

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7578582号
(P7578582)

(45)発行日 令和6年11月6日(2024.11.6)

(24)登録日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	E	
C 1 2 N 1/16 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A	
A 2 3 L 31/00 (2016.01)	C 1 2 N	1/16	A	
A 6 1 K 35/747 (2015.01)	A 2 3 L	31/00		
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K	35/747		
請求項の数 12 (全40頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2021-500421(P2021-500421)	(73)特許権者	504244025
(86)(22)出願日	令和1年7月16日(2019.7.16)		ギウリアニ ソシエタ ペル アチオニ
(65)公表番号	特表2021-530215(P2021-530215 A)		イタリア国、2 0 1 2 9 ミラノ、ヴィア パラギ、2
(43)公表日	令和3年11月11日(2021.11.11)	(74)代理人	100166338
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/056055		弁理士 関口 正夫
(87)国際公開番号	WO2020/016770	(72)発明者	ギウリアニ ジャンマリア
(87)国際公開日	令和2年1月23日(2020.1.23)		スイス国 6 9 2 6 モンタニョーラ ヴ ィア コッリーナ ドーロ 3 5
審査請求日	令和4年7月12日(2022.7.12)	(72)発明者	ゴベッティ マルコ
(31)優先権主張番号	102018000007229		イタリア国 0 6 1 3 4 ペルージャ ヴ ィア ストラダ ディ リバ 7
(32)優先日	平成30年7月16日(2018.7.16)	(72)発明者	ディ カニョ ラファエラ
(33)優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)		イタリア国 7 0 1 2 6 パリ ヴィア ジ ー、ファネッリ 2 1 5
微生物の受託番号	DSMZ DSM32843 DSMZ DSM32844		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ビーブレッド製造のための微生物学的プロセス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ビーブレッドを製造するための微生物学的プロセスであって、a)花粉粒中の花粉にスターター乳酸菌を接種する工程およびb)花粉を発酵させる工程を含み、前記プロセスは、接種されたスターター乳酸菌が、国際寄託センターLeibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM 32843を有するLactobacillus kunkeei PF12株、国際寄託センターLeibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM 32845を有するLactobacillus kunkeei PF15株、及び国際寄託センターLeibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM32844を有するLactobacillus kunkeei PL13株の混合物であることを特徴とする方法。

【請求項2】

外被覆層を分解するための花粉粒の予備処理工程を含み、工程a)で接種された前記乳酸菌の発酵活性のための前記花粉粒の含有物を利用できるようにする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記花粉粒のコーティングペクチン成分を分解または代謝する酵母の接種を前記予備処理工程または工程 a) に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記発酵させる工程の後、微生物負荷の軽減のさらなる工程 c) を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

乾燥のさらなるステップを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

凍結乾燥または噴霧乾燥のさらなるステップを含む、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法により得られたビーブレッドまたは発酵花粉。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のビーブレッドまたは発酵花粉および食用担体を含む、組成物。

【請求項 9】

心血管疾患、代謝性疾患、骨疾患、脳疾患、及び腸疾患の治療に使用するための、請求項 7 に記載のビーブレッドまたは請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

皮膚老化の治療に使用するための、皮膚の治療に使用するための、又は、毛髪の治療に使用するための、請求項 7 に記載のビーブレッドまたは請求項 8 に記載の組成物。

20

【請求項 11】

国際寄託センター-Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM 32843を有するLactobacillus kunkeei PF12、国際寄託センター-Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM 32845を有するLactobacillus kunkeei PF15、及び国際寄託センター-Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM32844を有するLactobacillus kunkeei PL13の菌株混合物。

30

【請求項 12】

国際寄託センター-Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM 32843を有するLactobacillus kunkeei PF12、国際寄託センター-Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM 32845を有するLactobacillus kunkeei PF15、及び国際寄託センター-Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで寄託された受託番号DSM32844を有するLactobacillus kunkeei PL13の混合物を含む組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビーブレッド (bee bread) の製造のための微生物学的プロセスに関する。

【0002】

50

本発明は、栄養、食事または食品の生産のためのバイオテクノロジープロセスの分野に由来する。

【0003】

特に、本発明は、ハチの巣箱で天然に製造されるビーブレッドに類似した発酵花粉の製造のためのバイオテクノロジープロセスに関する。

【背景技術】

【0004】

花粉は、顕花植物の雄の雄ずいの胚性要素であり、花の雄ずいの末端部に置かれた花の中の粉末状の形態であり、植物が生殖細胞の輸送を委託する顕微鏡的構造からなる。ミツバチは、それを集め、ローヤルゼリーの製造および幼虫の摂食に利用する。

