

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2020년 5월 22일 (22.05.2020) WIPO | PCT

WO 2020/101442 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/64 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 38/17 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61K 36/232 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 25/28 (2006.01)

KR]; 17058 경기도 용인시 처인구 명지로 116, Gyeonggi-do (KR). 한림대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) [KR/KR]; 24252 강원도 춘천시 한림대학길 1, Gangwon-do (KR).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/015688

(22) 국제출원일: 2019년 11월 15일 (15.11.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

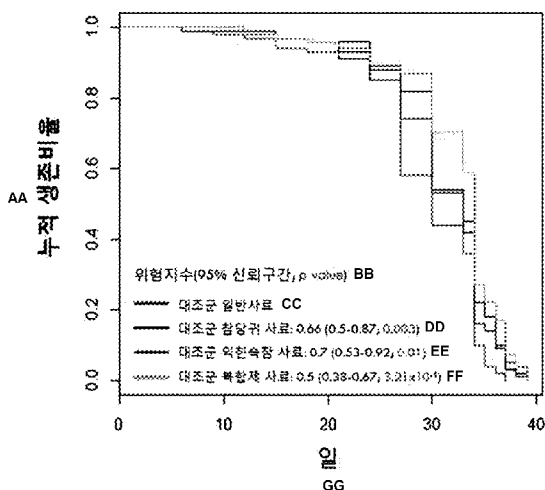
(30) 우선권정보:
10-2018-0140505 2018년 11월 15일 (15.11.2018) KR

(71) 출원인: 대한민국(농촌진흥청장) (REPUBLIC OF KOREA(RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)) [KR/KR]; 54875 전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300, Jeollabuk-do (KR). 명지대학교 산학협력단 (MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION) [KR/

(72) 발명자: 지상덕 (JI, Sang Deok); 18376 경기도 화성시 영통로 27번길 35, 308동 1502호, Gyeonggi-do (KR). 김기영 (KIM, Kee Young); 55365 전라북도 완주군 이서면 갈산1로 71, 808동 701호, Jeollabuk-do (KR). 김남숙 (KIM, Nam Suk); 55365 전라북도 완주군 이서면 출판로 25, 105동1205호, Jeollabuk-do (KR). 조유영 (JO, You Young); 55365 전라북도 완주군 이서면 출판로 25, 102동303호, Jeollabuk-do (KR). 김수배 (KIM, Su Bae); 54961 전라북도 전주시 완산구 척동1길 18-3, 203호, Jeollabuk-do (KR). 김성완 (KIM, Sung Wan); 22740 인천시 서구 청라에메랄드로 30, 103동 301호, Incheon (KR). 김종길 (KIM, Jong Gil); 55365 전라북도 완주군 이서면 출판로 25, 101동 1402호, Jeollabuk-do (KR). 김영국 (KIM, Young Guk); 16399 경기도 수원시 권선구 매실로19번길 19, 101동 1606호, Gyeonggi-do (KR). 고영

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPROVING MEMORY, OR COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING ALZHEIMER'S DISEASE, COMPRISING ANGELICA ROOT EXTRACT AND SILKWORM PRODUCT HAVING SILK PROTEIN

(54) 발명의 명칭: 건사단백질을 갖는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 함유하는 기억력 개선용 조성물 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 조성물



AA ... Accumulated survival rate
BB ... Risk score(95% confidence interval, p value)
CC ... Control group on normal feed
DD ... Control group on Angelica gigas Nakai feed: 0.66 (0.5-0.87, 0.003)
EE ... Control group on cooked silkworm feed: 0.7 (0.53-0.92, 0.01)
FF ... Control group on composite feed: 0.5 (0.38-0.67, 3.21x10-6)
GG ... Days

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for improving memory, or a composition for preventing and treating Alzheimer's disease, or a method for preparing said compositions, or a treatment method, wherein said compositions are characterized by comprising a cooked silkworm product and an Angelica root extract as effective components. As the present invention provides compositions using an Angelica root extract and a silkworm product rich in silk proteins and functional materials derived from mulberry leaves to improve memory and prevent or treat Alzheimer's disease, various health supplement products or drugs using the present invention are expected to be developed and commercialized, making it possible to fundamentally prevent and treat aging and dementia associated with aging, which are arising as a major problem in modern societies, and also to provide benefits of memory improvements in various other demographics, such as students, students studying for exams, office workers, etc.

(57) 요약서: 본 발명은 기억력 개선용 조성물 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 조성물 또는 상기 조성물들의 제조 방법 또는 치료 방법에 관한 것으로서, 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 것이 특징이다. 본 발명에 의해, 건사단백질과 뽕잎 유래 기능성물질이 다량 함유된 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물에 의한 기억력 개선 및 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료용 조성물이 제공됨에 따라, 본 발명을 이용한 각종 건강보조식품 또는 의약품이 개발되어 시판될 것으로 예상되는 바, 이로 인하여 현대사회에 큰 문제로 부각되고 있는 고령화와 고령화로 인한 치매를 근본적으로 예방 및 치료할 수 있을 것으로 기대되며, 아울러 학생, 수험 준비생, 회사원 등 다양한 국민들의 기억력 개선에도 도움을 주게 될 것으로 기대된다.



호 (KO, Young Ho); 14106 경기도 안양시 동안구 흥안대로 223번길 47, 101동 1404호, Gyeonggi-do (KR). 김아영 (KIM, A Young); 21579 인천시 남동구 호구포로 739번길 82-1, 3동 202호, Incheon (KR). 최보혜 (CHOI, Bo Hae); 12251 경기도 남양주시 도농로 34, 402동 505호, Gyeonggi-do (KR). 누젠푸엥 (NGUYEN, Phuong); 14066 경기도 안양시 동안구 관평로 170번길 15, 707호, Gyeonggi-do (KR). 박현우 (PARK, Hyun Woo); 17063 경기도 용인시 처인구 백옥대로1068번길 12, 105동 1701호, Gyeonggi-do (KR). 서주원 (SUH, Joo Won); 17024 경기도 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84, 1호, Gyeonggi-do (KR). 김휘 (JIN, Hui); 06754 서울시 서초구 양재천로13길 28, 102동 602호, Seoul (KR). 송미경 (SONG, Mi Kyung); 01377 서울시 도봉구 우이천로 38다길 27, A동 401호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20, 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 전사단백질을 갖는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 함유하는 기억력 개선용 조성물 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 전사단백질을 갖는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 함유하는 기억력 개선용 조성물 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 기억력 개선 및 알츠하이머성 치매 예방 효능을 나타내는 2가지 물질을 결합함에 따라 단독물질 대비 보다 현저한 효능을 나타내는 전사단백질을 갖는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 함유하는 기억력 개선용 조성물 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

배경기술

- [2] 우리나라는 연도별 출산율이 급속하게 감소하고 있는 상황이다. 2017년에는 1.05명으로 역대 최저수치에 도달하였고 이는 경제협력개발기구 회원국 2015년 평균치인 1.68명에 0.53명이나 미달하는 수치이다. 2017년 12월의 신생아 출생자 수는 25,000명으로 사망자 수 26,900명보다 적었고, 2018년도에는 신생아 출생자 수가 더 줄어들어 1~4월의 출산 신생아 수가 117,300명으로 감소하여 출산율이 1.0미만으로 줄어들 것으로 예측되고 있다. 이렇게 낮은 저 출산율은 우리나라의 총인구가 줄어드는 시점을 2031년에서 2027년으로 앞당길 것으로 예측이 되고 있으며, 이에 따라 노인인구의 비율도 급속하게 증가될 것으로 예측되고 있다.
- [3] 2017년 현재 우리나라의 65세 이상 노인 인구는 14%인 700만 명으로 집계되고 있으며, 상기와 같은 출산율 감소와 노령화 추세가 지속될 경우 2060년경에는 전체인구의 41.0% 정도로 급증할 것으로 예상되고 있는데, 문제는 65세 이상의 노인들은 남은 생애 동안 하나 이상의 만성질환으로 고통을 받는다는 것이다. 그 중에서도 노인들이 가장 두려워하는 질환은 현재까지 완치하는 방법이 개발되지 않은 치매이다. 치매는 크게 알츠하이머 치매, 혈관성 치매, 파킨슨병 치매 등으로 나누어지는데 그 중에서도 60% 이상이 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease; AD)로 고통을 받고 있는데, 현재까지 알츠하이머 치매를 예방하거나 완치할 수 있는 치료약이나 방법은 개발되어 있지 않다.
- [4] 중앙치매센터의 분석자료에 따르면 2017년도 치매 환자 수는 724천명에 달하고 2040년도에는 168만 명, 그리고 2050년도에는 212만7천명에 이를 것으로 예측되고 있다. 이에 따른 치매관리 비용의 급격한 증가도 예상이 되는데, 2012년도에 이미 10조 3천억 원이 관리비용이 투입되었고, 2040년도에는 78조 4천억 원, 2050년도에는 134조 6천억 원으로 치매관리비용의 급증이 예상되고 있다. 이에 따라 서울대학교병원이 2008년에 실시한 치매 유병율

조사결과보고서에 따르면 치매 발병을 2년 늦추면 40년 후에는 유병율이 20% 감소할 것으로 예측하고 있어서, 2040년을 기준으로 환산하면 15조 6천억 원의 국가치매관리비용이 경감될 것으로 예측된다.

[5] 그러나, 현재 치매의 치료방법은 근본적인 원인의 해결이 아닌 증상 완화 목적의 처치로서, 발병의 억제, 지연 또는 치료를 위한 물질의 개발이 필요한 상황이다.

[6] 또한 우리나라는 2015년 현재 학령인구가 755만 9천명에 달할 정도로 수많은 사람이 학업에 정진하고 있다. 이들 학생 이외에도 대학교 졸업생과 회사원들도 다양한 종류의 시험 준비 등을 위해서는 학업을 멀리할 수 없는 상황으로, 이들이 효율적으로 기억력을 증진시킬 수 있다면 학습 성과가 올라가서 원하는 목표를 달성하는데 동력을 줄 수 있을 것이다. 이에 호응하여 다양한 종류의 기억력 개선용 제품이 출시되어 있지만, 효과가 미미하여 소비자들의 요구에 완벽하게 호응하는 제품은 거의 없는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명의 목적은 치매 예방 또는 기억력 개선 효능을 보다 현저하게 높인 견사단백질을 갖는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 함유하는 기억력 개선용 조성물 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

[8] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 기억력 개선, 알츠하이머성 치매 예방 및 개선용 약학 조성물 또는 식품 조성물은, 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 포함하는 것이 특징이다.

[9] 상기 익힌 누에가공물은 견사단백질을 갖고 있는 누에전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익혀 견사단백질이 포함된 상태에서 식이용으로 섭취가능한 것이 특징이다.

[10] 상기 익힌 누에가공물 및 상기 당귀 추출물은 1 : 0.1~1 중량비로 구성되는 것이 특징이다.

[11] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[12] 본 발명에 의해, 견사단백질과 뽕잎 유래 기능성물질이 다량 함유된 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물에 의한 기억력 개선 및 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료용 조성물이 제공됨에 따라, 본 발명을 이용한 각종 건강보조식품 또는 의약품이 개발되어 시판될 것으로 예상되는 바, 이로 인하여 현대사회에 큰 문제로 부각되고 있는 고령화와 고령화로 인한 치매를 근본적으로 예방 및

치료할 수 있을 것으로 기대되며, 아울러 학생, 수험 준비생, 회사원 등 다양한 국민들의 기억력 개선에도 도움을 주게 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 정상군 초파리의 기대수명 증대효과를 나타낸 도면이다.
- [14] 도 2는 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 알츠하이머치매(AD)모델 초파리의 기대수명 증대효과를 나타낸 도면이다.
- [15] 도 3은 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 신경연접구조 개선효과를 나타낸 도면이다.
- [16] 도 4는 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 신경세포보호활성을 나타낸 도면이다.
- [17] 도 5는 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 마이토콘드리아 컴플렉스 1~4의 활성화도 상승효과를 나타낸 도면이다.
- [18] 도 6은 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 ATP 생성 능력증진효과를 나타낸 도면이다.
- [19] 도 7은 단기기억상실제 처리 마우스에 대하여 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 기억력 증진효과를 나타낸 도면이다.
- [20] 도 8은 Y-미로 시험(Y-maze test)에서의 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제의 처리에 따른 공간기억력 증진 효과 비교를 나타낸 도면이다.
- [21] 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M (N = 6)을 나타낸다.
- [22] (# : $p < 0.05$ Control vs Con+Sco
- [23] *: $p < 0.05$ Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or DO+Sco)
- [24] (SW : 익힌숙잠분말, CDG : 참당귀, COM: 익힌 숙잠 및 참당귀 복합제, RG : 기억력 개선 홍삼제품, DO: 도네페질(Donepezil), SCO : 스코폴라민(scopolamine))
- [25] 도 9는 Morris 수중미로시험 (moriss water maze test)에서의 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제의 처리에 따른 공간기억력 증진 효과 비교를 나타낸 도면이다.
- [26] 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M (N = 5)을 나타낸다.
- [27] (##: $p < 0.01$ Control vs Con+Sco
- [28] *: $p < 0.05$ Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or DO+Sco
- [29] **: $p < 0.01$ Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or DO+Sco
- [30] ***: $p < 0.001$ Con+Sco vs SW+Sco or CDG+Sco or COM+Sco or RG+Sco or DO+Sco)
- [31] (SW : 익힌숙잠 분말, CDG : 참당귀, COM: 익힌 숙잠 및 참당귀 복합제, RG : 기억력 개선 홍삼제품, DO: 도네페질(Donepezil), SCO :

스코폴라민(scopolamine))

[32] 도 10은 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 3xTG 치매 마우스의 자제조절능력 증진 효과를 나타낸 도면이다.

[33] 도 11은 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 3xTG 치매 마우스의 새로운 물건에 대한 인식능력 증진 효과를 나타낸 도면이다.

[34] 도 12는 본 발명의 조성물인 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 3xTG 치매 마우스의 사회성 증진 효과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하며, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[36]

[37] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 견사단백질과 뽕잎 유래 기능성물질을 포함하고 있는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 포함하는 기억력 개선용 조성물 또는 식품 조성물; 및 알츠하이머성 치매 예방 또는 치료용 조성물; 또는 알츠하이머성 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[38] 즉, 본 발명은 견사단백질과 뽕잎 유래 기능성물질을 포함하고 있는 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물의 기억력 개선 용도 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료 용도에 관한 것이 특징이다.

[39] 설명하면, 상기 견사단백질을 포함하고 있는 익힌 누에가공물은, 3면잠, 4면잠 등의 견사단백질을 갖는 모든 누에를 익힌 과정을 통해 제조한 것을 의미하며, 본 명세서 내에서 익힌 숙잠 또는 홍잠과 혼용된다.

[40] 즉, 견사단백질을 갖는 누에는 바람직하게는 4면잠 누에 중 5령3일 이후의 누에부터 또는 숙잠기까지의 누에 중 선택될 수 있다. 이때, 5령3일 이후의 누에로서 바람직하게는 5령4일의 누에부터 사용할 수 있으며, 더 바람직하게는 숙잠기의 누에를 사용하는 것이 가장 좋다. 이는, 5령3일의 누에도 사용할 수는 있으나 5령4일 이후의 누에에 비해서 누에가 갖는 견사단백질은 적으면서도 누에똥의 함량은 더 많기 때문이다. 한편, 숙잠기의 누에라 함은 누에 몸속에 견사단백질이 가득 차 있는 누에로서 고치를 짓기 전의 누에를 의미하는 것으로써, 숙잠기의 누에는 누에똥이 대부분 배출되었기 때문에 약학 조성물 또는 식품 조성물(건강기능식품)의 유효성분으로 사용하기에 가장 적합하다. 또한, 상기 익힌 누에가공물의 누에 품종으로는 어떠한 품종의 누에를 사용하여도 무관하나, 그 중에서도 백견품종, 황견품종(골든실크), 연녹견품종, 연홍견품종 중 어느 하나를 사용하는 것을 특징으로, 더욱 바람직하게 황견품종의 회복효과가 가장 우수하게 나타나는 바, 이를 적용하는 것이 가장 좋다.

