈장내 글루코스 수준 및 콜레스테롤 수준은 모두 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0060] **실시예 2-3: 혈중 질소화합물 분석**

[0061] 상기 보관된 혈장을 대상으로 신장기능에 영향을 미치는 혈중 질소화합물인 요산(Uric acid)과 요소질소(Urea nitrogen) 수준을 분석하였다(도 4).

[0062] 도 4는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 질소화합물의 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 혈중 요산의 수준을 나타내고, (B)는 혈중 요소질소의 수준을 나타낸다. 도 4에서 보듯이, 대조군 보다는 글루타민 식이군의 혈중 요산 및 요소질소의 수준이 높은 수준을 나타내었고, 글루타민 식이군 중에서도 고-글루타민 식이군 보다는 저-글루타민 식이군이 높은 수준의 혈중 요산 및 요소질소 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0063] **실시예 2-4: 혈중 단백질 및 무기염류 분석**

[0064] 상기 보관된 혈장을 대상으로 혈중 단백질 및 무기염류 수준을 분석하였다(도 5).

[0065] 도 5는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 단백질 및 무기염류 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프로서, (A)는 혈중 총 단백질의 수준을 나타내고, (B)는 혈중 알부민의 수준을 나타내며, (C)는 혈중 칼슘의 수준을 나타내고, (D)는 혈중 무기인산염의 수준을 나타낸다. 도 5에서 보듯이, 측정된 혈장내 단백질 수준 및 무기염류 수준은 모두 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0066] **실시예 2-5: 혈중 코르티코스테론 분석**

[0067] 상기 보관된 혈장을 대상으로 혈중 코르티코스테론 수준을 분석하였다(도 6).

[0068] 도 6은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 혈장내 코르티코스테론 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6에서 보듯이, 대조군 보다는 글루타민 식이군에서 혈중 코르티코스테론의 수준이 현저히 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0069] 이러한 결과를 통하여, 글루타민이 가축의 성장에 나쁜 영향을 줄 수 있는 코르티코스테론의 혈중농도를 저하시킬 뿐만 아니라 그의 과다분비를 억제할 수 있는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0070] **실시예 3: 간조직 검사**

[0071] 생후 32일 되던 날, 상기 실시예 1의 각 군의 병아리들을 이산화탄소 마취시키고, 간조직을 적출한 다음, 액체질소로 급속 냉동시킨 뒤 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하고, 상기 보관된 간조직을 사용하여 다양한 검사를 수행하였다.

[0072] **실시예 3-1: 조직검사**

[0073] 상기 보관된 간조직을 4% 중성-paraformaldehyde 용액으로 고정하고, 파라핀 포매 과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 상기 제작한 조직절편을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하고 광학현미경하에서 병변의 발생여부를 관찰하였다(도 7).

[0074] 도 7은 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 간조직을 나타내는 사진으로서, 상단은 100배 배율로 확대한 사진이고, 하단은 200배 배율로 확대한 사진이다. 도 7에서 보듯이, 대조군과 동일하게 글루타민 식이군의 간조직에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았다.

[0075] **실시예 3-2: 글루타민 합성효소(glutamine synthetase, GS)의 발현수준 및 활성 분석**

[0076] 먼저, 간조직에서 발현되는 GS의 발현수준은 상기 간조직을 균질화하여 얻어진 시료를 대상으로 하여, 항-GS 항체(1:5000, MAB302, Millipore, USA), 항-GFAP 항체(1:2000, 18-0063, Invitrogen, USA) 및 ECL detection kit(Pierce, USA)를 이용한 면역블럿 분석법을 수행하여 측정하였다(도 8의 A).

[0077] 도 8의 A는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 간조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 수준을 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 8의 A에서 보듯이, 저-글루타민 식이군은 대조군 및 고-글루타민 식이군에 비하여 GS가 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.

