



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0078841
(43) 공개일자 2023년06월05일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A23L 33/135</i> (2016.01) <i>A23L 11/50</i> (2021.01)
 <i>A23L 33/185</i> (2016.01) <i>A61K 35/00</i> (2015.01)
 <i>A61K 35/747</i> (2015.01) <i>A61K 36/48</i> (2006.01)
 <i>A61P 1/00</i> (2006.01) <i>A61P 25/28</i> (2006.01)
 <i>C12N 1/20</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A23L 33/135</i> (2016.08)
 <i>A23L 11/50</i> (2023.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0165017
 (22) 출원일자 2021년11월26일
 심사청구일자 2021년11월26일</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 김동현
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
 한명주
 서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 다해</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물**

(57) 요약

락토바실러스 가세리 NK109 (*Lactobacillus gasseri* NK109); 및 콩배아분말을 포함하는, 인지기능 및 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A23L 33/185 (2016.08)

A61K 35/747 (2013.01)

A61K 36/48 (2013.01)

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 1/20 (2021.05)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3202 (2013.01)

A61K 2035/115 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 가세리 NK109 (*Lactobacillus gasser* NK109); 및

콩배아분말을 포함하는, 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 콩배아분말은, 섭씨 50도를 초과하는 온도에서 건식 방식으로 가열처리된 것을 특징으로 하는, 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

락토바실러스 가세리 NK109 (*Lactobacillus gasser* NK109)는 동결건조된 분말인 것을 특징으로 하는, 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물을 포함하는, 인지기능과 장염을 개선하기 위한 건강기능식품.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물을 포함하는, 기억력 장애, 치매, 장염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물 에 관한 것으로, 보다 상세하게는 콩에서 분리된 배아와 동결건조한 프로바이오틱스를 혼합하여 인지기능 및 장염 개선 효과가 우수한, 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콩(*Glycine max* L. Merr)은 우리 나라를 포함한 동아시아를 중심으로 각 지역의 식문화에 맞춰 매우 다양한 품종들이 재배되고 있다. 콩은 용도에 따라 일반용(된장, 두부, 두유), 기름용(콩기름), 콩나물용(두채 용 또는 나물콩) 등으로 구분하고 있다.

[0003] 콩은 유방암, 대장암 등의 억제효과, 동맥경화, 콜레스테롤 저하효과, 순환기질환 및 골다공증 등의 만성질환의 예방효과가 있다. 이와 같은 생리활성 성분으로는 단백질, 불포화지방산, 이소플라본, 소야사포닌 등의 성분에 기인하는 것으로 추정하고 있다.

[0004] 콩의 이소플라본, 사포닌 성분들은 대부분 분자량이 큰 배당체형태로 포함하고 있어 우리가 섭취했을 때 체내로의 이행율이 낮다. 그러므로, 이를 극복하기 위해 발효시키거나, 산을 처리하는 등의 방법으로 체내이행율을 높일 수 있는 작은 배당체 또는 비당체로 전환하는 기술을 개발하고 있다.

[0005] 콩 종실은 형태학적으로는 종피, 자엽, 배로 구성되어 있으며, 각 부분의 비율을 각각 90-92%, 6-8%, 2% 정도다. 콩의 배아는 양은 적으나, 생리활성 피토케미칼인 이소플라본, 소야사포닌 함량은 높다. 특히, 콩의 이소플라본 성분들은 항산화, 인지기능개선, 장염개선 등 다양한 효과를 갖고 있으며, 소야사포닌도 항산화, 인지기능개선 등 다양한 효능을 갖고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허출원 10-2019-0124978
(특허문헌 0002) 2. 대한민국 특허출원 10-2009-0134388
(특허문헌 0003) 3. 대한민국 등록특허 10-1793123
(특허문헌 0004) 4. 대한민국 등록특허 10-1148958)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이러한 콩의 인지기능과 장염 개선효과를 극대화하여 건강기능식품 또는 약학적 조성물로서 가능성을 갖는 새로운 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 락토바실러스 가세리 NK109 (*Lactobacillus gasseri* NK109); 및 콩배아분말을 포함하는, 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 콩배아분말은, 섭씨 50도를 초과하는 온도에서 건식 방식으로 가열처리된 것이다.
- [0010] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 락토바실러스 가세리 NK109 (*Lactobacillus gasseri* NK109)는 동결건조된 분말이다.
- [0011] 본 발명은 또한 상술한 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물을 포함하는, 인지기능과 장염을 개선하기 위한 건강기능식품과, 상술한 인지기능과 장염을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물을 포함하는, 기억력 장애, 치매, 장염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따른 조성물은 프로바이오틱스 NK109와 콩으로부터 분리한 배아를 모두 포함으로써 인지기능개선 효과를 상승시킨다. 특히 콩배아의 전처리를 하는 경우 특이적으로 인지기능을 향상시킬 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0014] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 명세서에서 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 무조건 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 발명자가 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해서 각종 용어의 개념을 적절하게 정의하여 사용할 수 있다.
- [0015] 더 나아가 이들 용어나 단어는 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 알아야 한다.
- [0016] 즉, 본 명세서에서 사용된 용어는 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하기 위해서 사용되는 것일 뿐이고, 본 발명의 내용을 구체적으로 한정하려는 의도로 사용된 것이 아니다.
- [0017] 이들 용어는 본 발명의 여러 가지 가능성을 고려하여 정의된 용어임을 알아야 한다.
- [0018] 또한, 본 명세서에 있어서, 단수의 표현은 문맥상 명확하게 다른 의미로 지시하지 않는 이상, 복수의 표현을 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 유사하게 복수로 표현되어 있다고 하더라도 단수의 의미를 포함할 수 있음을 알아야 한다.
- [0020] 본 명세서의 전체에 걸쳐서 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소를 "포함"한다고 기재하는 경우에는, 특별히 반대