[41] 본 발명에서는 상기와 같은 누에에 함유되어 있는 견사단백질까지 모두

식이섭취 가능하도록 하기 위해 상기 누에를 가공하여 가공물 형태로 제조하여 약학 조성물 또는 식품 조성물(건강기능식품 포함)의 유효성분으로 사용하게 되는데, 이때 상기 누에를 증기의 열로 익혀 사용하며, 바람직하게는 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익혀 건사단백질이 모두 함유되도록 제조하는 것이 특징이다. 즉, 80°C 미만의 증기 열로 150분을 초과하여 제조할 경우에는 제조시간이 너무 길어 오히려 건사단백질이 포함된 누에 자체가 갖고 있는 유효성분들이 파괴될 우려가 있으며, 125°C를 초과하여 100분 미만으로 제조할 경우에는 온도가 너무 높아 이 또한, 건사단백질이 포함된 누에 자체가 갖고 있는 유효성분들에 악영향을 미칠 우려가 있기 때문이다.

- [42] 이러한, 상기 익힌 과정 후에는 통상의 방법으로 건조하여 분말형태로 제조하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 열풍건조 또는 진공동결건조 중 선택된 어느 하나를 통해 건조시켜 분말화하는 것이 좋으며, 유효성분의 손실을 최소화하기 위해서는 진공동결건조 방법이 가장 적합하다.
- [43] 상기 분말화는 가정용 믹서기, 해머밀, 롤러밀, 동결분쇄기 등 어떠한 분쇄기를 사용해도 무관하지만, 시료유실의 최소화, 성분 왜곡현상 방지 및 미세분말화를 위해서는 롤러밀 또는 동결분쇄에 의한 방법이 좋다. 보통 가정용 믹서기나 해머밀로 분쇄하면 분말입자의 크기가 0.1mm 정도 이하로 분쇄하기가 매우 어려운데 비하여, 롤러밀로 수차례 반복 분쇄하면 분말화된 입자의 크기가 평균 10 μ m 정도까지 미세분말화가 가능하여 섭취와 제품에 유리하게 작용할 것으로 예상된다.
- [44] 또한, 상기 분말형태 제조 후에는 상기 익힌 누에가공물 분말을 추출물 형태로 제조할 수 있으며, 이때 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조될 수도 있다. 상기 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용액은 익힌 누에가공물 분말의 중량을 기준 1~40배 부피(1kg 기준 1~40ℓ)를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 5~40배 부피를 사용할 수 있다. 상기 추출물의 추출조건은 20~100°C에서 1~48시간일 수 있으며, 상기 과정은 1~4번까지 반복할 수 있다.
- [45] 또 다른 방법으로는, 상기 익힌 누에가공물 분말을 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출 농축하여 얻은 추출물에, 물을 가하여 현탁한 후, 바람직하게는 추출물의 중량의 1~1000배, 더 바람직하게는 1~500배, 가장 바람직하게는 1~50배의 물을 가하여 현탁한 후, 상기 현탁물에 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및, 부탄올로 이루어진 군에서 선택되는 용매를 가하여 얻은 분획물로 제조할 수 있다.
- [46] 상기 추출물 또는 이의 분획물의 제조온도는 20 내지 100°C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 추출 또는 분획 시간은 특별히 제한되는 것은 아니나, 10분 내지 2일 이내에 추출하는 것이 바람직하며, 추출용 기기로는 통상의

추출기기, 초음파분쇄추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다. 이렇게 제조된 추출물 또는 분획물은 열풍건조, 감압건조 또는 동결건조하여 용매를 제거할 수 있다. 또한, 상기 추출물 또는 분획물은 칼럼크로마토그래피를 이용하여 정제하여 사용할 수도 있다. 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[47] 또한, 본 발명의 유효성분 중 하나인 당귀(*Anegolica gigas Nakai*)는 산형과(Apiaceae) 당귀속(genus *Angelica* Linnaeus)에 속한 다년생 초본 식물로서, 빈혈회복효과, 면역증강작용이 보고된 바 있으며, 활혈작용과 관련해서는 혈관수축 억제효과 및 혈소판응집억제, 혈관신생촉진, 항산화 작용, 혈중 알코올농도 감소, 항산화능 및 항혈전 기능, 진통작용, 간기능 보호작용, 항암작용, 중추억제 작용, 혈관이완효과, 미백효과에 대한 연구가 보고 된바 있다. 이러한 상기 당귀로는 참당귀(*Angelica gig as Nakai*), 왜당귀(*Angelica acutiloba Kitagawa*) 또는 중국당귀(*Angelica sinensis Diels*)가 사용될 수 있으나, 바람직하게는 참당귀를 사용하는 것이 가장 좋다.

[48] 이러한 당귀는 본 발명이 목적하는 효능을 얻기 위해 추출물 형태로 제조하여 사용하는 것을 특징으로, 이러한 상기 추출물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분리될 수 있다.

[49] 본 발명에 이용되는 당귀 추출물을, 당귀에 추출용매를 처리하여 얻는 경우에는, 다양한 추출용매가 이용될 수 있다. 바람직하게는, 극성 용매 또는 비극성 용매를 이용할 수 있다. 극성 용매로서 적합한 것은, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethyl-formamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함한다. 비극성 용매로서 적합한 것은, 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함한다.

[50] 보다 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 추출용매는 (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), (c) 상기 저급

알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 부틸아세테이트, (h) 1,3-부틸렌글리콜, (i) 헥산 및 (j) 디에틸에테르를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 추출물은 물, 메탄올, 에탄올 또는 이의 조합을 당귀에 처리하여 수득한 것이다.

- [51] 본 명세서에서 사용되는 용어 ‘추출물’은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 추출물을 추가적으로 분획(fractionation)한 분획물도 포함한다. 즉, 당귀 추출물은 상술한 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 당귀 추출물에 포함되는 것이다.
- [52] 본 발명에서 이용되는 당귀 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [53] 본 발명의 일 실시예에서는, 당귀의 근경에 메탄올, 에탄올과 같은 저급 알코올, 바람직하게는 95% 에탄올을 가하고 5 내지 80°C, 바람직하게는 30 내지 55°C에서 15분 내지 48 시간, 바람직하게는 30분 내지 12시간 동안 추출하여 감압 건조시킨 후 얻을 수 있다.
- [54] 본 발명에서는 이렇게 제조한 상기 익힌 누에가공물과 상기 당귀 추출물을 함께 혼합된 조성물을 제공함에 따라, 상기 각각의 단독 물질 적용대비 혼합 사용시 정상 대조군 동물 모델과 알츠하이머 치매 모델의 기대수명과 건강수명을 모두 증대시키고, 기억력 상실을 예방하고, 신경연접 구조를 개선시키며, 신경세포를 보호하고, 미토콘드리아의 활성을 증진시켜서 ATP의 생성을 증가시키고, 공간기억력 증진, 자세조절능력 증진, 새로운 물건에 대한 호기심 증진, 사회성 증진 효과가 뛰어나므로, 알츠하이머 치매가 예방되고 기억력을 개선하는데 보다 현저한 효능을 나타냄을 확인한 바, 본 발명에서는 기억력 개선용 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용으로써 약학 조성물 또는 식품 조성물(건강기능식품)의 유효성분으로 상기 2 가지 물질을 함께 사용하는 것이 특징이며, 보다 바람직하게는 상기 익힌 누에가공물과 상기 당귀 추출물을 1:0.1~1 중량비로 혼합되는 것을 특징으로, 이는 상기 당귀 추출물이 상기 익힌 누에가공물 중량을 기준으로 0.1 중량비 미만으로 혼합될 경우 본 발명이 목적하는 현저한 효과는 이루기 어렵게 되며, 1 중량비를 초과할 경우에는 초과 함량에 따른 상승된 효능은 얻지 못한다.
- [55] 본 명세서에서, “익힌 누에가공물과 당귀 추출물을 함께 혼합한 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “익힌 숙잠 분말 + 참당귀 추출물 혼합물” 및 “복합제”는 본 발명의 유효성분을 의미하며, 혼용된다.
- [56] 또한, 상기 본 발명의 약학 조성물에는 상기 익힌 누에가공물 및 상기 당귀

추출물이 혼합된 혼합물이 본 발명의 약학 조성물에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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 본 발명의 혼합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[57] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 100mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1000mg/kg/일 내지 3000mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[58] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 혼합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[59] 이때, 상기 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물로 이루어진 혼합물은 본 발명이 목적하는 효능을 나타내기 위한 유효한 함량으로, 분말 중량면에서 조성물 총 중량에 대하여 1~100 중량%로 함유하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는

10~90 중량%로 함유하는 것이 좋다.

[60] 또한, 본 발명은 상기 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물로 이루어진 혼합물을 포함하여 기억력 개선 또는, 알츠하이머성 치매 예방 및 개선효과를 위한 식품 조성물로도 제공할 수 있다. 이때, 상기 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물로 이루어진 혼합물은 본 발명의 식품 조성물에 1~100 중량%로 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하는 것으로서, 각종 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제 등이 있다.

[61]

[62] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 기억력 개선 방법을 제공한다.

[63] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[64] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 혼합하는 단계를 포함하는, 기억력 개선용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[65] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 혼합하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[66]

[67] 본 발명의 방법들은 상술한 조성물을 이용하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[68]

[69] 이와 같이 본 발명은 학업스트레스에 시달리는 각급학교의 학생을 비롯한 청년층과 노인층을 망라한 모든 국민들의 뇌 기능을 개선함으로써 기억력 개선에 큰 도움을 줄 것으로 기대되며, 아울러 알츠하이머 치매를 포함한 신경계질환의 발병을 효과적으로 감소시킴으로써 고령화시대를 살고 있는 국민들의 삶의 질 개선에도 큰 도움을 주고, 나아가서는 국가 치매관리비용 절감에도 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

[70]

[71] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이나, 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[72]

[73] <실시예 1. 익힌 누에가공물들과 당귀 추출물로 구성된 혼합물 제조>

- [74] 1) 익힌 누에가공물(익힌 숙잠; 홍잠) 제조
- [75] 황색 견사단백질을 갖는 골든실크(일본종계 원종 잠311과 중국종계 원종 잠312를 교배하여 생산한 교배종)를 사육하여 5령7일 전후, 즉 숙잠이 되면 100°C 수증기로 120~130분 동안 익혀 황견품종 익힌 누에가공물(steamed mature silkworm product; 또는 boiled mature silkworm product)을 제조한 후, 상기 황견품종 익힌 누에가공물을 24시간동안 진공동결건조하여 분말형태로 제조하였다.
- [76] 2) 당귀 에탄올 추출물 제조
- [77] 국산 참당귀를 사용하여 원재료 계량 후 원물대비 10배수의 70%(v/v) 주정을 85°C에서 1회 각 4시간 총 2회 연속 추출 후 추출물을 여과 및 농축 공정을 진행하고 덱스트린 40%(w/w, 전체중량기준)를 배합하여 분무건조를 통해 분말형태로 제조하였다.
- [78] 3) 혼합물 제조
- [79] 상기 1)의 익힌 누에가공물 분말 0.2g/kg과 상기 2)의 당귀 에탄올 추출물 0.16g/kg을 혼합하여 혼합물을 제조하여 하기 실험들의 시료로 적용하였다.
- [80]
- [81] <실험예 1. 익히기 전 숙잠 및 익힌 누에가공물 또는 품종별 익힌 누에가공물의 성분 분석 비교>
- [82] 1) 익히기 전 숙잠 및 익힌 누에가공물 성분 분석 비교
- [83] 익히기 전 숙잠 및 익힌 누에가공물을 각각 0.1mm 입자크기를 갖는 해머밀 분쇄물을 통해 주요성분 분석을 실시하여 하기 표 1 및 표 2와 같이 나타내었다.
- [84]

[표1]

구분		익힌 누에가공물 (백건)	익히기전 숙잠 (백건)
조성분 (g/100g)	수분	2.85	4.15
	조단백질	68.86	62.43
	조지방	10.99	11.66
	조회분	3.26	3.63
아미노산 (%)	시스테인 (CYS)	0.427	0.463
	메치오닌 (MET)	0.644	0.756
	세린 (SER)	6.757	6.194
	글루탐산 (GLU)	3.824	4.071
	글리신 (GLY)	12.335	9.265
	알라닌 (ALA)	9.778	7.460
	루신 (Leu)	1.983	2.114
	라이신 (Lys)	2.193	2.396
	히스티딘 (His)	1.083	1.160
	아르기닌 (Arg)	1.958	2.123
	프롤린 (Pro)	1.148	1.217
	트립토판 (Trp)	0.425	0.437

[85]

[86] [표2]

구분		익힌 누에가공물 (백건)	익히기전 숙잠 (백건)
지방산 (%)	Oleic acid (C18:1Ω9)	31.22	31.13
	Eicosenoic acid (C20:1Ω9)	0.23	0.28
	불포화지방산	66.79	67.49
	-단가 지방산	32.31	32.23
무기성분 (mg/100g)	Ca(칼슘)	198.90	197.83
	Fe(철)	3.17	8.49
	K(칼륨)	1045.44	1176.37
	Mg(마그네슘)	199.25	211.94
	Mn(망간)	1.60	1.70
	P(인)	688.27	749.79

[87]

[88]

[89] 상기 결과를 통해, 익히기 전의 숙잠 내에 있던 각종 구성성분의 함량이 익힌 누에가공물이 되면서 다양하게 변화된 것으로 확인되며, 이러한 익힌

누에가공물의 성분 변화로 인해 상기 익힌 누에가공물이 갖는 약리학적 효과에도 변화가 있을 것임을 확인할 수 있다.

[90]

[91] 2) 누에 품종별 롤러밀 분쇄법을 통한 성분분석 비교

[92] 원료 유실이 적으면서도 성분변화가 적은 분쇄방법인 롤러밀 분쇄법을 통해 누에 품종별 익힌 누에가공물의 성분분석을 비교해 보았다.

[93] 그 결과, 하기 표 3 내지 표 8과 같이 나타났다.