10

【0005】

自然界では、花粉はミツバチ (*Apis mellifera* L.) のためのタンパク質、脂質、ステロール、ミネラルおよびビタミンの主要な供給源であり、一方食品および食事部門では、その栄養素における高含有量のため、関心が高まっている対象となっている。

【0006】

ミツバチは植物の花序または環境から花粉を集め、蜜、ハチ蜜および腺分泌物と混合され、幼虫形態および成虫の主要なタンパク質源を構成する顆粒を形成するハチ巣ハチ巣にそれを堆積させる。

【0007】

ミツバチの巣箱の内側の花粉は、主に乳酸菌および他の微生物によって一連の生化学的変換を受ける。ハチ巣の内部で発酵した花粉を「ビーブレッド」と呼ぶ(非特許文献1)。

20

【0008】

ビーブレッドは、複合多糖類の減少、アミノ酸、タンパク質および脂質のプロファイルの変化および簡単な炭水化物の増加および滴定酸性度の増加のような生化学的修飾を受けた後、最初の花粉に関して異なった組成を有する(非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4)。

【0009】

これらの変化は、ビーブレッドを微生物学的に安定な環境とし、さらにハチ巣での花粉発酵は新鮮な花粉に比べてその消化性および栄養価を増加させる。

30

【0010】

抗酸化、抗炎症、肝保護、抗アテローム性動脈硬化、および免疫調節活性などの栄養的および機能的特性により、ビーブレッドはヒトの食事に適した産物となる(非特許文献5; 非特許文献6; 非特許文献7)。

【0011】

しかし、利用可能なビーブレッドの量は市場需要に比べて不十分である。なぜなら、ミツバチの巣箱からの除去は高価であり、ミツバチの巣箱の構造に損傷を与える可能性があり、いずれにせよ、ミツバチの巣箱に存在する量は成長する市場需要を満たすことができないからである。この生成物の不足が高い市場価格を決定する。

【0012】

このような限界や欠点を克服しようと、ミツバチの巣箱の入り口にいる採餌ハチから直接、ミツバチの花粉を集める。その際、花粉を表面に保持するグリッドからなる「花粉トラップ」の助けを借りる。

40

【0013】

しかし、いかなる種類のコンディショニングも必要としないビーブレッドとは異なり、新鮮な花粉は安定した基質ではなく、マイコトキシンの産生を刺激することができる。

【0014】

したがって、採取した新鮮な花粉は、保存する前に乾燥または凍結する必要がある。

【0015】

しかし、35 以上の温度で乾燥すると、栄養分および揮発性化合物の損失を引き起こ

50

すことが分かっている。一方、凍結は製造コストが高い。

【0016】

2つの技術の間の妥協は、低温除湿に代表される。しかし、この技術は、ビーブレッドの官能特性および栄養特性を維持する上で、凍結よりも効果が低いことが証明されている。

【0017】

したがって、現在、新鮮な製品と同様の官能的、栄養学的特性を有する自然とは異なる起源のビーブレッドを、市場ニーズを満たすのに十分な量、持つ必要性が感じられている。

【0018】

以上の点から、ハチの巣箱の構造を保護しながら、市場のニーズに適した量の産物を得ることを可能にするビーブレッドの製造のための工業プロセスは、本発明の一般的な対象の一部である。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0019】

【文献】Vasquez & Olofsson, 2009

【文献】Lee et al., 2014

【文献】Human and Nicolson, 2006

【文献】Andelkovic et al., 2012

【文献】Markiewicz-Zukowska et al., 2013

【文献】Nagai et al., 2004

20

【文献】Denisow and Denisow - Pietrzyk, 2016

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

本発明の目的の1つは、天然物と同様の官能特性を有するビーブレッドを製造するための微生物学的方法を提供することである。

【0021】

本発明の別の目的は、新鮮な花粉よりも高い栄養的および機能的価値を有するビーブレッドの生産のためのバイオテクノロジープロセスを提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【0022】

本発明は、選択された細菌果性乳酸菌で花粉の発酵を行うことによって、ビーブレッドの形成につながる自然発酵に典型的なものと同様の環境条件が再現されることを観察したことに由来する。

【0023】

特に、特定の細菌果性乳酸菌で花粉を特定の酵母と組み合わせて発酵させることにより、天然産のビーブレッドで同化できる発酵花粉が得られ、同じ開始量の花粉に対する生産収量が増加することが見出された。

【0024】

したがって、本出願人は、グルコースに関して好ましい基質としてフルクトースを使用する乳酸菌の選択された菌株をビーブレッドの生産のための炭素源として同定し、それらをバイオテクノロジープロセス内で使用して、細菌または半細菌のビーブレッドを生産することを見出した。