되는 의미의 기재가 없는 한 임의의 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 임의의 다른 구성 요소를 더 포함할 수도 있다는 것을 의미할 수 있다.

- [0021] 더 나아가서, 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소의 "내부에 존재하거나, 연결되어 설치된다"고 기재한 경우에는, 이 구성 요소가 다른 구성 요소와 직접적으로 연결되어 있거나 접촉하여 설치되어 있을 수 있다.
- [0022] 또한, 일정한 거리를 두고 이격되어 설치되어 있을 수도 있으며, 일정한 거리를 두고 이격되어 설치되어 있는 경우에 대해서는 해당 구성 요소를 다른 구성 요소에 고정 내지 연결시키기 위한 제 3의 구성 요소 또는 수단이 존재할 수 있다.
- [0023] 한편, 상기 제 3의 구성 요소 또는 수단에 대한 설명은 생략될 수도 있음을 알아야 한다.
- [0024] 반면에, 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소에 "직접 연결"되어 있다거나, 또는 "직접 접속"되어 있다고 기재되는 경우에는, 제 3의 구성 요소 또는 수단이 존재하지 않는 것으로 이해하여야 한다.
- [0025] 마찬가지로, 각 구성 요소 간의 관계를 설명하는 다른 표현들, 즉 " ~ 사이에"와 "바로 ~ 사이에", 또는 " ~ 에 이웃하는"과 " ~ 에 직접 이웃하는" 등도 마찬가지로 취지를 가지고 있는 것으로 해석되어야 한다.
- [0026] 또한, 본 명세서에 있어서 "일면", "타면", "일측", "타측", "제 1", "제 2" 등의 용어는, 하나의 구성 요소에 대해서 이 하나의 구성 요소가 다른 구성 요소로부터 명확하게 구별될 수 있도록 하기 위해서 사용된다.
- [0027] 하지만, 이와 같은 용어에 의해서 해당 구성 요소의 의미가 제한적으로 사용되는 것은 아님을 알아야 한다.
- [0028] 또한, 본 명세서에서 "상", "하", "좌", "우" 등의 위치와 관련된 용어는, 사용된다면, 해당 구성 요소에 대해서 해당 도면에서의 상대적인 위치를 나타내고 있는 것으로 이해하여야 한다.
- [0029] 또한, 이들의 위치에 대해서 절대적인 위치를 특정하지 않는 이상은, 이들 위치 관련 용어가 절대적인 위치를 언급하고 있는 것으로 이해하여서는 아니 된다.
- [0030] 더욱이, 본 발명의 명세서에서는, "...부", "...기", "모듈", "장치" 등의 용어는, 사용된다면, 하나 이상의 기능이나 동작을 처리할 수 있는 단위를 의미한다.
- [0031] 이는 하드웨어 또는 소프트웨어, 또는 하드웨어와 소프트웨어의 결합으로 구현될 수 있음을 알아야 한다.
- [0032] 본 명세서에 첨부된 도면에서 본 발명을 구성하는 각 구성 요소의 크기, 위치, 결합 관계 등은 본 발명의 사상을 충분히 명확하게 전달할 수 있도록 하기 위해서 또는 설명의 편의를 위해서 일부 과장 또는 축소되거나 생략되어 기술되어 있을 수 있고, 따라서 그 비례나 축척은 엄밀하지 않을 수 있다.
- [0033] 또한, 이하에서, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 구성, 예를 들어, 종래 기술을 포함하는 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략될 수도 있다.
- [0034] 본 발명은 상술한 과제를 해결하기 위하여 전처리되어 콩으로부터 분리된 배아와 프로바이오틱스 NK109를 포함하는, 인지기능 및 장염 개선 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따른 대두배아 전처리는, 콩배아분말을 처리하는 것으로 하기의 방법을 통하여 전처리된다. 하기 전처리 방법의 번호는 하기 실험데이터의 번호와 동일하다.
- [0036] 전처리 방법
- [0037] (1) 헥센으로 추출하여 비극성 성분을 제거하는 방법
- [0038] 콩배아분말(1 그램)을 헥센 50 ml에 하룻밤 실온에 담궈둔다. 익일에 헥센을 버린다. 같은 처리를 3회 반복하고, 흡후두에서 실온에서 하루 건조시킨다.
- [0039] (2) 알코올로 추출하여 비극성성분과 일부의 극성성분을 제거하는 방법
- [0040] 콩배아(1 그램)을 헥센 50 ml에 하룻밤 실온에 담궈둔다. 익일에 알코올을 버린다. 같은 처리를 3회반복하고, 흡후두에서 실온에서 하루 건조시킨다.
- [0041] (3) 습식 가열 멸균 처리하는 방법(저온, 고온)
- [0042] 콩배아분말 (10 그램)을 삼각플라스크에 넣고, 수욕상(50도) 또는 가압증기멸균기(121도)에서 30분동안 멸균시키고, 하루 건조시킨다.