[94]

[95] [표3]

익힌 누에가공물의 누에품종별 일반성분 함량(단위 : g/100g)				
구분	백옥잠	골든실크	연녹잠	홍견품종
수분	4.29±0.03c	2.31±0.05b	2.34±0.02b	1.71±0.08a
조단백질	71.92±0.34bc	69.36±0.23a	73.13±0.5c	70.89±0.055b
조지방	13.57±0.11a	15.59±1.005a	14.05±0.065a	15.21±0.925a
조회분	3.48±0.235a	3.43±0.06a	3.50±0.13a	3.97±0.16b
조섬유	2.96±0.05ab	3.10±0.03ab	2.78±0.03a	3.50±0.01b

Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test
a.b.c Different letters indicate significant differences at p < 0.05

[96]

[97] [표4]

익힌 누에가공물의 누에품종별 아미노산 함량(단위 : g/100g)				
구분	백옥잠	골든실크	연녹잠	홍견품종
시스테인(CYS)	0.424±0.002 ^a	0.442±0 ^b	0.433±0.001 ^{ab}	0.437±0.005 ^b
메치오닌(MET)	0.690±0.005a	0.778±0.006c	0.725±0.004b	0.730±0.006b
아스파르트산(ASP)	5.129±0.035b	5.092±0.046b	5.299±0.059c	4.871±0.02a
트레오닌(THR)	2.489±0.015b	2.492±0.019b	2.503±0.03b	2.407±0.005a
세린(SER)	7.707±0.029b	6.946±0.106a	7.548±0.059b	7.024±0.046a
글루탐산(GLU)	4.759±0.05ab	4.858±0.043b	4.869±0.067b	4.641±0.009a
글리신(GLY)	12.810±0.017b	11.353±0.238a	12.438±0.044b	11.842±0.091a
알라닌(ALA)	10.220±0.021b	9.342±0.181a	10.177±0.025b	9.687±0.068a
발린(VAL)	2.248±0.017a	2.345±0.018b	2.275±0.006a	2.233±0.002a
이소루신(Ile)	1.064±0.007a	1.145±0.006b	1.082±0.013a	1.080±0.006a
루신(Leu)	1.814±0.02a	1.992±0.018c	1.888±0.016b	1.816±0.007a
타이로신(Tyr)	4.830±0.013b	4.563±0.074a	4.781±0.015b	4.443±0.067a
페닐알라닌(Phe)	1.942±0.029a	2.061±0.017b	1.977±0.024ab	1.937±0.016a
라이신(Lys)	2.544±0.01a	2.669±0.037b	2.621±0.016ab	2.536±0.013a
히스타딘(His)	1.151±0.005a	1.182±0.012a	1.138±0.012a	1.235±0.012b
아르기닌(Arg)	2.118±0.006a	2.171±0.035a	2.134±0.006a	2.108±0.005a
프롤린(Pro)	1.606±0.014a	1.884±0.043b	1.788±0.008b	1.805±0.018b
트립토판(Trp)	0.506±0.008a	0.532±0.005ab	0.542±0.007b	0.517±0.001ab

Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test
a.b.c Different letters indicate significant differences at p < 0.05

[98]

[99]

[표5]

익힌 누에가공물의 누에품종별 지방산 함량(단위 : %)				
구분	백옥잠	골든실크	연녹잠	홍견품종
Myristic acid(C14:0)	0.15±0.01a	0.14±0.01a	0.15±0.00a	0.20±0.01b
Palmitic acid(C16:0)	21.87±0.77a	24.24±0.53a	22.03±1.24a	24.94±1.24a
Palmitoleic acid(C16:1n7)	0.74±0.09a	0.83±0.01a	0.73±0.01a	0.73±0.01a
Stearic acid(C18:0)	7.38±0.22a	8.05±0.05ab	7.73±0.36a	8.60±0.36b
Oleic acid(C18:1n9)	25.95±1.82a	25.60±0.38a	25.39±2.37a	26.19±2.37a
Linoleic acid(C18:2n6)	8.16±0.16bc	7.65±0.52b	9.03±0.30c	5.66±0.30a
γ-Linoleic acid(C18:3n6)	0.11±0.0ab	0.16±0.02bc	0.08±0.01a	0.17±0.01c
Linolenic acid(C18:3n3)	35.55±0.91a	33.29±1.85a	34.77±0.21a	33.45±0.21a
Eicosenoic acid(C20:1n9)	0.11±0.01b	0.06±0.01a	0.10±0.00b	0.06±0.00a
불포화지방산	70.62	67.59	70.10	66.26
포화지방산	29.38	32.41	29.90	33.74

Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test
a.b.c Different letters indicate significant differences at p < 0.05

[100]

[101] [표6]

익힌 누에가공물의 누에품종별 무기성분 함량				
구분	백옥잠	골든실크	연녹잠	홍견품종
Ca(mg/100g)	190.01±6.85b	168.75±1.90a	180.69±1.13ab	203.73±7.76c
Cu(mg/100g)	0.59±0.03b	0.49±0.01a	0.48±0.01a	0.50±0.02a
Fe(mg/100g)	2.64±0.09b	1.94±0.03a	1.97±0.04a	3.91±0.48c
K(mg/100g)	608.90±17.48a	586.00±51.24a	650.12±14.75a	647.93±13.19a
Mg(mg/100g)	183.34±4.02ab	189.22±2.84b	172.69±2.09a	176.90±3.53a
Mn(mg/100g)	1.36±0.01a	1.35±0.01a	1.22±0.01b	1.35±0.03a
Na(mg/100g)	34.83±2.11a	39.54±1.69a	35.75±1.49a	39.50±1.65a
P(mg/100g)	388.73±5.86a	405.47±6.89a	388.68±3.28a	386.61±8.47a
Zn(mg/100g)	6.36±0.18c	5.05±0.09a	5.64±0.06b	5.32±0.16ab
S(mg/kg)	4171.63±18.55a	4652.50±21.79b	4318.63±18.54c	4557.00±69.90d

Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test
a.b.c Different letters indicate significant differences at p < 0.05

[102]

[103] [표7]

익힌 누에가공물의 누에품종별 비타민 함량				
구분	백옥잠	골든실크	연녹잠	홍견품종
베타카로틴(ug/100g)	1107.24±69.48a	4026.07±100.52b	1188.98±19.95a	7304.22±157.50c
Vitamin B1(mg/100 g)	0.57±0.01ab	0.59±0.01b	0.54±0.00a	0.63±0.02c
Vitamin B2(mg/100 g)	5.95±0.15b	4.63±0.09a	5.36±0.05a	6.04±0.1c
Vitamin B3(mg/100 g)	4.15±0.05a	4.94±0.12b	4.06±0.05a	4.73±0.16b
Vitamin B6(mg/100 g)	0.55±0.01a	0.52±0.01a	0.51±0.01a	0.67±0.01b
Folic acid(mg/100 g)	0.46±0.01a	0.72±0.01d	0.52±0.01b	0.59±0.01c
Vitamin C(mg/100 g)	10.19±0.11b	11.63±0.14c	9.26±0.11a	12.33±0.05d

Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test
a.b.c Different letters indicate significant differences at p < 0.05

[104]

[105]

[표8]

익힌 누에가공물의 누에품종별 기능성분 함량				
구분	백옥잠	골든실크	연녹잠	홍건품종
총폴리페놀 (mg/100 g)	773.43±11.91ab	744.45±15.06a	881.01±18.09c	822.10±26.83b
총플라보노이드 (mg/100 g)	452.60±13.79ab	423.59±3.63a	552.64±21.69c	494.46±16.07b
GABA (mg/100 g)	2.28±0.06b	1.96±0.008a	2.51±0.10c	4.59±0.06b

Sample were analyzed by one-way ANOVA followed by DUNKAN test
a.b.c Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$

[106]

[107] 상기 실험결과, 누에 품종별로 익힌 누에분말에 함유된 성분에서 차이가 있으며, 이를 토대로 하기와 같은 효과에서도 품종별로 달리 나타낼 것으로 예측된다. 다시 말해, 익힌 누에가공물에 대하여 누에품종별로 성분을 분석한 결과, 익힌 누에가공물에는 조단백질과 글리신, 알라닌, 세린 등의 아미노산과 리놀렌산을 비롯한 불포화지방산 및 베타카로틴 등의 비타민 등이 다량 함유돼 있고, 인체에 유해한 트랜스지방, 수은 등의 중금속 및 Sucrose 등의 당류는 검출되지 않았다. 그리고, 5령3일 건조누에 및 익히지 않은 숙잠에 비하여 익힌 숙잠이 조단백질과 글리신, 알라닌, 세린 등의 아미노산 함량이 매우 많은 것으로 나타났다. 누에품종별로는 백옥잠, 골든실크, 연녹잠 및 홍건품종 등 모든 품종에서 동일한 모든 성분이 검출되었으며, 각 성분별 함량비교에서는 각 품종별로 상이하게 함유되어 있어 각 누에품종별 기능성에서는 차별성이 있을 것으로 예상되었다.

[108]

[109] <실험예 2. 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 정상군 초파리의 기대수명 증대효과 확인>

[110] 1. 실험방법

[111] 알츠하이머 치매에 걸리게 되면 기대수명이 크게 감소하는 것으로 보고되고 있는바, 치매에 걸리지 않은 정상 대조군과 알츠하이머 치매에 걸린 시험군에 대하여 초파리 모델을 이용하여 익힌 숙잠 분말, 참당귀 추출물 및 실시예 1의 익힌 숙잠 분말 + 참당귀 추출물 혼합물(이하, 복합제라 한다)에 대한 시험을 실시하였다.

[112] 먼저, 알츠하이머 치매에 걸리지 않은 정상군(대조군)에 대하여 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물의 복합제(실시예 1)가 가지는 기대수명 증가에 대한 상승작용을 확인하기 위한 연구를 진행하였다.

[113]

[114] 2. 실험결과

[115] 상기 실험결과 도 1 및 하기 표 9와 같이 나타났다.

[116]

[표9]

처리군	평균수명 (날)	비율
일반사료	29.29	--
참당귀추출물	31.18	6.8% 증가
익힌 숙잠 분말	31.02	5.9% 증가
익힌 숙잠/참당귀복합제 (실시예1)	32.32	10.3% 증가

[117]

[118] 상기 표 9 및 도 1에 나타낸 바와 같이, 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)는 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물만을 개별적으로 처리한 실험군의 기대수명 증가율에 비하여 1.5~1.7배(3.5 ~ 4.4 %p)로 현저히 증가됨을 확인하였다.

[119] 구체적으로 설명하면, 일반사료만을 섭취한 정상 초파리의 경우는 기대수명이 29.29일이었는데, 참당귀 추출물을 섭취한 시험군의 경우에는 기대수명이 31.18일로 6.8% 증가되었고, 위험지수는 0.66 (95% 신뢰구간 (CI): 0.5 ~ 0.87, p value = 0.003)으로 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 익힌 숙잠 분말을 섭취한 시험군의 경우에는 기대수명이 31.02일로 일반사료에 비하여 5.9% 증가하였고, 위험지수는 0.7 (95% CI: 0.53~0.92, p value = 0.01)로 일반사료에 비하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)를 포함한 사료를 섭취한 동물의 경우는 기대수명이 32.32일로 10.3% 증가하였고, 위험지수는 0.5 (95% CI = 0.38~0.67, p value = 3.21×10^{-6})로 감소함을 확인하였다. 본 결과는 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물을 단독으로 처리하는 것 보다, 복합제(실시예 1)로 처리하는 경우에 상호 상승작용으로 각각의 단독물질만을 처리한 시험구의 기대수명 증가율에 비하여 1.5~1.7배(3.5 ~ 4.4%p)가 더 늘어난 현저한 기대수명의 증가와 더욱 감소된 위험지수를 가짐을 나타내고 있다.

[120]

[121] <실험예 3. 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 알츠하이머치매(AD) 모델 초파리의 기대수명 증대효과 확인>

[122] 1. 실험방법

[123] 알츠하이머치매는 기억력과 사고력 등의 지적능력 상실에 따른 행동변화를 가져오는 질환으로 전체 치매사례의 60% 이상을 차지한다고 알려져 있다. 알츠하이머치매는 직,간접적으로 기대수명을 감소시킨다고 보고되고 있어서, 인간의 알츠하이머치매 원인 유전자 3개를 발현하는 알츠하이머치매모델 초파리를 이용한 연구를 진행하였다.

[124] 설명하면, 인간의 알츠하이머질환을 발병하는 원인 유전자인 Amyloid precursor protein (APP)과 Beta site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1)과 Microtubule associated protein tau (MAPT)를 동시에 발현시키는 초파리 모델에게 정상사료 또는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물의 복합제(실시예 1) 10% 사료를

이용하여 배양하였다. 배양된 100마리 이상의 성충 초파리하나의 바이알에 10마리씩 나누어 넣은 후에 3일 간격으로 모든 초파리가 소멸할 때 까지 살아있는 초파리의 수를 확인하였다. 초파리는 28°C, 상대습도 60%의 조건에서 사육하였다. 통계분석은 카플란-메이어 생존분석을 수행하여 통계학적인 차이를 구명하였다.

- [125] 이에, 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease; AD)에 걸린 시험군에 대한 기대수명 증가효과를 시험하였다. 이때, 상기 실험예 2와 동일한 실험방법으로 초파리의 기대수명 증대효과를 확인하되, 정상군 초파리 대신 알츠하이머 치매 모델 초파리를 대상으로 기대 수명 증대효과를 확인하였다.

[126]

[127] 2. 실험결과

[128] 상기 실험결과 도 2 및 하기 표 10과 같이 나타났다.

[129] [표10]

처리군	평균수명 (날)	비율
일반사료	25.22	--
참당귀추출물	26.01	3.1% 증가
익힌 숙잠 분말	26.58	5.4% 증가
익힌 숙잠/참당귀복합제 (실시예 1)	28.49	13.0% 증가

[130]

- [131] 상기 표 10 및 도 2에 나타난 바와 같이, 알츠하이머치매모델 초파리의 경우 정상 대조군(29.29일)에 비하여 기대수명이 25.22일로 13.9% 감소하였는바, 감소된 알츠하이머치매모델 초파리의 기대수명은 참당귀 추출물 단독, 익힌 숙잠 분말 단독, 또는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1) 처리에 의하여 증가함을 확인하였으며, 특히 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)는 단독물질 투여 시험구의 기대수명 증가율에 비하여 2.4~4.2배가 증가하였는바, 이는 정상군의 기대수명에 육박하는 놀라운 상승효과이다.

- [132] 구체적으로 설명하면, 일반사료만 섭취시킨 알츠하이머치매모델 초파리의 기대수명은 25.22일인데 비하여, 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 알츠하이머치매모델 초파리의 기대수명은 26.01일로 3.1% 증가하였고, 위험지수도 0.6 (95% CI = 0.46 ~ 0.8, p value = 0.0004)으로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 알츠하이머치매모델 초파리의 기대수명은 26.58일로 5.4% 증가하였고, 위험지수도 0.57 (95% CI = 0.57 ~ 1.0, p value = 0.05)로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 복합제를 첨가한 사료를 섭취시킨 알츠하이머치매모델 초파리의 경우는 기대수명이 28.49일로 일반사료만 먹인 알츠하이머치매모델 초파리에 비하여 13.0% 증가하였고, 위험지수도 0.48 (95% CI = 0.36 ~ 0.64, p value = 7.6×10^{-7})로 통계적으로

유의하게 감소하는 상승효과가 나타났다.

- [133] 결과를 요약하면 익힌 숙잠/참당귀 복합제를 첨가한 사료를 섭취시킨 알츠하이머치매모델 초파리의 경우 참당귀 추출물(3.1% 증가)이나 익힌 숙잠 분말(5.4% 증가)이 첨가된 사료만을 단독으로 섭취시킨 알츠하이머치매모델 초파리의 기대수명 증가율보다 기대수명이 2.4~4.2배(7.6 ~ 9.9%p) 상승하는 놀라운 효과를 보였는바, 이 결과는 알츠하이머치매모델 초파리에 익힌 숙잠/참당귀 복합제(실시예 1)를 투여할 경우 정상군에 육박하는 기대수명을 나타낸 결과로서, 익힌 숙잠 분말 과 참당귀 추출물간의 상호 상승작용으로 각각의 물질을 개별적으로 첨가한 사료에 비하여 현저히 증가된 기대수명과 감소된 위험지수를 유도함을 보여주고 있다.

[134]

- [135] <실험예 4. 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 신경연접의 구조변화 확인>

- [136] 1. 실험방법

- [137] 알츠하이머치매는 인간 뇌의 신경연접 구조이상에 의하여 시작된다고 알려져 있는바, 정상 대조군 초파리와 알츠하이머치매모델 초파리의 신경연접구조 변화에 대한 연구를 진행하였다.

- [138] 먼저, 알츠하이머치매에 걸리지 않은 정상 대조군 초파리 모델의 신경연접구조 변화에 대하여 시험하였다. 이때, 실시예 1의 혼합물을 정상 사료의 구성성분 중 주 단백질원인 효모 총 양의 10%에 달하는 양을 정상사료에 첨가하여 정상 대조군 초파리를 배양하였다. 성충이 되기 전 단계인 유충단계에서 3령 노숙 유충을 Ca^{2+} 이 없는 해부용액에서 해부를 한 후, 4% 파라포말알데하이드를 포함하는 산도 7.2의 0.1M 인산완충용액을 이용하여 고정하였다. 고정된 시료는 0.1% 트리톤 엑스-100을 포함한 0.01M 인산완충식염수를 이용하여 3회 10분 간격으로 세척을 진행 한 후, anti-HRP-FITC를 이용하여 신경연접을 염색을 한 후, 형관현미경아래서 신경연접의 수를 확인하였다.