[0078] 다음으로, 간조직에서 발현되는 GS의 활성을 다음과 같이 분석하였다: 간조직을 균질화하고, 12,000 rpm 및 4℃의 조건에서 20분동안 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 상기 상층액 10㎕에 GS 생합성 반응완충액 90㎕을 가하여 혼합하고, 37℃에서 30분 동안 정치시켰다. 상기 혼합액 50㎕를 96웰 플레이트에 분주한 150㎕의 인산염 검출용액의 Solution D 또는 E에 가하고 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응시켜서 발색반응을 수행하였다. 5분이 경과한 후에, 상기 반응액에 인산염 검출용액의 Solution F 150㎕를 가하여 반응을 종결시키고, 15분 동안 실온에서 순응시킨 다음, 690 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 8의 B). 이때, GS 생합성 반응완충액의 조성은 100 mM imidazole, 50 mM $MgCl_26H_2O$, 100mM monosodiumglutamate, 50mM NH_4Cl 및 10mM ATP(pH 7.5)이다. 또한, 인산염 검출용액에 포함된 Solution A, B, C, D, E 및 F의 조성은 다음과 같다: Solution A, 12% w/v L-ascorbic acid in 1N HCl; Solution B, 2% w/v ammonium molybdate tetrahydrate in dH_2O; Solution C, 1% w/v ammonium molybdate tetrahydrate in dH_2O; Solution D, mixture of two parts Solution A and one part Solution B(for colordevelopment); Solution E, mixture of two parts Solution A and one part Solution C; Solution F, 2% sodium citrate tri basic dehydrate and 2% acetic acid in dH_2O(to stop color development).

[0079] 도 8의 B는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 간조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 활성을 나타내는 그래프이다. 도 8의 B에서 보듯이, 측정된 글루타민 합성효소의 활성은 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0080] **실시예 4: 뇌조직 검사**

[0081] 생후 32일 되던 날, 상기 실시예 1의 각 군의 병아리들을 이산화탄소 마취시키고, 뇌조직을 적출한 다음, 액체질소로 급속 냉동시킨 뒤 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하고, 상기 보관된 뇌조직을 사용하여 다양한 검사를 수행하였다.

[0082] **실시예 4-1: 조직검사**

[0083] 상기 보관된 뇌조직의 대뇌피질을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법을 사용하여 대뇌피질에서 병변의 발생여부를 관찰하였다(도 9).

[0084] 도 9는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 대뇌피질을 나타내는 사진으로서, 상단은 200배 배율로 확대한 사진이고, 하단은 400배 배율로 확대한 사진이다. 도 9에서 보듯이, 대조군과 동일하게 글루타민 식이군의 대뇌피질에서는 어떠한 병변도 관찰되지 않았다.

[0085] **실시예 4-2: 글루타민 합성효소의 발현수준 및 활성 분석**

[0086] 먼저, 간조직 대신에 상기 뇌조직의 대뇌피질을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 3-2와 동일한 방법을 사용하여, 뇌조직에서 발현되는 GS의 발현수준을 측정하였다(도 10의 A).

[0087] 도 10의 A는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 대뇌피질에서 발현되는 글루타민 합성효소의 수준을 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 10의 A에서 보듯이, 측정된 글루타민 합성효소의 수준은 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0088] 다음으로, 간조직 대신에 상기 뇌조직의 대뇌피질을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 3-2와 동일한 방법을 사용하여, 뇌조직에서 발현되는 GS의 활성을 측정하였다(도 10의 B).

[0089] 도 10의 B는 글루타민 함유 식이를 수행한 병아리의 뇌조직에서 발현되는 글루타민 합성효소의 활성을 나타내는 그래프이다. 도 10의 B에서 보듯이, 측정된 글루타민 합성효소의 활성은 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0090] **실시예 5: 생쥐를 이용한 글루타민 섭식의 혈중 코르티코스테론 감소효과 확인**

[0091] 상기 실시예를 통하여, 병아리에서 글루타민 섭식 시에 다른 대부분의 인자들에서는 대조군과 별다른 차이가 없으나, 코르티코스테론의 혈중농도를 저하시키는 효과가 있음을 확인하였는바, 포유류에서도 동일한 효능이 있는지를 확인하기 위하여 추가로 생쥐를 이용한 실험을 진행하였다.