- [0043] (4) 건식 가열 멸균 처리하는 방법(저온, 고온)
- [0044] 콩배아분말 (10 그램)을 삼각플라스크에 넣고, 건열멸균기에서 섭씨 50도(저온) 또는 섭씨 90도(고온)에서 30분간 처리한다.
- [0045] (5) 산 처리하고 습식멸균처리하는 방법(저온, 고온)
- [0046] 콩배아분말 (10 그램)에 물을 50 mL 넣고, 10% 초산 1 mL를 넣고, 수욕의 50도 또는 90도에서 1시간 처리하고, 식용중탄산소다(NaHCO_3) 용액으로 중화하고, 건조한다.
- [0047] (6) 알카리 처리하고 습식 멸균처리하는 방법(중온, 고온)
- [0048] 콩배아분말 (10 그램)에 물을 50 mL 넣고, 1% 식용중탄산소다(NaHCO_3) 용액을 넣고, 수욕의 50도 또는 90도에서 30 분 처리하고, 1% 소다로 중화하고, 건조한다.
- [0049] (7) 상온에서 방치하는 방법
- [0050] 콩배아분말 (10 그램)을 상온에서 30분간 방치한 다음 건조한다.
- [0051] 게니스테인 및 소야사포닌 Ab의 분석
- [0052] 상기 방법으로 처리된 대두배아조성물(1 그램)을 50% 메탄올 10 mL로 2회 추출하고, 감압농축하였다. 이를 메탄올에 녹여 TLC(Cat no. 105626, Merck Millipore)를 한다. 표준품은 soyaaponin Bb와 genistein은 시그마사로부터 구입하여 비교분석한다. 전개용매는 클로로포름:메탄올:물=65:35:10:의 하층(소야사포닌 Bb 분석) 또는 클로로포름:메탄올=5:1를 사용한다. 사포닌 분석을 위해서는 전개한 TLC플레이트를 건조시키고, 10% 황산발색하고 스캔한다. 게니스테인 분석은 TLC플레이트를 UV365 nm에서 스캔하고, 이미징아날라이저로 정량한다. 하기 표 1은 정량한 결과이다.