- [139] 또한, 상기 실험방법을 적용하여 알츠하이머 치매에 걸린 초파리 모델의 신경연접 구조 변화에 대하여도 시험하였다.

- [140] 2. 실험결과

- [141] 상기 실험결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 일반사료만을 섭취한 정상 대조군 초파리의 신경연접 구조를 100%로 하여 환산한 결과, 일반사료에 참당귀 추출물을 첨가한 사료만을 섭취한 시험군의 경우는 7.2%가 증가된 신경연접의 수를 가지고 있었으며, 일반사료에 익힌 숙잠 분말을 첨가한 사료만을 섭취한 시험군의 경우에는 9.3%가 증가된 신경연접의 수를 가지고 있었다. 이에 비하여 일반사료에 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물을 첨가한 복합제(실시예 1) 사료를 섭취시킨 초파리의 경우는 11.7% 증가된 신경연접의 수를 가지고 있었는바, 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)는 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말만을 섭취시킨 시험구의 신경연접 증가율에 비하여 1.3~1.6배(2.4~4.5%p)의

증가율을 보이는 현저한 상승효과를 나타냄을 확인하였다.

[142] 다음으로 알츠하이머치매에 걸린 초파리 모델의 신경연접 구조 변화에 대하여 시험한 결과, 일반사료만을 섭취시킨 AD모델 초파리는 상기 정상 대조군에 비하여 47.9%가 적은 수의 신경연접을 가지고 있음을 확인하였다.

[143] 이에 AD모델 초파리에 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 결과 일반사료만을 섭취시킨 초파리에 비하여 신경연접의 수가 12.7%증가됨을 알 수 있었고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 결과에서는 16.5%가 증가된 신경연접을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이에 비하여 AD모델 초파리에 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1) 사료를 섭취시킨 시험구에는 일반사료만을 섭취시킨 시험구에 비하여 22.1%가 증가된 신경연접 숫자를 가지고 있었는바, 이는 참당귀 추출물과 익힌 숙잠 분말을 단독으로 섭취시킨 시험구의 신경연접 증가율에 비하여 1.3~1.7배(5.6~9.4%p) 높은 현저히 상승적인 신경연접의 증가율을 보여준 것이다.

[144] 이러한 결과는 정상 대조군이나 알츠하이머치매모델 모두에서 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말을 단독으로 처리하였을 경우에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)를 처리한 경우 상호작용에 의한 상승효과가 있음을 보여주는 것이다.

[145]

[146] **<실험예 5. 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 신경세포보호 활성 확인>**

[147] 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 신경세포 보호효과를 규명하기 위하여, L-글루타메이트(L-glutamate)로 유도한 HT22 세포손상모델에서 익힌숙잠 단독(SW), 참당귀추출물 단독(AG) 및 익힌숙잠/참당귀 추출물 복합제(SWA-1)의 신경세포보호활성을 확인하였다.

[148] 세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay로 측정하였다. 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

[149] HT22 세포를 96 웰 플레이트에서 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 항온배양한 후, 각 농도별로 SW, AG 그리고 SWA-1 를 처리 후, 24 시간 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액 (5mg/ml)을 첨가하여 4 시간 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다.

[150]

[151] 2. 실험결과

[152] 상기 실험 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 대조군과 대비했을 때, 익힌 숙잠을 단독(SW)으로 50, 100ug/mL 처리시 세포 생존율은 각각 5.33%, 17.49% 증가하였고, 참당귀 추출물을 단독(AG)으로 50, 100ug/mL 처리시 세포 생존율은 각각 12.55%, 17.23% 증가하였으며, 익힌숙잠/참당귀 추출물 복합제(SWA-1)를

- 50, 100ug/mL 처리시 세포 생존율이 각각 25.99%, 35.84% 증가함을 확인하였다.
- [153] 이러한 결과는 신경세포 손상 모델에서 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말을 단독으로 처리하였을 경우에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)를 처리한 경우 상호작용에 의한 상승효과가 있음을 보여주는 것이다.
- [154]
- [155] <실험예 6. 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 미토콘드리아 컴플렉스 1~4의 활성도 상승효과 확인>
- [156] 1. 실험방법
- [157] 정상적으로 노화가 진행되더라도 미토콘드리아의 활성이 떨어져서 ATP생성 능력이 낮아진다고 알려져 있다. 더욱 중요하게는 알츠하이머치매 환자들에게서 공통으로 관찰되는 분자세포 수준의 병인은 미토콘드리아 기능이상이 정상인들보다 조기에 나타난다는 것이다.
- [158] 그러므로, 정상 대조군 초파리와 알츠하이머치매 모델 초파리를 각각 일반사료만 섭취시키면서 사육한 경우, 일반사료에 참당귀 추출물을 첨가한 사료를 섭취시키면서 사육한 경우, 일반사료에 익힌 숙잠 분말을 첨가한 사료를 섭취시키면서 사육한 경우, 그리고 일반사료에 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제를 첨가한 사료를 섭취시키면서 사육한 경우에 변화되는 미토콘드리아 컴플렉스 1~4까지의 활성을 비교하였다.
- [159] 구체적으로 설명하면, 실시예 1의 혼합물을 섭취시키면서 정상 초파리와 알츠하이머성 치매 초파리를 이용하여 미토콘드리아 컴플렉스 I에서 IV까지의 기능을 확인하였다. 미토콘드리아의 주요 기능은 세포의 주요 에너지 물질인 ATP를 생산하는 것으로, 미토콘드리아의 내막에 존재하는 5개의 respiratory complex들에 의하여 생성이 된다. Complex I에서 IV까지는 산화적 인산화 과정(Oxidative phosphorylation)에 의하여 미토콘드리아 내막에 전위차를 생성하고 Complex V는 실제로 ATP를 생성한다. 그러므로 미토콘드리아 complex 1에서 4까지의 활성을 비교하는 연구를 진행하였다.
- [160] 미토콘드리아 complex I의 활성검정을 위해서는 초파리 성충의 뇌에서 추출한 미토콘드리아 10 ml를 182 ml의 활성 검정용 완충용액(25mM PB, 0.35% BSA, 0.06mM DCIP, 0.07mM decylubiquinone, 1mM AA)과 섞어 준 후, 5mM NADH 8 ml와 섞은 후에 37°C에서 30분간 반응을 시킨 후, 600nm에서 4분간 30초 간격으로 흡광도 변화를 측정하여 활성을 5개의 반복시료에서 측정하였다. 미토콘드리아 complex II의 활성검정을 위해서는 184ml의 활성 검정용 완충용액(80mM PB pH 7.8, 0.1% BSA, 2mM EDTA, 0.2mM ATP, 80mM DCIP, 50 mM decylubiquinone, 1 mM AA, 3 mM rotenone)에 1 ml malonate와 미토콘드리아 추출액 10 ml를 추가한 후, 37°C에서 30분간 반응을 시킨 후, 600nm에서 4분간 30초 간격으로 흡광도 변화를 측정하여 활성을 5개의 반복시료에서 측정하였다. 미토콘드리아 complex III의 활성검정을 위해서는

80ml의 활성 검정용 완충용액(50mM Tris-HCl pH 7.5, 4mM NaN₃, 0.1mM decylubiquinone, 80 mM Succinate, 2mM KCN, 3 mM rotenone, 40 mM Cytochrome C)에 미토콘드리아 추출액 10 ml과 효소반응액 10 ml를 추가한 후, 25 °C에서 550nm로 30초 간격으로 3분간 측정하였다. 미토콘드리아 complex IV의 활성검정을 위해서는 188ml의 활성 검정용 완충용액(10mM Tris-HCl pH 7.0, 120mM KCl)에 10 ml Ferrocycytochrome C substrate (0.22mM Ferrocycytochrome과 0.5 mM DTT)와 효소반응액 2 ml 와 미토콘드리아 추출액 2 ml를 추가한 후, 25°C에서 550nm로 10초 간격으로 1분간 측정하였다. 5개의 반복시료에서 측정하였다. 군집간의 차이를 ANOVA로 확인 후, Tukey-Kramer post hoc분석을 실시하였다.

[161]

[162] 2. 실험결과

[163] 상기 실험결과 도 5에 나타낸 바와 같이, 일반사료에 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말만을 단독으로 섭취시키거나 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)를 섭취시킨 결과, 정상 대조군 초파리와 알츠하이머치매 모델 초파리 모두에서 미토콘드리아 콤플렉스 1~4의 활성이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 특히 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)를 섭취시킨 초파리 모델의 활성이 두드러지게 증가하는 것을 확인하였다.

[164] 1) 먼저 알츠하이머 치매에 걸리지 않은 정상 대조군에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 활성에 대하여 자세히 설명하면 아래와 같다.

[165] 정상 대조군에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 1 활성의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 초파리는 20.5%가 증가되었고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 경우는 33.7% 증가되었다. 이에 비해, 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 초파리의 경우는 45.5% 증가되었는데, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험군의 미토콘드리아 콤플렉스 1 활성 증가율에 비하여 1.4~2.2배(11.8~25.0%p)로 더 크게 증가하는 현저한 높은 활성으로, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 미토콘드리아 콤플렉스 1의 활성에 상호 보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[166] 또한, 정상 대조군에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 2 활성의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 초파리는 45.9%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군 경우는 23.1%가 증가되었다. 이에 비해 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 100.9% 증가되었는데, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험군의 미토콘드리아 콤플렉스 2

활성 증가율에 비하여 2.2~4.4배(77.8~55.0%p)가 더 높은 놀라운 활성 증가율로, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 마이토콘드리아 컴플렉스 2 활성화에 상호 보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[167] 또한, 정상 대조군에 대한 마이토콘드리아 컴플렉스 3 활성화의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 초파리는 29.0%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우는 57.7%가 증가되었다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 111.2% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 마이토콘드리아 컴플렉스 3 활성화 증가율에 비하여 1.9~3.8배(53.5~82.2%p)가 더 높은 현저한 활성 증가율로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 마이토콘드리아 컴플렉스 3 활성화에 상호보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[168] 또한, 정상 대조군에 대한 마이토콘드리아 컴플렉스 4 활성화의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 초파리는 24.1%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우는 43.7%가 증가되었다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 81.3% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 마이토콘드리아 컴플렉스 4의 활성화 증가율에 비하여 1.9~3.4배(37.6~57.2%p)가 더 높은 현저한 활성 증가율로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 마이토콘드리아 컴플렉스 4 활성화에 상호보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[169] 또한, 정상 대조군 초파리에서의 마이토콘드리아 컴플렉스 활성을 종합하여 정리하면, 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물을 정상 초파리에 단독으로 섭취시킬 경우 마이토콘드리아 컴플렉스 1~4의 활성이 크게 증가되지만, 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물을 복합제(실시에 1)를 처리한 경우에는 마이토콘드리아 컴플렉스 1~4의 활성이 단독 시료만 처리한 시험구보다 현저하게 증가되는 상승작용을 하여 노화가 진행되는 과정에서 알츠하이머 치매를 예방하는데 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

[170] 2) 다음으로 알츠하이머치매 모델 초파리에 참당귀 추출물과 익힌 숙잠 분말을 단독 또는 복합제 형태 제조하여 섭취시킨 다음 마이토콘드리아 컴플렉스 1~4의 활성을 비교하였다(도 5).

[171] 그 결과 참당귀 추출물과 익힌 숙잠 분말을 단독 또는 복합제로 포함한 사료에서 배양된 알츠하이머치매 모델 초파리의 마이토콘드리아 컴플렉스

1~4의 활성이 증가함을 확인하였고, 복합제의 경우에는 단독시료보다 현저하게 상승된 증가율을 보임을 확인하였다.

[172] 자세히 설명하면, 알츠하이머치매 모델 초파리에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 1 활성의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우 76.8%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우는 70.2%가 증가되었다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 155.3% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 미토콘드리아 콤플렉스 1 활성 증가율에 비하여 2.0~2.2배 (78.5~85.1%p)가 더 높은 현저한 활성 증가율로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 미토콘드리아 콤플렉스 1 활성에 상호보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[173] 또한, 알츠하이머치매 모델 초파리에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 2 활성의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우 100.0%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우는 106.9%가 증가되었다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 214.0% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 미토콘드리아 콤플렉스 2 활성 증가율에 비하여 2.0~2.1배 (107.1~114.0%p) 더 높은 현저한 활성 증가율로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 미토콘드리아 콤플렉스 2 활성에 상호보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[174] 또한, 알츠하이머치매 모델 초파리에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 3 활성의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우 168.1%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우는 263.0%가 증가되었다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 324.1% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 미토콘드리아 콤플렉스 3의 활성 증가율에 비하여 1.2~1.9배(61.1~156.0%p)가 더 높은 현저한 활성 증가율로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 미토콘드리아 콤플렉스 3 활성에 상호보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

[175] 또한, 알츠하이머치매 모델 초파리에 대한 미토콘드리아 콤플렉스 4 활성의 경우, 일반사료만을 섭취시킨 시험군과 비교하여 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군의 경우 187.6%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된

사료를 섭취시킨 시험군의 경우는 126.6%가 증가되었다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)가 첨가된 사료를 섭취시킨 시험군에서는 270.4% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 마이트콘드리아 콤플렉스 4 활성 증가율에 비하여 1.4~2.1배 (82.8~143.8%p) 더 높은 현저한 활성 증가율로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 마이트콘드리아 콤플렉스 4 활성에 상호보완하여 상승작용을 한다는 결과이다.

- [176] 이와 같이, 알츠하이머치매 모델 초파리에서의 마이트콘드리아 콤플렉스 활성을 종합하여 정리하면, 정상 대조군과 알츠하이머 치매 시험군 모두 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물을 정상 초파리에 단독시료로 섭취시킬 경우 마이트콘드리아 콤플렉스 1~4의 활성이 크게 증가되었다. 여기에 더하여, 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제를 처리한 경우에는 마이트콘드리아 콤플렉스 1~4의 활성이 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물 단독 처리보다 더 크게 현저하게 증가(최소 61.14%p~최대 156.0%p)되는 놀라운 상승작용을 하여 알츠하이머 치매의 예방 및 치료에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

[177]

[178] <실험예 7. 본 발명의 실시예 1의 혼합물 처리에 따른 ATP 생성 능력증진효과 확인>

[179] 1. 실험방법

- [180] 위에서 살펴본 마이트콘드리아 콤플렉스의 활성 증가가 ATP 생성에 주는 영향을 확인하기 위하여 일반사료만을 섭취시킨 초파리 뇌의 ATP 양과 비교하여 참당귀 추출물과 익힌 숙잠 분말 단독 또는 복합제를 섭취시킨 초파리 뇌의 ATP 양을 비교하였다. 노화가 진행되면 ATP의 생성이 감소된다고 알려져 있는바, 성충 우화 후 7일된 젊은 초파리와 20일된 노화된 초파리의 ATP 양을 비교분석하였다.

[181] 2. 실험결과

- [182] 상기 실험결과 도 6에 나타낸 바와 같이, 참당귀 추출물과 익힌 숙잠 분말이 단독으로 처리된 시험군의 경우 20일된 노화 초파리의 ATP 양이 일반사료만 섭취한 초파리에 비하여 43.9~52.5%로 증가돼 비록 노화는 진행 되었지만 7일된 젊은 초파리와 비슷한 활력을 보이게 됨을 확인하였으며, 여기에 더하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)가 처리된 시험구의 경우에는 더욱 더 증가하여 59.9%까지 증가(1.1~1.4배)함으로서 7일된 젊은 초파리보다도 더 높은 활력을 보이는 현저한 상승효과를 나타냄을 확인하였다.