[0092] 구체적으로, 9주된 FVB 생쥐를 대상으로, 정상적인 사료를 먹이는 대조군과 1kg 당 150mg의 글루타민을 첨가한 사료를 먹이는 저-글루타민(Low glutamine, LG) 식이군으로 나누어 실험을 진행하였다. 혈중 코르티코스테론의 측정 과정을 위하여, 먼저 각 군의 생쥐들을 이산화탄소 마취시키고, 심장으로부터 혈액을 채취하여 EDTA가 함유된 진공채혈기(vacutainer)에 모아 1,000g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 수득하고, 이를 -80℃ 초저온 냉장고에 보관하였으며, 이후 코르티코테론 EIA kit(500655, Cayman, USA)를 이용하여 혈중 코르티코스테론을 측정하였다.

[0093] 먼저, 신체 구금 스트레스를 가하기 전의 일반적인 조건에서 7일동안 식이만을 달리하여 적응기간을 거친 후, 대조군과 글루타민 식이군의 혈중 코르티코스테론을 비교한 결과, 도 11에서 보는 바와 같이, 글루타민 식이군(CTL+LG)에서 코르티코스테론의 혈중 농도가 현저하게 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[0094] 추가적으로, 신체 구금 스트레스를 가한 경우에도 글루타민 식이가 혈중 코르티코스테론에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 원통형의 restrainer에 2시간 동안 200 lux의 조명에서 결박을 하여 신체 구금 스트레스를 가하였다. 이 때, 7일간의 적응기간을 가진 후, 7일 동안 실험군에 신체 구금 스트레스를 가하였다.

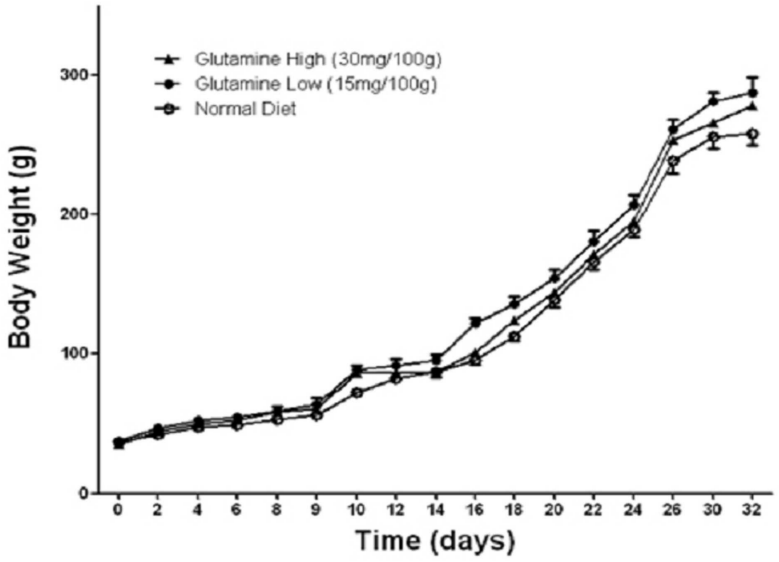
[0095] 먼저, 신체 구금 스트레스 마지막날, 스트레스를 가한 직후에 혈액을 채취하여 혈중 코르티코스테론을 측정한 결과, 도 12에서 보는 바와 같이, 스트레스만을 가한 대조군(STR)과 스트레스를 가한 글루타민 함유 식이군(STR+LG)에서 별다른 차이가 없었다. 이러한 결과는, 급성 스트레스 반응을 위하여 코르티코스테론이 증가하는 반응에 대해서는 글루타민 섭식이 별다른 영향을 주지 못한다는 것을 의미하였다. 즉, 올바른 스트레스 반응을 위한 급격한 코르티코스테론의 증가 자체를 막는 것은 아님을 확인하였다.

[0096] 이에 따라, 코르티코스테론이 급격하게 증가한 이후에 글루타민 식이군에서 이를 효과적으로 저하시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 마지막 스트레스를 가한 이후 24시간 뒤에 혈액을 채취하여 코르티코스테론의 혈중 농도를 재차 측정하였다. 즉, 기저 수준(basal level)의 코르티코스테론의 농도를 확인하고자 하였다. 그 결과, 도 13에서 보는 바와 같이, 대조군(STR)에 비하여 글루타민 식이군(STR+LG)에서는 코르티코스테론의 혈중 농도가 현저하게 낮아진 것을 확인하였다. 이러한 결과는, 글루타민을 섭식시키게 되면, 코르티코스테론이 스트레스 반응 이후에 빠른 속도로 정상 수준으로 회복되면서 질병을 일으킬 수 있는 더 이상의 불필요한 반응을 하지 않을 수 있게 됨을 의미하는 결과이다.