표 1

	함량(%) ¹⁾	
	게니스테인	소야사포닌Bb
(1)	92	89
(2)	48	62
(3, 저온)	102	104
(3, 고온)	107	138
(4, 저온)	103	111
(4, 고온)	109	159
(5, 저온)	106	113
(5, 고온)	111	139
(6, 저온)	121	134
(6, 고온)	98	139
(7)	100	100
(8)	21	32

- [0053] ¹⁾(7)시료와 비교하여 함량은 계산함프로바이오틱스 배양
- [0054] [1] 프로바이오틱스들은 모두 MRS 배지(BD, USA)에 이식하고 37℃에서 약 24시간 동안 배양하고 집균하고, 동결 건조하여 실험에 사용한다.
- [0055] [2] 프로바이오틱스 안정성 실험
- [0056] 락토바실러스 가세리 NK109 (Lactobacillus gasseri NK109, 대한민국 특허출원 10-2019-0124978호 참조) 배양 동결건조물(1×10^{12} CFU) 또는 이와 10 g 대두배아조성물을 혼합하고 냉장고에서 섭씨 4도로 보관한다. 15일후에 각 조성물을 10 mg 취하여 생리식염수에 현탁하고 10배씩 8단계 계열희석하여, MRS 한천배지배지에 이식하고 37℃에서 약 48시간 동안 혐기적으로 배양하고 자라난 콜로니(colony)을 계수하고 이를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0058]

	생존균수(%) ¹⁾
	1x10 ⁹ CFU in 10 mg 대두배아시료
NK109	100
NK109+(1)	131
NK109+(2)	125
NK109+(3,저온)	108
NK109+(3,고온)	115
NK109+(4,저온)	114
NK109+(4,고온)	152
NK109+(5,저온)	98
NK109+(5,고온)	83
NK109+(6,저온)	89
NK109+(6,고온)	75
NK109+(7)	112
NK109+(8)	121

[0059]

¹⁾ NK109만을 4°C에 15일간 저장하고, GAM 한천배지 이식하여 측정된 생존균수의 비교하여 계산함 SH-SY5Y 세포의 BDNF 발현 측정

[0060]

한국 세포주 은행에서 분양받은 SH-SY5Y 세포를 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-well 플레이트에 웰 당 2x10⁶ 세포수로 분주하였다. 이후, 각 웰에 유산균 (1x10⁴ CFU/mL)과 대두배아 (0.1 mg/mL)을 함께 혹은 따로 넣고, 여기에 LPS (200 ng/mL)의 농도로 첨가하고 24시간 배양하고, 세포 및 상등액을 모아서 초음파처리하고 원심분리하여 상등액의 BDNF 양을 ELISA kit(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 측정한다.

[0061]

PC12 pheochromocytoma 세포의 neuropeptide Y (NPY) 발현에 미치는 효과

[0062]

한국 세포주 은행에서 분양받은 PC12 세포를 10% FBS 및 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하고, 12-well 플레이트에 웰 당 1x10⁶ 세포수로 분주한다. 이후, 각 웰에 유산균 (1x10⁴ CFU/mL)와/또는 대두배아 (0.1 mg/mL)을 함께 혹은 따로 넣고, 여기에 LPS (200 ng/mL)의 농도로 첨가하고 24시간 배양하고, 세포 및 상등액을 모아서 초음파처리하고 원심분리하여 상등액의 NPY 양을 ELISA kit로 측정한다.

[0063]

소교세포의 염증 지표 측정

[0064]

BV-2 소교세포를 각 웰 당 0.5x10⁶의 수로 24-well 플레이트에 깔고, 각 웰에 유산균 (1x10⁴ CFU/mL)과/또는 대두배아 (0.1 mg/mL)을 함께 혹은 따로 넣고, 이어서 염증 반응 유도 물질인 리포폴리사카라이드 (LPS, 100 ng/mL)을 넣고 24시간 동안 처리하고, 상등액을 모아서 TNF-α을 Elisa kit(Ebioscience, San Diego, CA)로 측정하고, 이를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0065]

	PC12 cell	SH-SY5Y cell	BV-2 세포
	NPY (ng/mL)	BDNF (ng/mL)	TNF-α (pg/mL)
생리식염수	9.2	8.4	12.5
LPS	2.9	1.8	43.1
LPS+NK109	3.8	4.4	22.5
LPS+(1)	3.0	2.3	35.4
LPS+(2)	3.1	2.9	32.8
LPS+(3,저온)	3.3	3.1	35.2
LPS+(3,고온)	3.5	3.5	32.1
LPS+(4,저온)	4.1	4.4	31.2
LPS+(4,고온)	4.6	4.9	25.6
LPS+(5,저온)	3.2	3.1	32.9
LPS+(5,고온)	3.2	3.3	31.8
LPS+(6,저온)	3.4	3.1	38.5