- [183] 자세히 설명하면, 일반사료만 먹인 20일된 초파리는 노화가 진행되어 7일된 초파리에 비하여 ATP생성이 31.0% 감소되었지만, 참당귀 추출물이 첨가된 사료를 섭취한 초파리는 일반사료만 섭취한 초파리에 비하여 43.9%가 증가하였고, 익힌 숙잠 분말이 첨가된 사료를 섭취한 초파리는 52.5%가

증가하였다. 이에 비하여 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 첨가된 사료를 섭취한 초파리는 59.9% 증가되었는바, 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 ATP 생성 증가율에 비하여 1.1~1.4배 (7.4~16.0%p) 더 높은 현저히 증가된 증가율로서, 이 결과는 노화가 진행됨에 따라 나타나는 ATP생성 저해를 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시예 1)가 처리되었을 때 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물 단독 섭취시 보다 더 막아주는 상승작용을 한다는 결과이다.

[184]

[185] <실험예 8. 본 발명의 실시예 1의 복합제 복용에 따른 단기기억력 상실에 대한 기억력 증진효과 확인>

[186] 1. 실험방법

[187] 초기 알츠하이머성 치매의 특징인 단기기억력 상실에 대한 기억력 증진효과를 확인하기 위하여 실험용 마우스에 실시예1의 혼합물을 섭취시키면서 단기기억력 상실제인 스코폴라민을 처리하여 실험하였다. 태어난지 4주된 수컷 마우스에 혼합물 중 황견품중 익힌누에 가공물을 1.0 g/Kg체중의 비율로 3주간 투여하였다. 3주간의 투여가 종료된 후, 마우스는 실험 1일차에는 실험 30분 전에 마우스를 실험실로 운반하여 적응과정을 거친 후, 수동회피(Passive avoidance)실험기구의 밝은 방에서 2분간 적응시켰다. 실험 2일차에는 마우스에 실험을 시작하기 30분 전에 식염수에 녹인 스코폴라민을 0.75mg/Kg체중 비율로 주사하였다. 대조군은 동일 량의 식염수를 주사하였다. 수동회피 기구의 밝은 방에 마우스를 넣은 후, 30초 후 어두운 방으로 들어가는 통로를 열어 주고, 마우스의 꼬리까지 들어가면 0.4mA의 전기충격을 4초간 주었다. 이후 어두운 방으로 들어가는 시간을 측정하였다. 실험 3일째에는 마우스를 밝은 방으로 옮겨 준 후, 어두운 방으로의 통로를 열은 후, 꼬리까지 들어가는 시간을 측정하였다. 실험이 끝나면, 대조군과 실험군 간의 차이를 ANOVA와 T-test를 수행하여 통계분석을 실시하였다.

[188]

[189] 2. 실험결과

[190] 상기 실험결과 도 7에 나타낸 바와 같이, 일반사료만 섭취시킨 대조군 마우스의 경우에는 2일째 식염수 또는 식염수+스코폴라민 투여군 모두 어두운 방으로 들어가는데 20.2 ± 5.13 초와 13.1 ± 2.06 초로 큰 차이가 없었지만, 전기충격을 받고 24시간 후인 3일째에는 식염수만 처리된 마우스가 어두운 방으로 들어가는 시간은 284.6 ± 11.69 초로 전기충격에 대한 기억력을 가지고 있었다.

[191] 이와 비교하여 스코폴라민을 투여한 마우스의 경우는 50.1 ± 11.9 초 만에 어두운 방으로 이동하여 전기충격에 대한 기억이 상실됨을 보여준다.

[192] 이와 비교하여 익힌 숙잠 분말을 섭취한 쥐의 경우는 식염수만 투여한 시험군의 조명있는 방에서 머무는 시간이 2일째에 22.1 ± 5.88 초와 3일째 $267.6 \pm$

20.5 초로 일반사료만 섭취시킨 대조군과 큰 차이가 없었다.

- [193] 이에 비하여 스코폴라민을 투여한 시험군의 경우에는 2일째에 22.2 ± 4.1 초로 차이가 없지만, 전기 충격 후 3일째는 90.7 ± 17.4 초로 일반사료만 섭취시킨 대조군에 비하여 81.3% 증가한 기억력을 보여주었다.
- [194] 참당귀 추출물을 섭취한 시험군의 경우에는 식염수만 투여한 시험군은 조명된 방에 머무는 시간이 2일째 18.8 ± 4.2 초, 전기충격을 받은 후 3일째 218.2 ± 33.4 초로 일반사료만 섭취시킨 대조군 및 익힌 숙잠 투여군과 큰 차이가 없었다.
- [195] 하지만, 스코폴라민을 섭취시킨 단기기억상실 유도군의 경우에는 2일째 17.0 ± 4.8 초에서 전기충격 후 3일째에는 90.3 ± 27.7 초로 일반사료만 섭취시킨 대조군에 비하여 기억력이 80.6% 증가되었다.
- [196] 이에 비하여 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물 복합제(실시에 1)를 투여한 실험군의 경우, 식염수만을 처리한 시험군은 조명되는 방에 머무는 시간이 2일째 30.3 ± 8.7 초로 대조군이나 다른 실험군과 통계적으로 차이가 없었지만, 전기충격을 받은 후에는 어두운 방으로 들어가지 않고 조명이 있는 방에 머무르는 시간이 297.5 ± 2.5 초로 증가되었다.
- [197] 그리고 스코폴라민을 섭취시켜 단기기억력 상실을 유도한 시험군의 경우는 조명이 되는 방에 머무는 시간이 2일째는 17.4 ± 3.3 초로 대조군이나 다른 실험군과 차이가 없거나 빨랐지만, 전기충격을 받은 후 3일째에는 130.1 ± 25.4 초로 기억력이 159.7%가 증가되었다.
- [198] 이는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)가 참당귀 추출물 또는 익힌 숙잠 분말 단독처리 시험구의 단기기억력 상승율에 비하여 2.0배(76.6~79.1%p) 더 높은 현저한 기억력 회복효과로서, 이 결과는 익힌 숙잠 분말/참당귀 추출물 복합제(실시에 1)는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물이 서로 상호보완작용을 하여 단기기억력 개선에 상승작용을 한다는 결과이다.
- [199]
- [200] <실험예 9. 본 발명의 실시예 1의 복합제 복용에 따른 공간기억력 증진효과 확인>
- [201] 1) Y-미로 시험(Y-maze test) 에서의 본 발명의 실시예 1의 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제의 처리에 따른 공간기억력 증진 효과 비교
- [202] 1. 실험방법
- [203] 실험동물은 실험동물공급업체(Orient, Ga-Pyung, Korea)로부터 8주령의 C57BL/6N 수컷 마우스를 구입하여 7일간의 환경 적응 기간을 두었다. 모든 실험동물은 4마리/cage로 나누어 항온($20 \pm 2^\circ\text{C}$)과 상대습도(50-55%)가 유지되며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 실험실 환경에서 사육하였고, 충분한 양의 식수와 사료를 공급하였다.
- [204] 군 분리 및 시료처리는 다음과 같다:
- [205] 1) 대조군 (0.25% methyl cellulose); 2) 단기기억력 상실제인 스코폴라민(scopolamine) 처리군(scopolamine-injection+saline administration)

group); 3) 익힌 숙잠 205 mg/kg 단독처리군(scopolamine-injection+205 mg/kg b.w. 익힌 숙잠 administration group); 4) 참당귀 165 mg/kg 단독처리군(scopolamine-injection+165mg/kg b.w. 참숙잠 administration group); 5) 익힌숙잠 및 참당귀 205+164 mg/kg 처리군(scopolamine-injection+205+164 mg/kg b.w.); 6) 홍삼 처리군(308mg/kg scopolamine-injection+Red ginseng); 및/또는 7) 알츠하이머형 치매 치료제인 도네페질(donepezil) 처리군 (scopolamine injection+1 mg/kg b.w. donepezil administrationgroup).

[206] 상기 군에게 24일 간 24 시간 간격으로 익힌 숙잠, 참당귀, 익힌 숙잠 및 참당귀 복합제, 홍삼, 도네페질(donepezil)을 205, 165, 205+164 308, 2mg/kg b.w. 농도로 전처리(경구투여)하였다. 행동실험에 들어간 지 30분 전 스코폴라민을 복강투여(1 mg/kg b.w.)하였으며 스코폴라민을 투여한 지 30분 후에 Y-미로 시험 및 행동평가를 실시하였다. 이와 같은 방식으로 총 7일간 행동평가를 수행하였다.

[207] Y-미로 시험에 이용된, Y-미로는 3개의 가지로 구성되어 있으며, 각 가지(arm)의 길이는 42 cm, 넓이 3cm, 높이 12cm이고 세팔이 접하는 각도는 120도이다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic 으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 마우스를 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 마우스가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 3 가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수학적식에 의해 계산하였다:

[208] 변경 행동력 (%) = 실제 변경/최고변경 × 100 (최고변경: 총 입장횟수-2)

[209]

[210] 2. 실험결과

[211] 상기 실험결과 도 8에 나타낸 바와 같이, 스코폴라민(1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의한 자발적 변경 행동(spontaneous alternation)이 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$). 반면, 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 투여에 의한 자발적 변경 행동은 스코폴라민 투여군에 비해 증가 양상이 나타났다. 또한, 익힌 숙잠 및 복합제 투여군은 유의성 있게 증가하였다. 이러한 자발적 변경 행동이 증가한다는 것은 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미한다.

[212]

[213] **2) Morris 수중미로시험 (moriss water maze test)에서의 본 발명의 실시예 1의 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제의 처리에 따른 공간기억력 증진 효과 비교**

[214] 1. 실험방법

[215] 당업계에서 Morris 수중미로시험을 통한 공간학습 및 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선약물의 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있다. 본 미로의 재원은 지름 90cm, 높이 45cm이며 플랫폼(white platform)의 지름은 6cm로

구성되어 있다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다. 실험방법으로는 미로에 물의 높이가 30cm가 되도록 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1cm 밑에 설치하였다. 미로에는 4개의 마커(marker)를 사용하여 미로를 4분원이 되도록 나누어서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였고, 미로의 한 4분원에 플랫폼을 설치하였다.

- [216] Morris 수중미로시험은 6일 동안 진행하는데, 첫째 날에는 각 마우스들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1분간 미로 안에서 자유로이 수영하도록 하였으며, 이때 플랫폼은 설치하지 않고 두 번째 날부터 5일째 되는 날까지는 하루에 각각의 마우스가 1일 4회씩 1분 동안 10분 간격으로 미로에서 수영하도록 하였다. 두 번째 되는 날부터 5일째 되는 4일간 1회의 실험 방법은 이미 미로안에 설치한 플랫폼에 1분 이내에 10초간 올라가 있는 마우스는 실험을 마치고 1분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10초간 올라가 있지 않은 마우스는 실험종료 후 인위적으로 10초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하였으며, 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6일째 되는 날에는 플랫폼을 미로에서 제거한 후 플랫폼이 있던 위치에 마우스가 머문 시간을 측정하였다. 건망증 유발물질로는 스코폴라민(scopolamine)을 사용하였으며, 투여는 매일 첫 번째 입수 30분 전에 1 mg/kg로 복강으로 투여하였고, 모든 실험 데이터는 Smart3.0 program (Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

[217]

[218] 2. 실험결과

- [219] 상기 실험결과 도 9에 나타낸 바와 같이, Morris 수중미로 실험 결과, 6일째 플랫폼을 제거한 후 1분 동안 미로에 풀어놓고 플랫폼이 있던 target zone에 머문 시간을 비율로 측정했을 때, 대조군(Control)은 26.87%, 대조군 + 스코폴라민 군(Con+Sco)은 14.81%; 스코폴라민 + 익힌 숙잠(SW+Sco) 투여군은 43.03%; 스코폴라민 + 참당귀(CDG+Sco) 투여군은 40.28%; 스코폴라민 + 익힌숙잠 및 참당귀 복합제(COM+Sco) 투여군은 43.66%; 및 스코폴라민 + 홍삼 기억력 개선 제품(RG+Sco) 투여군은 44.67%으로 나타나, 본 발명의 익힌숙잠 및 참당귀 복합제(COM) 군의 효과가 현저히 좋음을 확인하였다.

[220]

[221] <실험예 10. 본 발명의 실시예 1의 복합제 복용에 따른 치매 마우스 모델(3xTG-AD)에서의 개선 효과 비교>

- [222] 1) 3xTG 치매 마우스 모델에서의 본 발명의 실시예 1의 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제의 처리에 따른 자세조절능력 증진 효과 비교

[223] 1. 실험방법

- [224] 3xTG 치매 마우스 모델은 가족성 알츠하이머 치매 연관 돌연변이인 APP-swedish돌연변이, PSEN1 M146V돌연변이와 동시에 전두엽성 치매 연관

돌연변이인 MAPT P301L 돌연변이를 발현하는 형질전환 마우스 모델이다.

[225] 앞서 실험예들에서 우수한 효과를 나타낸 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제를 이용하여 알츠하이머 치매의 이상 행동 중 하나인 자세조절능력 상실에 대한 효과를 비교하기 위하여 치매-유발 형질전환 마우스 모델인 3xTG 치매 마우스에 익힌 숙잠과 참당귀 추출물을 포함한 사료를 섭취시킨 후 공간기억력을 실험하였다. 취매 마우스들은 익힌 숙잠은 0.2g/Kg 체중, 참당귀 추출물은 0.16g/Kg 체중의 비율로 섭취시킨 후, 태어 난지 24주된 마우스들에 대하여 자세조절능력 실험(mouse clasping test)을 실시하였다.

[226] 자세조절능력실험은 실험대상 마우스의 꼬리를 잡은 후에 10초간 동영상을 녹화를 한 후, 동영상을 두 명의 연구원들이 각각 관찰하여 몇 개의 다리를 펼 수 있냐에 따라서 0에서 4까지로 점수를 준다. 4개의 다리를 모두 펼 수 없으면 4점을 주고, 모두 펼 수 있으면 0점을 준다. 두 명의 분석 결과를 평균내었다. 자세조절 능력이 좋을수록 0에 가까운 낮은 점수를 받는다.

[227]

[228] 2. 실험결과

[229] 상기 실험결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 일반사료를 섭취한 3xTG 치매 마우스의 자세조절능력은 0.733 ± 0.1532 로서 70%이상의 3xTG마우스가 하나의 다리를 제대로 펴지 못하였다. 하지만, 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 사료를 섭취한 24주령 3xTG 치매 마우스는 자세조절능력이 0.375 ± 0.1829 로서 48.8%의 개선효과가 있었다.

[230]

[231] **2) 3xTG 치매 마우스 모델에서의 본 발명의 실시예 1의 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제 처리에 따른 새로운 물건에 대한 인식능력 증진 효과 비교**

[232] 1. 실험방법

[233] 앞서 실험예들에서 우수한 효과를 나타낸 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제가 3xTG 치매 마우스의 이상 행동 중의 하나인 새로운 물건에 대한 인식능력 악화를 억제할 수 있는지에 대한 연구를 치매 마우스에 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제 사료를 섭취시킨 후 새로운 물건에 대한 인식능력확인 연구(Novel objective recognition assay)를 실시하여 확인하였다.

[234] 첫 날과 둘째 날은 비어있는 가로 50 cm 세로 50 cm, 높이 50 cm인 실험 공간에 실험 마우스를 10분간 자유롭게 이동할 수 있게 해준다. 세 번째 날에는 동일한 두 개의 물건을 넣어 준 후, 마우스의 이동을 10분 동안 녹화를 한 후, 각각의 물건에 머무는 시간을 측정하였다. 마지막 날에는 오래된 물건과 새로운 물건을 각각 하나 씩 넣어 준 후, 10분 동안 녹화를 한 후, 오래된 물건과 새로운 물건에 머무는 시간을 측정하였다.

[235]

[236] 2. 실험결과

[237] 상기 실험결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 익힌 숙잠과 참당귀추출물 복합제를

섭취한 3xTG 치매 마우스는 일반사료 섭취 3xTG 치매 마우스대비 하여 새로운 물건에 대한 뛰어난 인식능력을 가지고 있었다.