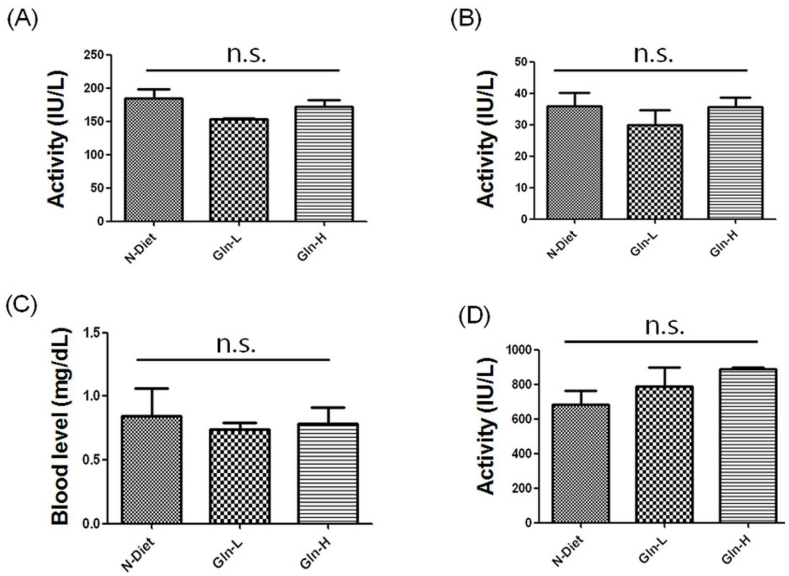
[0097] 이러한 결과를 통하여, 포유류에서도 역시 글루타민 식이가 코르티코스테론 농도의 저하를 통한 조절이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