LPS+(6, 고온)	3.1	2.8	37.3
LPS+(7)	3.1	2.9	32.5
LPS+(8)	2.9	2.5	35.6
LPS+NK109+(1)	4.3	4.8	21.3
LPS+NK109+(2)	3.9	6.0	22.2
LPS+NK109+(3, 저온)	4.8	5.5	20.5
LPS+NK109+(3, 고온)	4.5	5.2	21.0
LPS+NK109+(4, 저온)	4.7	5.5	20.1
LPS+NK109+(4, 고온)	5.5	6.3	17.8
LPS+NK109+(5, 저온)	4.4	5.2	21.3
LPS+NK109+(5, 고온)	4.3	5.3	22.0
LPS+NK109+(6, 저온)	4.2	5.4	22.1
LPS+NK109+(6, 고온)	3.9	4.6	21.0
LPS+NK109+(7)	3.8	3.4	20.2
LPS+NK109+(8)	3.9	3.3	21.0

[0066] 상기 결과를 살펴보면, 4번, 즉, 고온에서 건식 가열 멸균 처리된 콤파아분말인 4번이 신경세포의 성장/영양인자인 BDNF (brain-derived neurotrophic factor), neuropeptide 발현을 매우 우수하게 증가시키고, 뇌의 소교세포의 염증지표인 TNF- α 의 발현을 매우 우수하게 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 특히 NPY (ng/mL)은 거의 기존 수치보다 1.0 ng/ml이상 높은 것을 알 수 있다. LPS 유도 인지기능 손상모델 동물에서 조성물의 효능 측정

[0067] C57BL/6 수컷 생쥐 (5주령 19-21 g)를 한 군에 6마리씩으로 하여 1주간 실험실에 적응시킨다. 뇌질환과 장질환의 유도를 위해 대장균 기원 LPS (10 μ g/kg)을 매일 1회씩 5일간 복강 투여한다. 익일부터 조성물([1] 다양한 소재를 처리한 대두배아 2 mg/kg; 또는 다양하게 처리한 대두배아 2mg/kg와 함께 NK109 유산균[5x10⁸ CFU/마우스]를 혼합한 조성물) 각각 5일간 매일 1회씩 투여한다. 정상군의 실험동물에는 생리식염수를 경구투여한다. 시료 투여가 종료된 다음날부터 행동실험을 하고, 익일에 실험동물을 죽이고 뇌의 히포캠퍼스를 얻는다. 히포캠퍼스에서는 염증지표인 TNF- α , 기억력관련지표인 BDNF를 ELISA로 측정한다.

[0068] 기억력 행동실험

[0069] Y자형 미로 실험(Y-maze task) - 실험방법: Y자형 미로 측정장치는 3개의 통로 (arm)를 뺀 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것 (arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수 (alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비로 표시한다.

[0070] 물체 인지 실험 - 내부에서 외부가 보이지 않도록 제작된 박스(40 $\times$ 40 $\times$ 40 cm)에서 실시한다. 두 개의 모양과 크기가 같은 물체(A, A')를 상자 안에 고정시킨 후 mouse를 상자의 중심에서 출발시킨다. 그리고 10분간 mouse가 두 물체를 만지는 횟수를 기록한다. 24시간이 지난 다음 두 개의 물체 중 하나를 새로운 물체로 바꾼 후(A, B) 원래 있던 물체 1개와 새롭게 배치된 물체 1개를 준비해 놓고, 동물이 탐색하는 시간을 측정한다.

[0071] 히포캠퍼스를 protease inhibitor cocktail이 함유된 1ml의 RIPA buffer(Gibco사)를 첨가하여 균질화 하고, 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액에서 BDNF와 TNF- α 을 ELISA kit(Ebioscience)를 사용하여 측정한다.

[0072] 대장의 TNF- α 와 IL-10의 발현양 측정

[0073] 대장을 protease inhibitor cocktail이 함유된 1ml의 RIPA buffer(Gibco사)를 첨가하여 균질화 하고, 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액에서 IL-10과 TNF- α 을 ELISA kit(Ebioscience)를 사용하여 측정한다.