- [238] 22주된 일반사료 섭취 3xTG 치매 마우스의 경우는 훈련일에 동일한 물건 두 개의 근처에 머무는 시간이 각각 $42.30 \pm 7.843 \%$ 와 $57.69 \pm 7.843 \%$ 로서 통계적 ($p > 0.05$)으로 차이가 없었고 시험일에 새로운 모양의 물건으로 하나를 바꾸어 주면 새로운 물건에 대해서는 $53.89 \pm 11.089 \%$, 오래된 물건에는 $46.10 \pm 11.089 \%$ 로 머무는 시간이 통계적으로 차이가 없었다. 하지만 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 섭취 치매 마우스의 경우는 훈련일에 동일한 물건 두 개 근처에 머무는 시간이 각각 $41.03 \pm 7.758\%$ 와 $58.96 \pm 7.758 \%$ 로 통계적으로는 차이가 없었지만, 시험일에 새로운 물건이나 오래된 물건에 대한 관심도가 각각 $67.46 \pm 3.819 \%$ 와 $32.54 \pm 3.810 \%$ 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이러한 결과는 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제의 섭취가 치매 마우스에서 나타나는 새로운 물건에 대한 호기심의 감소를 억제하여 줄 수 있음을 보여주고 있다.

[239]

- [240] **3) 3xTG 치매 마우스 모델에서의 본 발명의 실시예 1의 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 처리에 따른 사회성 증진 효과 비교**

- [241] 1. 실험방법

- [242] 앞서 실험예들에서 우수한 효과를 나타낸 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제를 이용하여 알츠하이머 치매의 특징인 사회성 상실에 대한 효과를 비교하기 위하여 3xTG 치매 마우스에 복합제를 섭취시킨 후 사회성(Social interaction assay)의 변화를 실험하였다.

- [243] 사회성 분석은 3개의 공간으로 나뉘어진 마우스 사회성 분석 장치(가로 60cm, 세로 40cm, 높이 40cm)를 이용하여 수행하였다. 3개의 공간은 마우스가 통과할 수 있는 구멍이 있는 투명한 아크릴판 2개로 나누어 준다. 양쪽의 공간에는 마우스를 넣을 수 있는 철망으로 된 지름 10cm 높이 6cm의 케이지가 있다. 처음에는 양쪽의 케이지에 마우스가 없는 상황에서 실험 마우스를 넣어서 5분 동안 자유롭게 적응을 할 수 있도록 하였다. 적응이 종료되면 한쪽의 케이지에 한 번도 만나지 않았던 마우스를 넣어 주고 다른 쪽은 빈 케이지로 둔 상태에서 마우스를 가운데 공간에 넣어준 후 행동을 10분간 녹화하였다. 마지막에는 새로운 마우스를 빈 케이지에 넣어 준 후, 행동을 10분간 녹화하였다. 녹화된 행동을 분석하여 각각의 실험 마우스가 빈 케이지가 있는 공간이나 마우스가 있는 공간에 머무는 시간과 이미 만났던 마우스와 새로운 마우스가 있는 공간에 머무는 시간을 측정하였다.

[244]

- [245] 2. 실험결과

- [246] 상기 실험결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제를 섭취한 3xTG 치매 마우스는 일반사료를 섭취 3xTG치매 마우스보다 뛰어난 사회성을 가지고 있었다.

[247] 23주 된 일반사료 섭취 3xTG 치매 마우스는 무처리 공간에 머무는 비율이 $48.75 \pm 5.772\%$ 고 처음 만나는 마우스가 있는 공간에 머무는 시간의 비율이 $51.24 \pm 5.772\%$ 로 차이가 없었다. 그리고 다음날 새로운 마우스를 넣어 준 공간에 머무는 시간의 비율이 $46.71 \pm 6.683\%$ 로서 이미 한번 만난 마우스가 있는 공간에 머무는 시간의 비율인 $53.28 \pm 6.683\%$ 으로 차이가 없었다. 하지만, 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제 섭취 3xTG 치매 마우스의 경우는 새로운 마우스가 있는 공간에 머무는 시간비율인 $68.82 \pm 5.907\%$ 로 빈 케이지가 있는 공간에 머무는 시간의 비율인 $31.17 \pm 5.907\%$ 에 비하여 통계적으로 유의하게 오래 머물렀고, 다음날 새로운 마우스가 있는 공간에 머무는 시간 비율이 $70.55 \pm 6.341\%$ 로서 이미 한번 만난 마우스가 있는 공간에 머무는 시간인 $29.44 \pm 6.341\%$ 에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다. 이러한 결과는 익힌 숙잠과 참당귀 추출물 복합제의 섭취가 3xTG 치매 마우스의 사회성 결핍을 개선시킬 수 있음을 제시한다.

[248]

[249] 이와 같이, 본 발명에서는 새로운 형태의 식의약품 원료인 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물 복합제(실시예 1)를 섭취할 경우 우수한 기억력 개선 효과와 알츠하이머치매의 예방 및 치료효과를 나타낸다는 것으로, 익힌 숙잠 분말 또는 참당귀 추출물 단독으로 섭취하는 것에 비하여 보다 더 상승된 효과를 나타낸다는 것이다. 이는 익힌 숙잠 분말과 참당귀 추출물은 서로 다른 신경계 작용기전을 갖고 있어서 이들을 혼합한 복합제 형태로 제조하였을 경우 상호간에 보완작용을 하여 상승효과를 발휘하는 것으로 예상된다.

[250] 상기 결과로 인하여 현대사회에 큰 문제로 부각되고 있는 고령화와 고령화로 인한 치매를 근본적으로 예방 및 치료할 수 있을 것으로 기대되며, 아울러 학생, 수험 준비생, 회사원 등 다양한 국민들의 기억력 개선에도 도움을 주게 될 것으로 기대되는바, 본 발명을 이용한 기억력개선과 치매의 예방 및 치료용 건강기능식품 및 의약품이 개발되어 시판될 것으로 예상돼 익힌 숙잠과 당귀의 새로운 활용도 창출 및 고부가가치화로 건강기능식품 생산업과 양잠산업, 당귀 생산업의 발전과 농업발전에 기여하는 효과가 클 것으로 기대된다.

[251]

[252] <제제예 1. 약학적 제조>

[253] 실시예 1의 혼합물 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[254] <제제예 2. 식품 제조>

[255] 제제예 2-1. 조리용 양념의 제조

[256] 실시예 1의 혼합물 1 중량%를 조리용 양념에 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[257] 제제예 2-2. 유제품(dairy products)의 제조

[258] 실시예 1의 혼합물 0.1 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[259] 제제예 2-3. 야채주스 제조

[260] 실시예 1의 혼합물을 토마토주스 또는 당근주스에 첨가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[261] 상기의 본 발명은 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적 기술 범위 내에서 상기 본 발명의 상세한 설명과 다른 형태의 실시예들을 구현할 수 있을 것이다. 여기서 본 발명의 본질적 기술범위는 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[262]

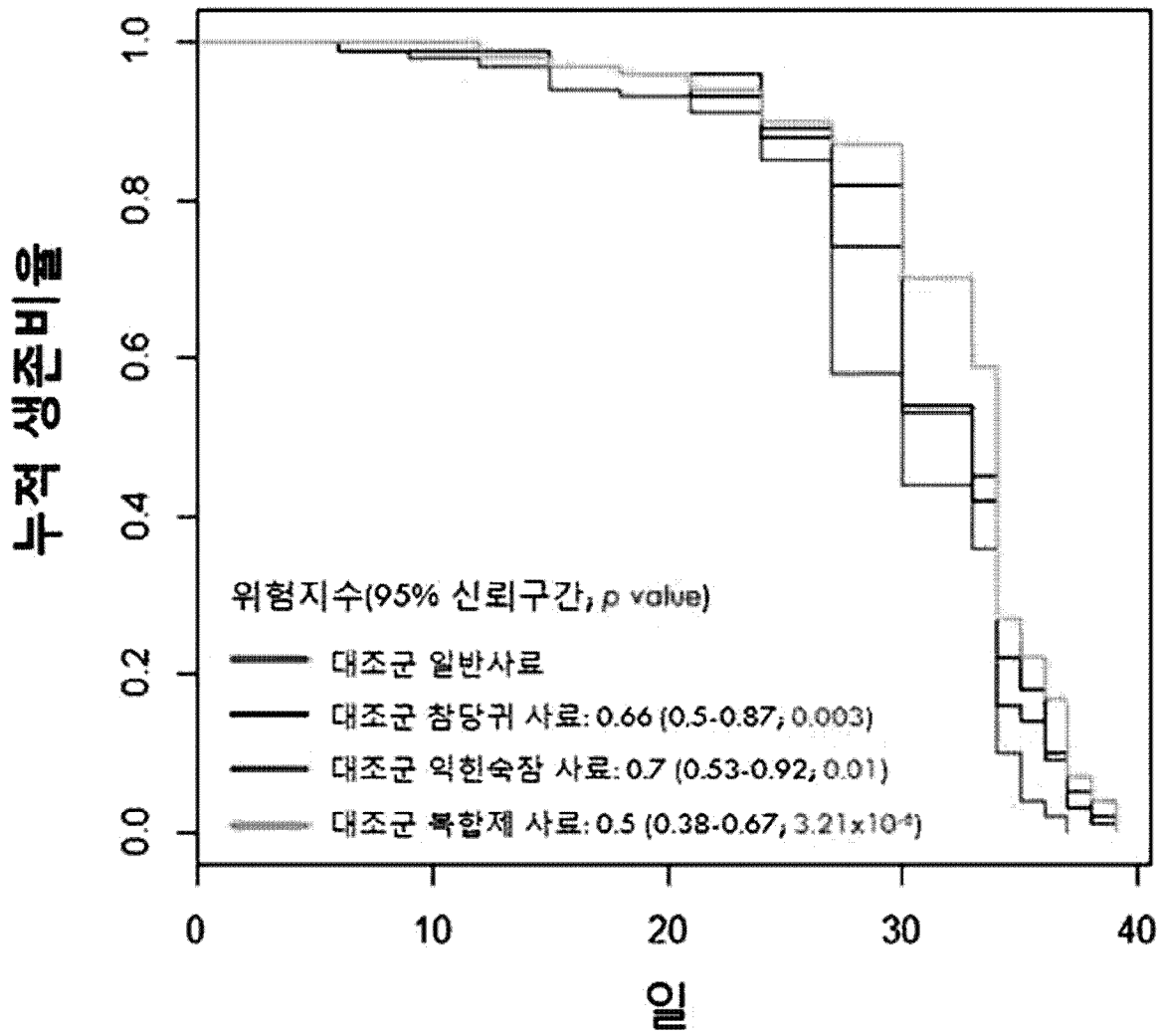
청구범위

- [청구항 1] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 유효성분으로 포함하는, 기억력 개선용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 익힌 누에가공물은 누에 전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익혀 견사단백질이 포함된 상태에서 식이용으로 섭취가능한 것이 특징인, 기억력 개선용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 익힌 누에가공물과 상기 당귀 추출물은 1 : 0.1~1 중량비로 포함되는 것이 특징인, 기억력 개선용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 누에가공물의 누에 품종은 황견품종인 것이 특징인, 기억력 개선용 약학 조성물.
- [청구항 5] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 익힌 누에가공물은 누에 전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익혀 견사단백질이 포함된 상태에서 식이용으로 섭취가능한 것이 특징인, 알츠하이머성 치매 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 익힌 누에가공물과 상기 당귀 추출물은 1 : 0.1~1 중량비로 포함되는 것이 특징인, 알츠하이머성 치매 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 누에가공물의 누에 품종은 황견품종인 것이 특징인, 알츠하이머성 치매 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 유효성분으로 포함하는, 기억력 개선용 식품 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 익힌 누에가공물은 누에 전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익혀 견사단백질이 포함된 상태에서 식이용으로 섭취가능한 것이 특징인, 기억력 개선용 식품 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,

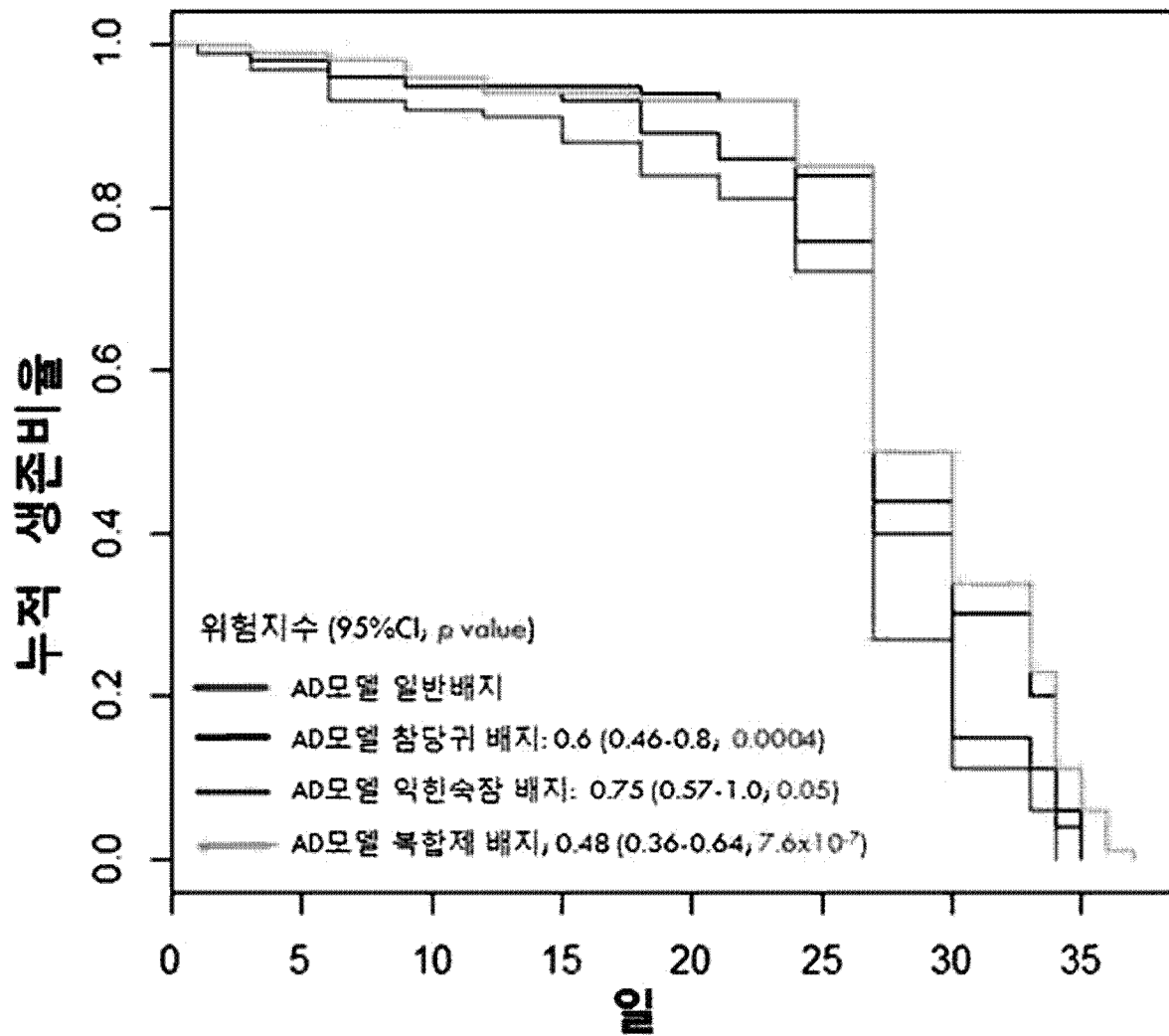
- 상기 익힌 누에가공물과 상기 당귀 추출물은 1 : 0.1~1 중량비로 포함되는 것이 특징인,
기억력 개선용 식품 조성물.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 누에가공물의 누에 품종은 황견품종인 것이 특징인,
기억력 개선용 식품 조성물.
- [청구항 13] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 유효성분으로 포함하는,
알츠하이머성 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 익힌 누에가공물은 누에전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익혀 견사단백질이 포함된 상태에서 식이용으로 섭취가능한 것이 특징인,
알츠하이머성 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 익힌 누에가공물과 상기 당귀 추출물은 1 : 0.1~1 중량비로 구성되는 것이 특징인,
알츠하이머성 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 누에가공물의 누에 품종은 황견품종인 것이 특징인,
알츠하이머성 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 17] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 기억력 개선 방법.
- [청구항 18] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 19] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 혼합하는 단계를 포함하는, 기억력 개선용 조성물의 제조방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 익힌 누에가공물은 누에전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익히는 단계를 통해 제조되고;
상기 당귀 추출물은 물, 메탄올, 에탄올 또는 이의 조합을 당귀에 처리하여 수득한 것을 특징으로 하는,
기억력 개선용 조성물의 제조방법.
- [청구항 21] 익힌 누에가공물 및 당귀 추출물을 혼합하는 단계를 포함하는,
알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
상기 익힌 누에가공물은 누에전체를 80~125°C의 증기의 열로 100~150분 동안 익히는 단계를 통해 제조되고;
상기 당귀 추출물은 물, 메탄올, 에탄올 또는 이의 조합을 당귀에