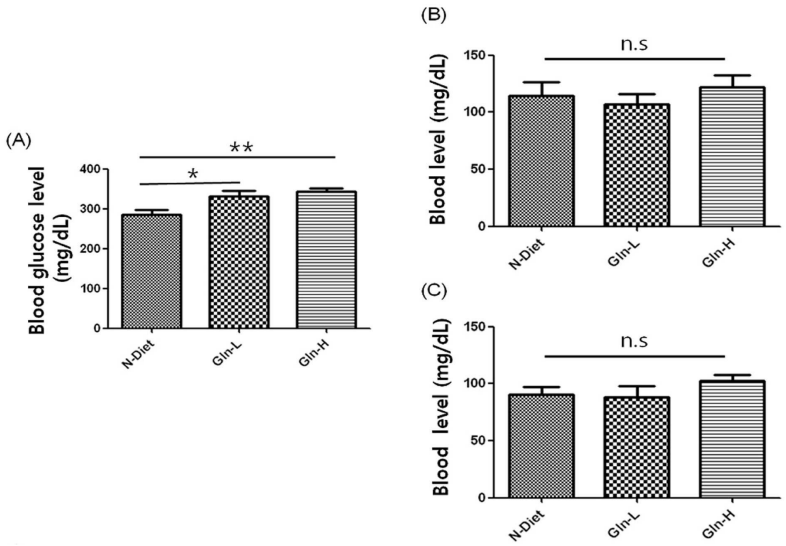
도면1



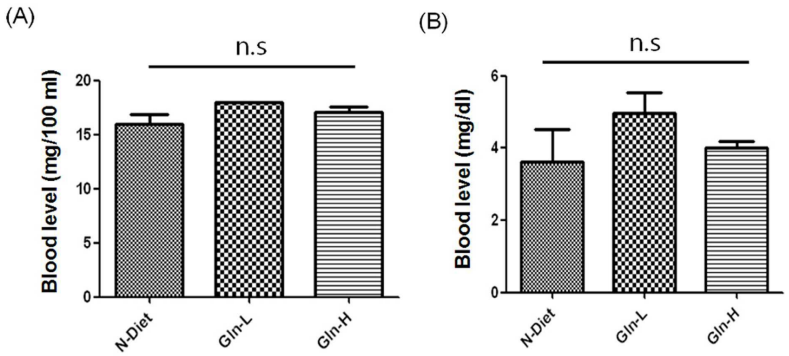
도면2



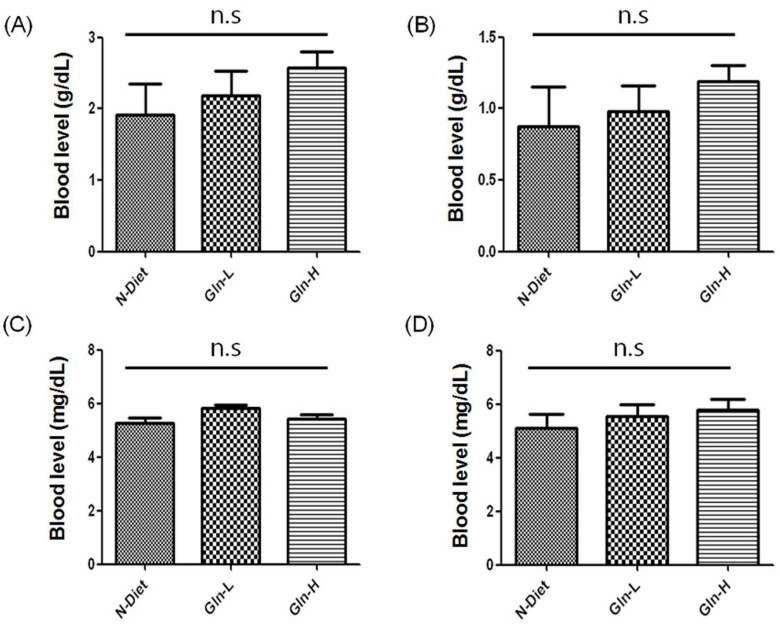
도면3


(A)
Blood glucose level (mg/dL)
400
300
200
100
0
*
**
N-Diet
Gln-L
Gln-H
(B)
Blood level (mg/dL)
150
100
50
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H
(C)
Blood level (mg/dL)
150
100
50
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H

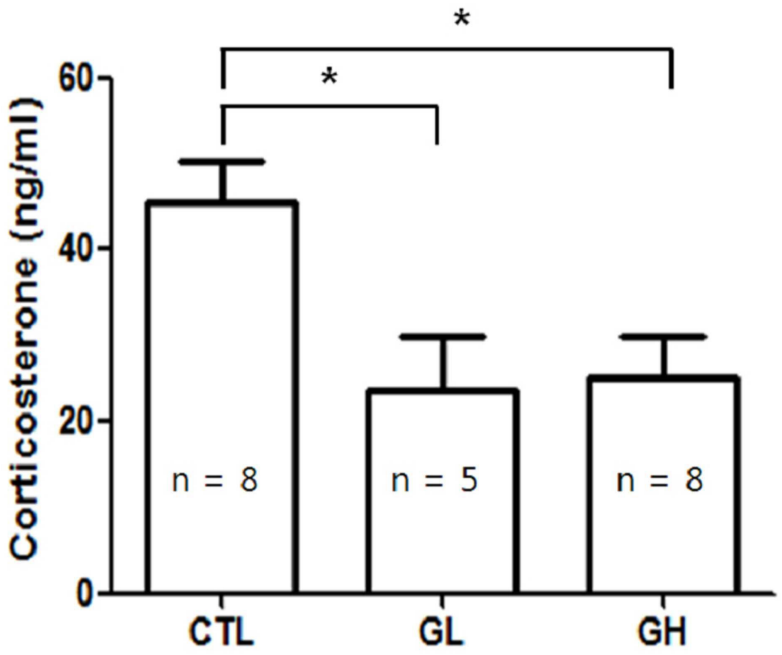
도면4


(A)
Blood level (mg/100 ml)
20
15
10
5
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H
(B)
Blood level (mg/dl)
6
4
2
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H