[0074] [1 대두배아조성물의 인지능 실험]

표 4

[0075]

	행동실험		히포캠퍼스	
	Spontaneous alteration (%, in Y-maze task)	Exploration (%, in NOR task)	TNF- α (pg/mg)	BDNF (pg/mg)
생리식염수	72.4	78.4	8.9	98.5
LPS+생리식염수	48.5	51.0	15.2	48.9
LPS+(1)	55.8	56.4	13.6	68.4
LPS+(2)	53.3	54.8	14.1	69.3
LPS+(3, 저온)	58.4	57.2	13.3	77.2
LPS+(3, 고온)	55.9	58.2	12.9	78.2
LPS+(4, 저온)	61.9	60.1	12.4	91.2
LPS+(4, 고온)	63.2	65.3	11.8	94.0
LPS+(5, 저온)	59.3	58.9	13.5	80.2
LPS+(5, 고온)	60.5	59.1	13.1	81.3
LPS+(6, 저온)	61.5	58.3	13.6	83.2
LPS+(6, 고온)	60.2	57.4	13.7	82.2
LPS+(7)	58.7	59.2	13.4	80.5
LPS+(8)	57.2	57.3	13.9	81.4

[0076]

상기 결과를 살펴보면, 4번, 즉, 고온에서 건식 가열 멸균 처리된 콩배아분말인 4번이 인지능 시험에서도 매우 우수하다는 것을 알 수 있다.

[0077]

[2 대두배아조성물과 NK109의 혼합조성물의 인지능 실험]

표 5

[0078]

	인지능		히포캠퍼스	
	Spontaneous alteration (%, in Y-maze task)	Exploration (%, in NOR task)	TNF- α (pg/mg)	BDNF (pg/mg)
생리식염수	72.4	78.4	8.9	98.5
LPS+생리식염수	48.5	51.0	15.2	48.9
LPS+NK109+생리식염수	62.5	64.3	12.3	78.4
LPS+NK109+(1)	62.7	67.4	11.8	79.3
LPS+NK109+(2)	63.2	65.2	12.0	77.2
LPS+NK109+(3, 저온)	62.8	68.9	11.1	81.2
LPS+NK109+(3, 고온)	64.3	69.5	10.2	82.2
LPS+NK109+(4, 저온)	64.3	69.8	11.3	91.2
LPS+ NK109+(4, 고온)	67.2	74.5	10.1	94.0
LPS+ NK109+(5, 저온)	64.4	67.8	11.7	81.3
LPS+ NK109+(5, 고온)	65.0	68.3	11.9	83.2
LPS+ NK109+(6, 저온)	64.9	69.6	12.3	82.2
LPS+ NK109+(6, 고온)	65.2	63.3	12.1	80.5
LPS+ NK109+(7)	64.5	68.2	11.8	81.4
LPS+ NK109+(8)	63.9	66.4	12.3	79.6

[0079]

상기 결과를 살펴보면, NK109에 대두배아조성물을 혼합했을 때도 4번, 즉, 고온에서 건식 가열 멸균 처리된 콩 배아분말인 4번이 인지능 시험에서도 매우 우수하다는 것을 알 수 있다. [대장의 염증 지표]

표 6

[0080]

	길이 (cm)	TNF- α (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)
생리식염수	5.2	12.9	20.4
LPS+생리식염수	4.4	28.2	11.5
LPS+NK109+생리식염수	4.9	16.7	12.3
LPS+NK109+(1)	4.9	16.2	11.8

LPS+NK109+(2)	4.8	16.9	12.0
LPS+NK109+(3, 저온)	4.9	17.1	11.1
LPS+NK109+(3, 고온)	4.9	16.0	10.2
LPS+NK109+(4, 저온)	5.0	14.9	11.3
LPS+ NK109+(4, 고온)	5.1	14.4	10.1
LPS+ NK109+(5, 저온)	4.8	16.3	11.7
LPS+ NK109+(5, 고온)	4.9	15.1	11.9
LPS+ NK109+(6, 저온)	4.9	15.9	12.3
LPS+ NK109+(6, 고온)	4.9	16.2	12.1
LPS+ NK109+(7)	4.9	15.8	11.8
LPS+ NK109+(8)	4.9	16.3	12.3

[0081] 상기 결과를 살펴보면, NK109와 4번, 즉, 고온에서 건식 가열 멸균 처리된 콩배아분말인 4번을 혼합하였을 때, 대장에서 염증지표인 TNF- α 발현양을 매우 우수하게 낮추고, 항염증지표인 IL-10의 발현양을 매우 우수하게 증가시키는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 인지기능을 개선하는 대두배아 프로바이오틱스 조성물은, 건식 가열 멸균 처리된 콩배아분말과, *Lactobacillus gasseri* NK109 배양동결건조물을 포함하며, 인지기능과 장염 개선 효과를 극대화하기 위하여 콩 배아분말은 고온에서 건식 가열 멸균 처리되며, 이는 섭씨 50도를 초과하는 온도이며, 바람직하게는 섭씨 80도 이상이고, 가장 바람직하게는 섭씨 100도 이상이다.