처리하여 수득한 것을 특징으로 하는,
알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

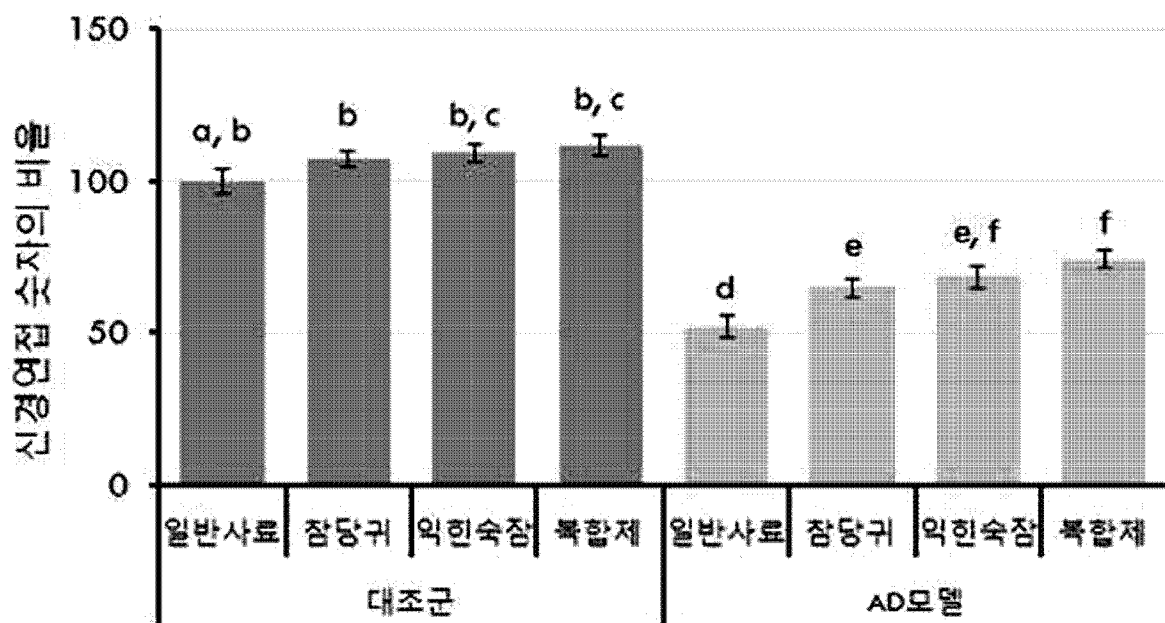
[도1]



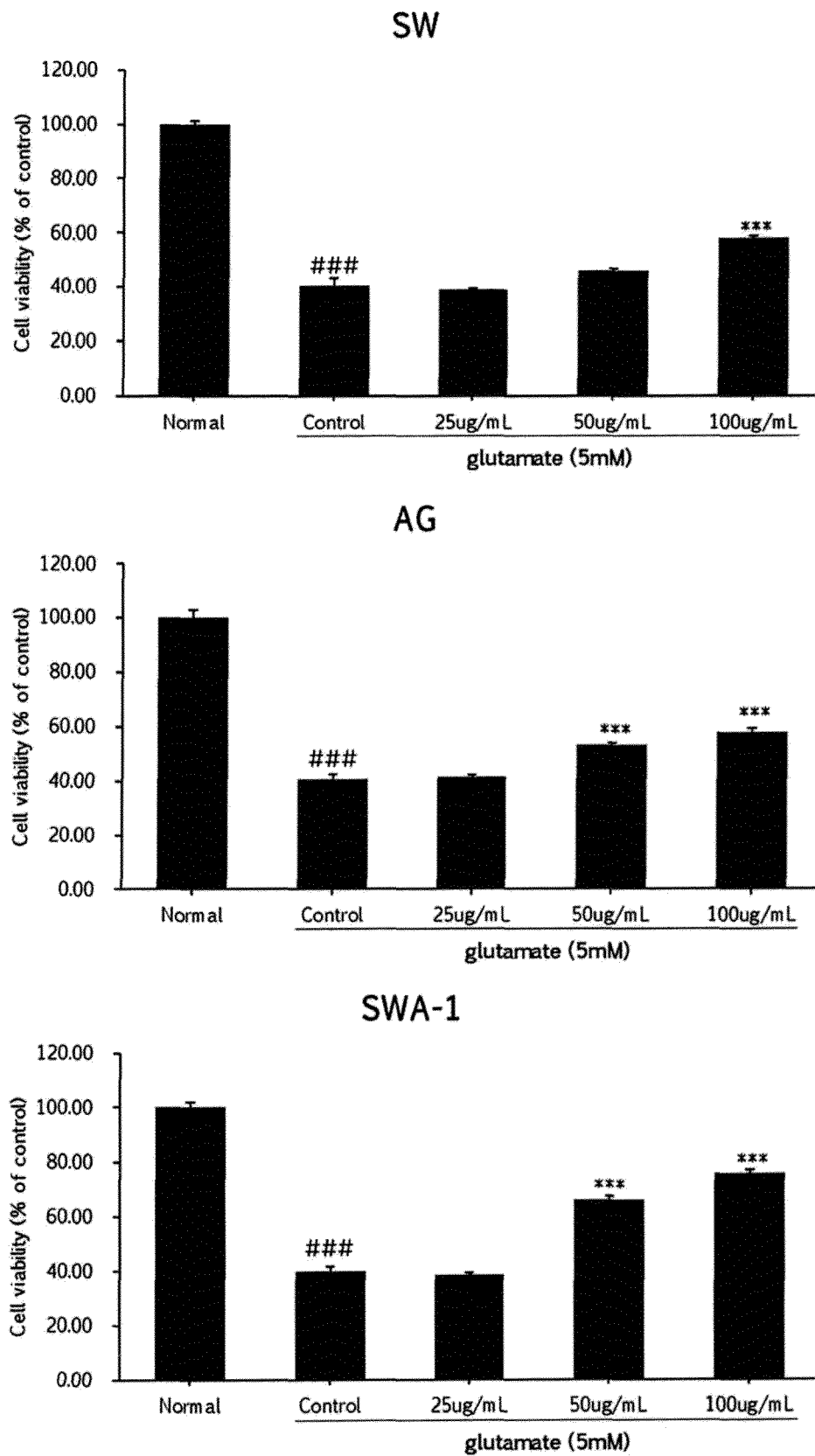
[도2]



[도3]

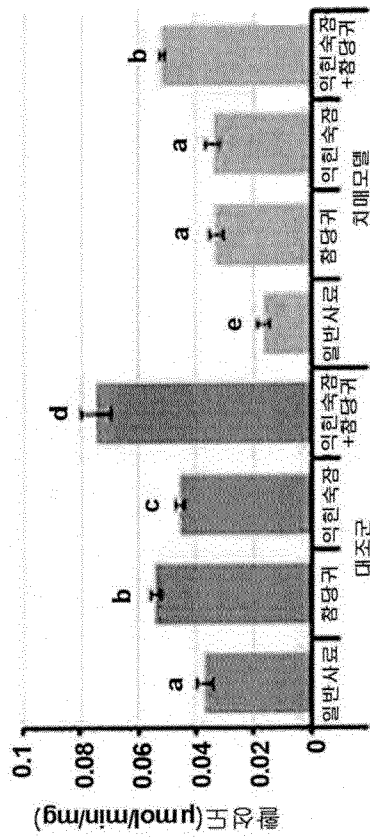


[도 4]

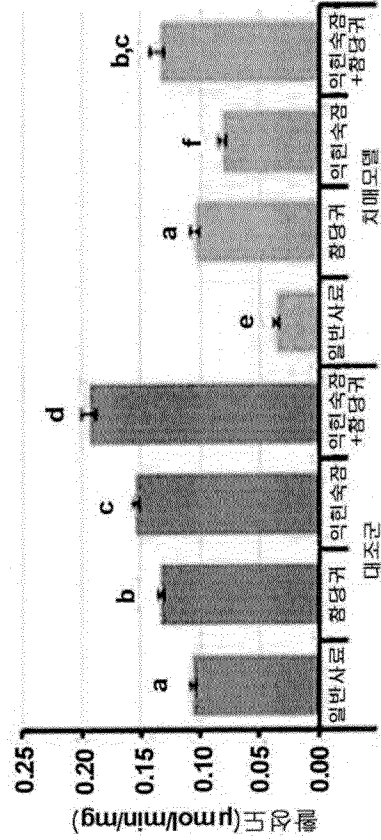


[도 5]