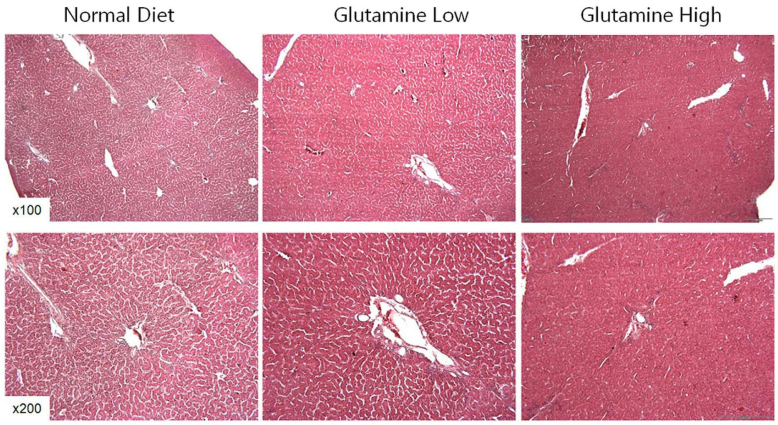
도면5


(A)
Blood level (g/dL)
3
2
1
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H
(B)
Blood level (g/dL)
1.5
1.0
0.5
0.0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H
(C)
Blood level (mg/dL)
8
6
4
2
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H
(D)
Blood level (mg/dL)
8
6
4
2
0
n.s
N-Diet
Gln-L
Gln-H

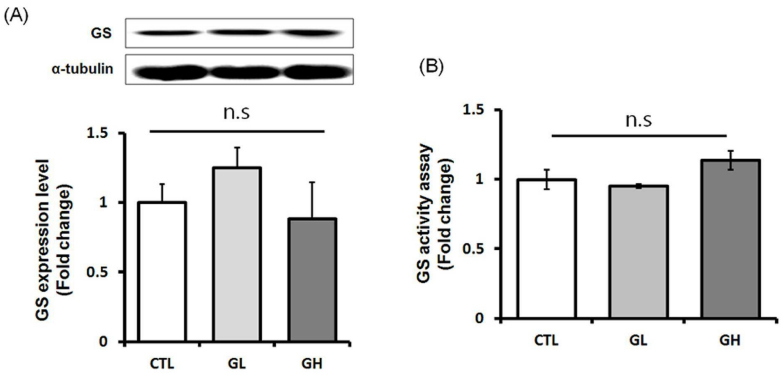
도면6


*
*
60
40
20
0
Corticosterone (ng/ml)
n = 8
n = 5
n = 8
CTL
GL
GH

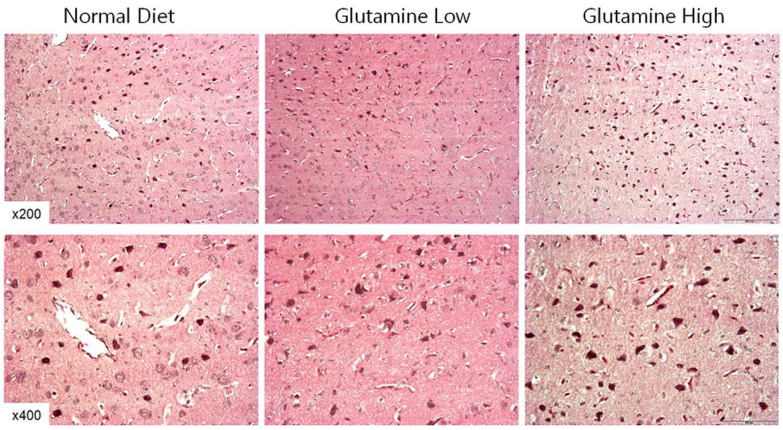
도면7


Normal Diet
Glutamine Low
Glutamine High
x100
x200

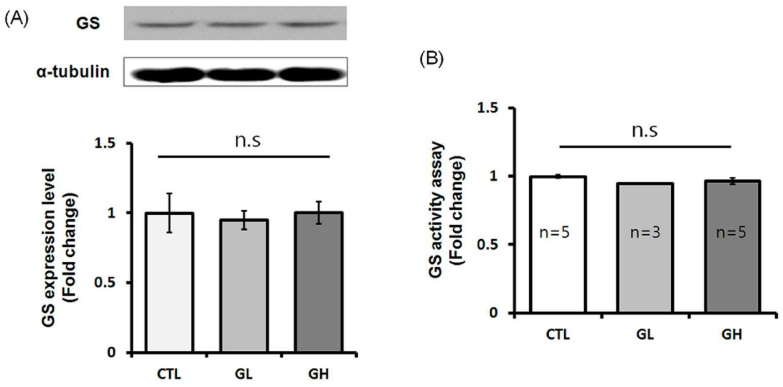
도면8


(A)
GS
α-tubulin
n.s
1.5
1
0.5
0
GS expression level (Fold change)
CTL
GL
GH
(B)
n.s
1.5
1
0.5
0
GS activity assay (Fold change)
CTL
GL
GH