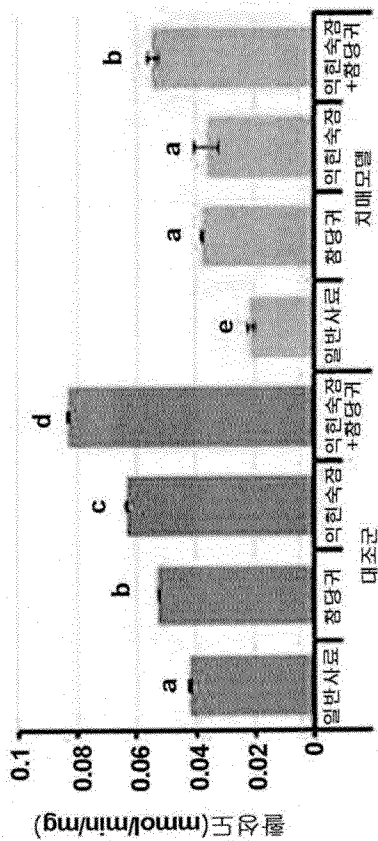
마이토콘드리아کم플렉스2



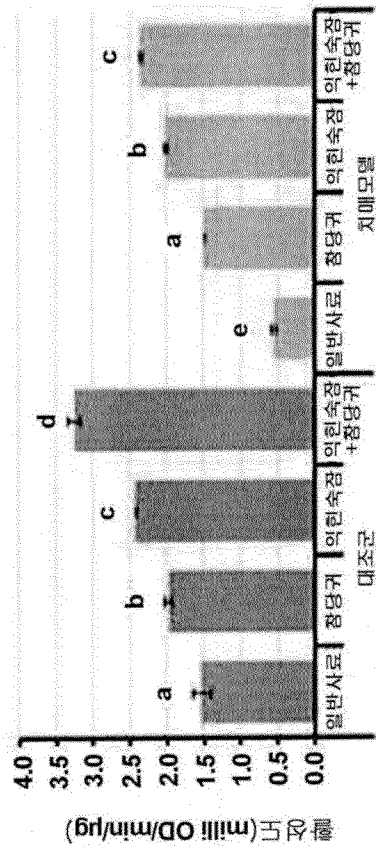
마이토콘드리아کم플렉스4



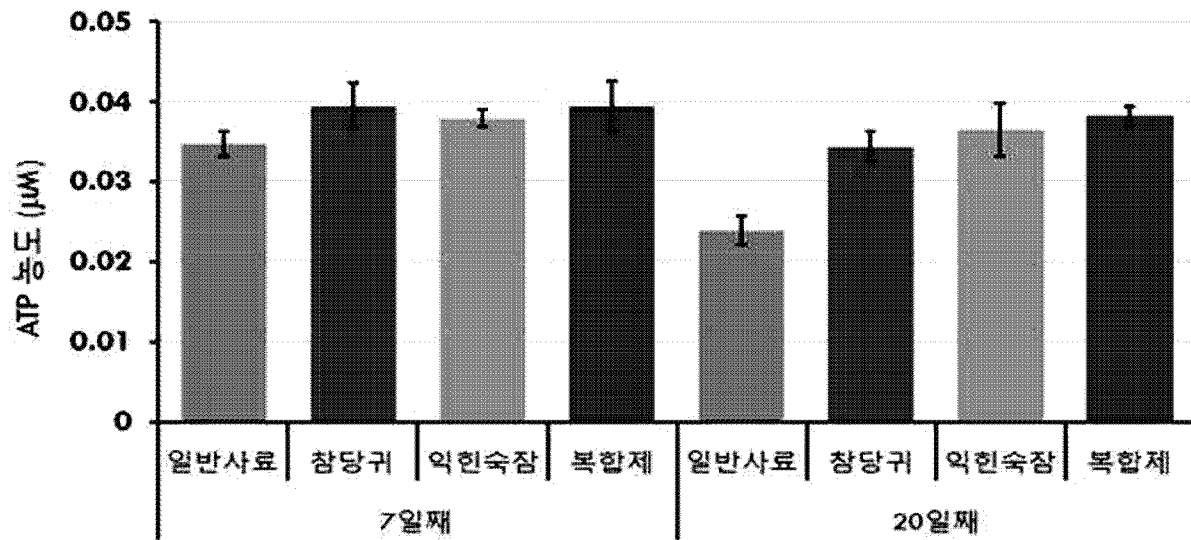
마이토콘드리아کم플렉스1



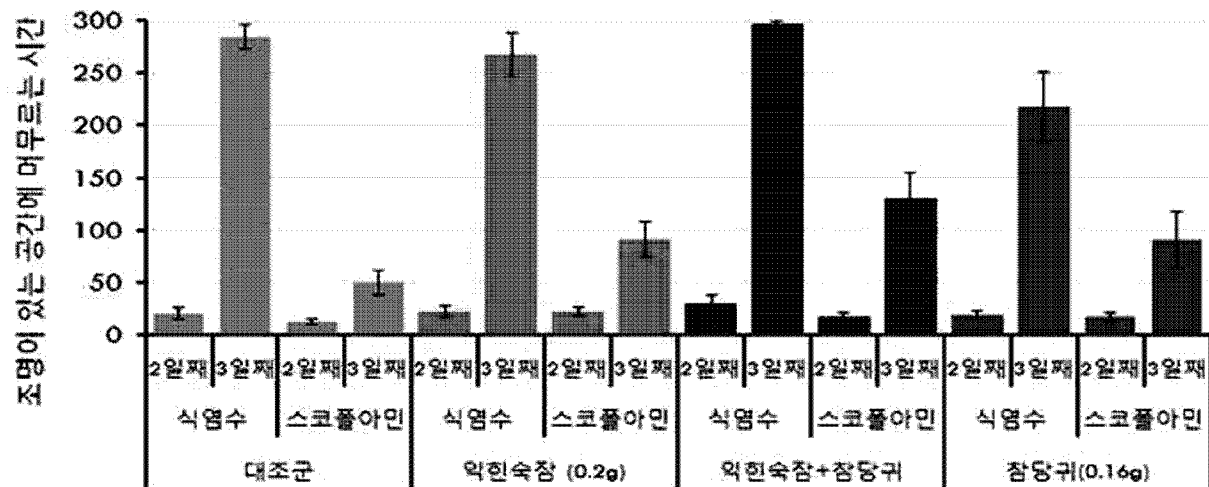
마이토콘드리아کم플렉스3



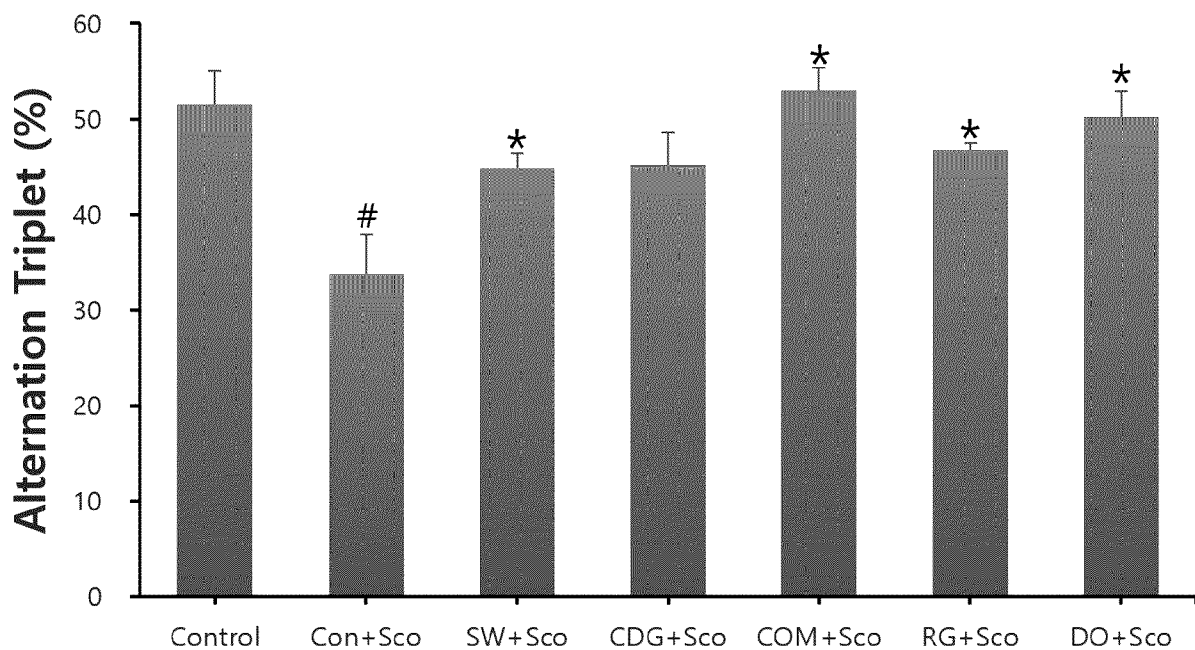
[도6]



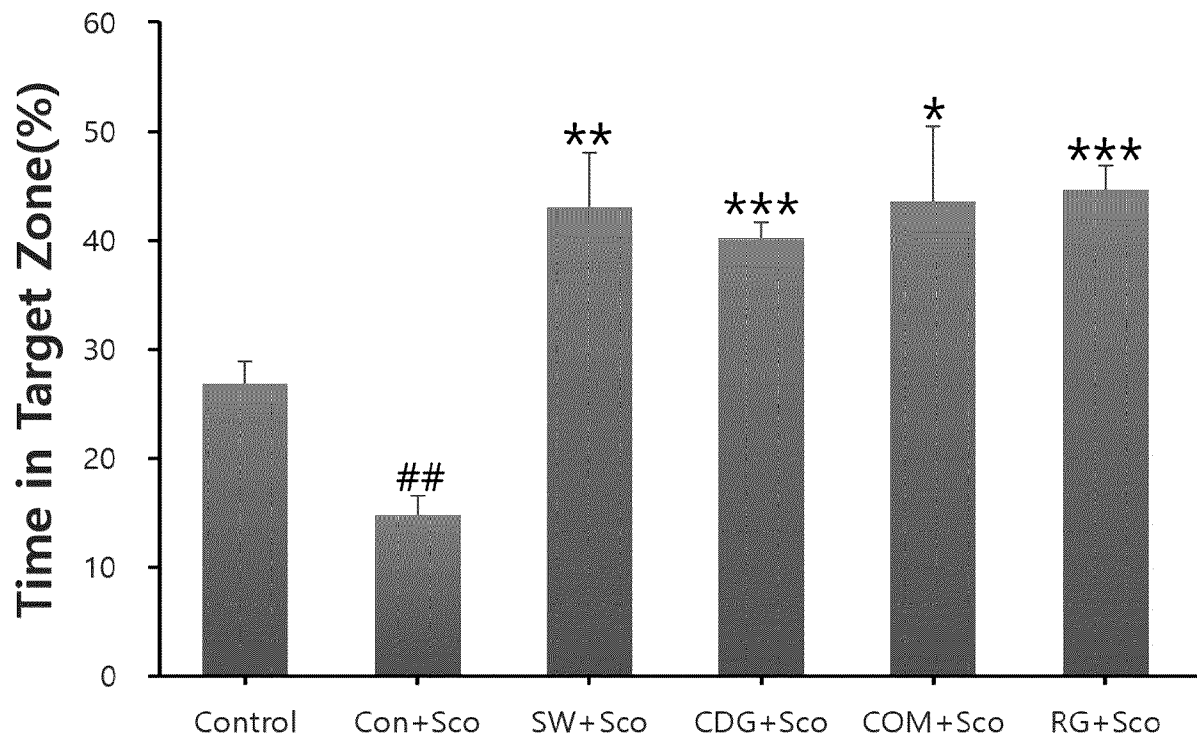
[도7]



[도8]

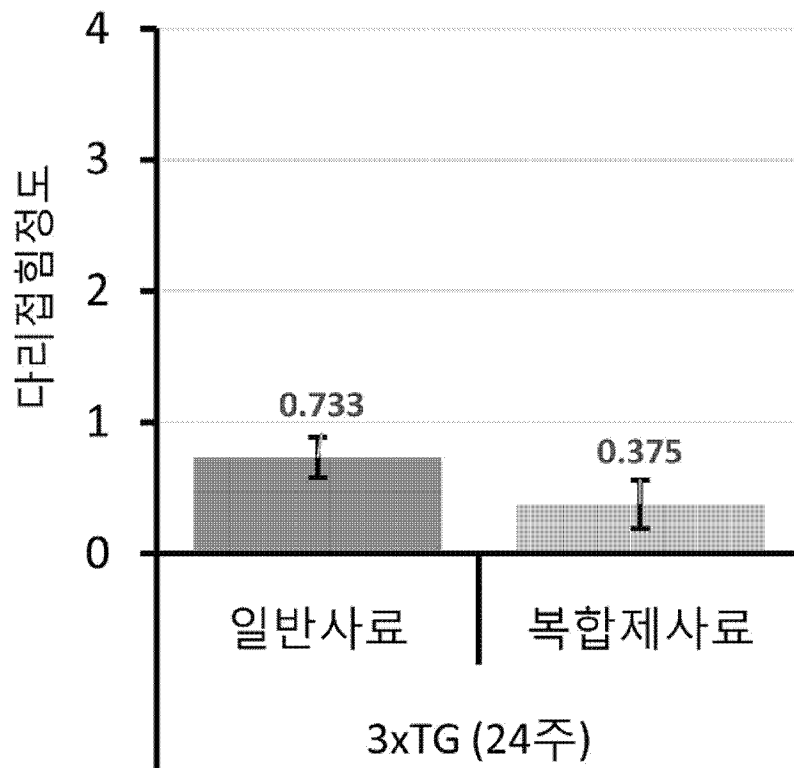


[도9]



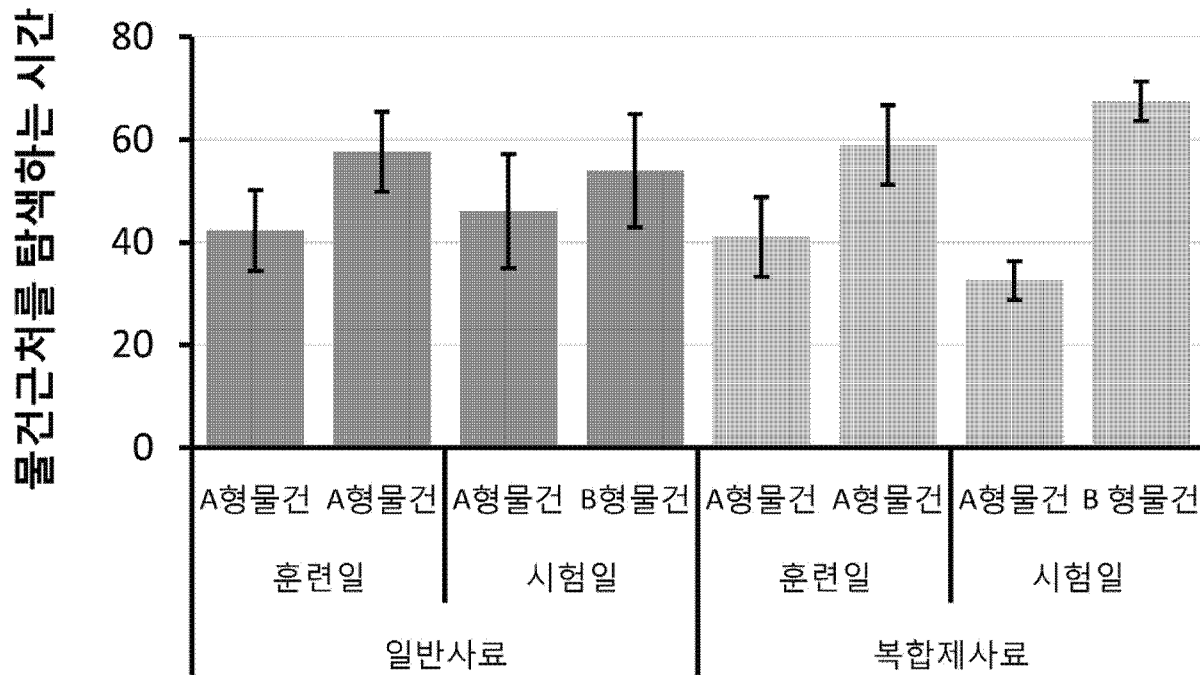
[도10]

자세조절능력테스트



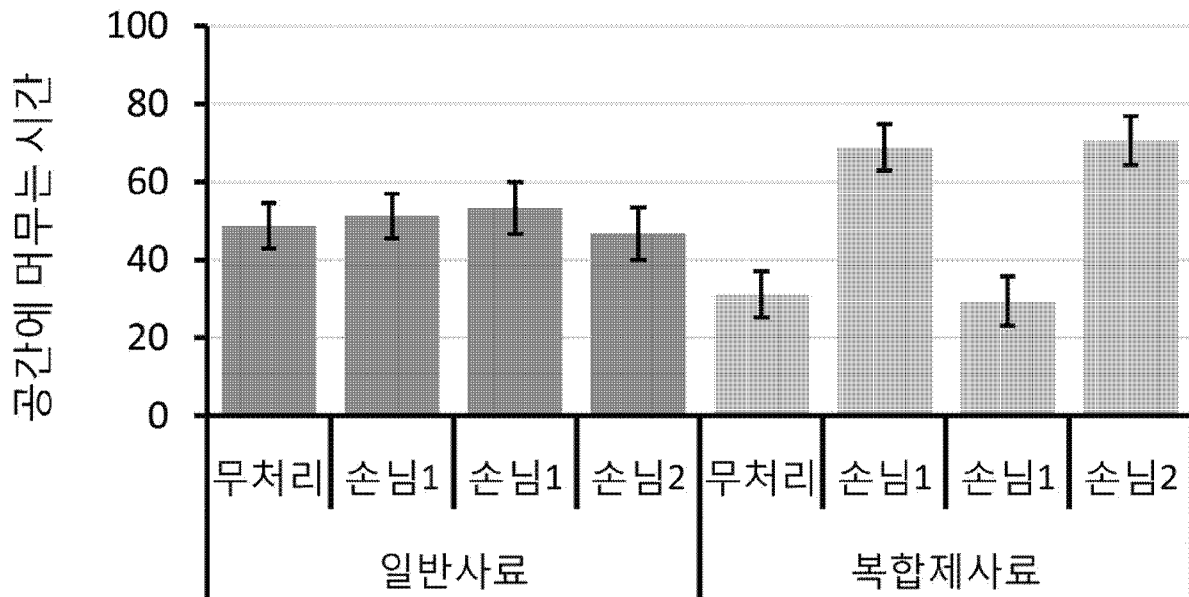
[도11]

새로운물건에 대한 인식능력비교



[도12]

사회성증진효과시험



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/64(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 36/232(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/17(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/64; A23L 33/00; A61K 36/232; A61P 25/28; A61K 38/17; A23L 33/10; A23L 33/17; A23L 33/105

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: silkworm, silk protein, Alzheimer's dementia, memory, extraction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	2016 농업과학연구사업 연보. 농촌진흥청 국립농업과학원. June 2007, pages 1-200, non-official translation (Annual Report 2016 (National Institute of Crop Science). National Institute of Agricultural Sciences.) See page 84.	1-16,19-22
Y	KR 10-2009-0112261 A (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 28 October 2009 See claims 1-8; paragraphs [0013], [0020], [0029]-[0031], [0057].	1-16,19-22
Y	2017 농촌진흥사업연보. 농촌진흥청. 2017, pages 1-384, non-official translation (The Annals of Rural Development Project 2017. Rural Development Administration.) See pages 38, 50.	1-16,19-22
Y	KR 10-2003-0049793 A (SCIGEN HARVEST CO., LTD.) 25 June 2003 See abstract; claims 1-5; pages 1-2.	1-16,19-22
A	KR 10-1793552 B1 (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION) et al.) 03 November 2017 See the entire document.	1-16,19-22
A	KR 10-2011-0108150 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 05 October 2011 See the entire document.	1-16,19-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 FEBRUARY 2020 (24.02.2020)

Date of mailing of the international search report

25 FEBRUARY 2020 (25.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015688

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **17-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17-18 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/015688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0112261 A	28/10/2009	KR 10-1356614 B1	04/02/2014
KR 10-2003-0049793 A	25/06/2003	None	
KR 10-1793552 B1	03/11/2017	None	
KR 10-2011-0108150 A	05/10/2011	KR 10-1149702 B1	23/05/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/64(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 36/232(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/17(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/64; A23L 33/00; A61K 36/232; A61P 25/28; A61K 38/17; A23L 33/10; A23L 33/17; A23L 33/105

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 누에(silkworm), 견사단백질(silk protein), 알츠하이머성 치매(Alzheimer's dementia), 기억(memory), 추출(extraction)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	`2016 농업과학연구사업연보', 농촌진흥청 국립농업과학원, 2017.06, 페이지 1-200 페이지 84	1-16, 19-22
Y	KR 10-2009-0112261 A (동국대학교 산학협력단) 2009.10.28 청구항 1-8; 단락 [0013], [0020], [0029]-[0031], [0057]	1-16, 19-22
Y	`2017 농촌진흥사업연보', 농촌진흥청, 2017, 페이지 1-384 페이지 38, 50	1-16, 19-22
Y	KR 10-2003-0049793 A (주식회사 싸이젠하베스트) 2003.06.25 요약; 청구항 1-5; 페이지 1-2	1-16, 19-22
A	KR 10-1793552 B1 (대한민국(농촌진흥청장) 등) 2017.11.03 전체 문헌	1-16, 19-22
A	KR 10-2011-0108150 A (경희대학교 산학협력단) 2011.10.05 전체 문헌	1-16, 19-22

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 02월 24일 (24.02.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 02월 25일 (25.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



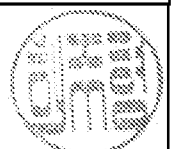
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 17-18
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 17-18은 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0112261 A	2009/10/28	KR 10-1356614 B1	2014/02/04
KR 10-2003-0049793 A	2003/06/25	없음	
KR 10-1793552 B1	2017/11/03	없음	
KR 10-2011-0108150 A	2011/10/05	KR 10-1149702 B1	2012/05/23