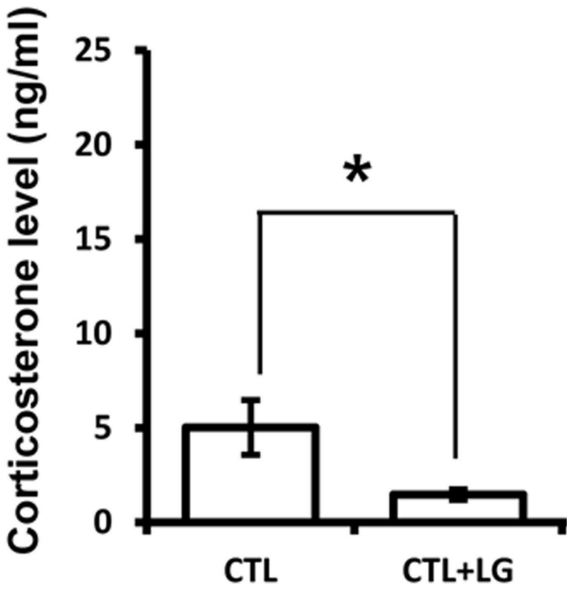
도면9



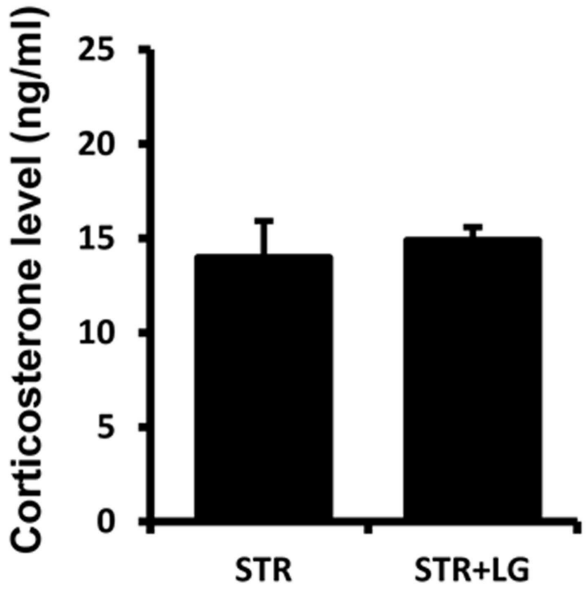
도면10



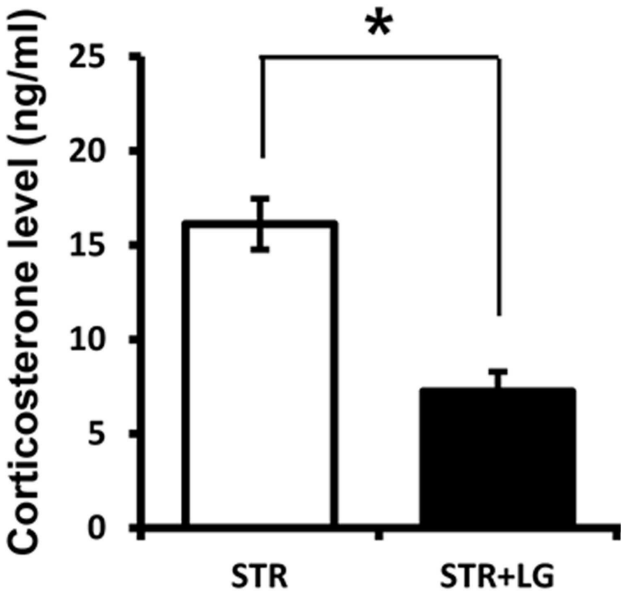
도면11



도면12


Corticosterone level (ng/ml)
25
20
15
10
5
0
STR
STR+LG

도면13


*
Corticosterone level (ng/ml)
25
20
15
10
5
0
STR
STR+LG