40

【0025】

第1の態様によれば、本発明は、以下を含む、ビーブレッドの製造のための微生物学的プロセスを提供する：

a) ビーブレッドの生産のための炭素源としてのグルコースに関する好ましい基質としてフルクトースを用いた接種材料の調製およびスターター乳酸菌による花粉の接種、ならびに

b) 花粉発酵の工程であり、

前記工程は、接種されたスターター乳酸菌が *Lactobacillus kunke*

50

i 種に属することを特徴とする。

【0026】

本発明者らはまた、*Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15 および PL13 株ならびにそれらの混合物が、本発明のプロセスのスター乳酸菌として特に適していることを見出した。

【0027】

好都合なことに、本発明のバイオテクノロジープロセスで得られたビーブレッドは、天然起源の花粉よりも栄養価が高く、有効期間が長い。

【0028】

本発明のプロセスから得られるビーブレッドはまた、プロセスの出発物質として用いられる花粉よりも高い栄養価を有する。

10

【0029】

具体的には、本発明の微生物学的/バイオテクノロジーのプロセスによって得られるビーブレッドまたは発酵花粉は、出発物質として使用される未発酵花粉よりも高い総遊離アミノ酸およびペプチド含有量、ならびにより高い消化性タンパク質含有量を有する。

【0030】

さらに、得られたビーブレッドまたは発酵花粉は、典型的には細胞の抗酸化活性を提供する、より高いレベルの可溶性遊離フェノール化合物を、出発花粉よりも有している。

【0031】

本プロセスで得られたビーブレッドの栄養的および長期持続性の特徴の組合せは、栄養学的および食事状況において評価可能であり、栄養補助食品、食事または食品の配合物に適している。

20

【0032】

好都合なことに、本プロセスで得られたビーブレッドは、巣箱の構造を保護することによって得られる、ビーブレッドに典型的な化学組成を有する。

【0033】

第2の態様によると、本発明は、本明細書中に記載の実施形態のいずれか1つによって定義されるプロセスで得られるビーブレッドまたは発酵花粉を提供する。

【0034】

本発明の第3の態様によれば、組成物は、本明細書中に記載の方法で得られたビーブレッドまたは発酵花粉および食用担体を含む。

30

【0035】

本発明のさらなる目的は、好ましくはPF12、PF15およびPL13ならびにそれらの混合物から選択される*Lactobacillus kunkeei*種に属する選択された乳酸菌である。

【0036】

一態様によれば、本発明は、*Lactobacillus kunkeei*種に属する3つの細菌株に関するが、ここで、該株は以下である：

Lactobacillus kunkeei PF12は、2018年7月4日に国際寄託センターLeibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで受託番号DSM 32843とともに寄託された；

40

Lactobacillus kunkeei PF15は、2018年7月4日に国際寄託センターLeibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで受託番号DSM 32845とともに寄託された；

Lactobacillus kunkeei PL13は、2018年7月4日に国際寄託センターLeibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbHで受託番号DSM 32844とともに寄託された；

50

【0037】

認証が添付されている以前に同定された3株は、Giuliani S.p.A, 現在の権利の所有者の会社名に寄託された。

【0038】

本発明の特徴および利点は、以下の添付図面から明らかであろう：

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、混合スターター（*Lactobacillus kunkeei* PF12、PL13およびPF15ならびに*Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bで構成される）（実線符号）を接種した花粉ならびに自然発酵を行った非接種花粉（空白符号）の30 で9日間インキュベーション中の乳酸菌（ Log CFU g^{-1} ）（実線）および滴定酸性度（ $\text{mL } 0.1\text{M NaOH } 10\text{g}^{-1}$ ）（TTA）（破線）の細胞密度値を示すグラフである；

10

【図2】図2は、新鮮な花粉（黒棒）および、30 で216時間発酵した花粉（赤棒）と、混合スターター（*Lactobacillus kunkeei* PF12、PL13、PF15ならびに*Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bで構成される）の遊離アミノ酸の濃度（ mg kg^{-1} ）を示す；

【図3】図3は、新鮮な花粉（黒棒）および30 で216時間発酵させた花粉（赤棒）におけるタンパク質（総タンパク質の%で表す）と混合スターター（*Lactobacillus kunkeei* PF12、PL13およびPF15ならびに*Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bで構成される）とのin vitro消化率値（赤棒）、ならびに新鮮な花粉（黒棒）および30 で216時間発酵させた花粉（赤棒）における分子排除クロマトグラフィー（RP-FPLC、214nm）および混合スターター（*Lactobacillus kunkeei* PF12、PL13およびPF15ならびに*Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bで構成される）とのペプチドプロファイルに関する2つの曲線を示すグラフBである；

20

【図4】図4は、混合スターター（*Lactobacillus kunkeei* PF12、PL13およびPF15ならびに*Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bで構成される）と30 で216時間発酵させた新鮮な花粉中および花粉中の水溶性の遊離フェノール化合物（白色棒）およびメタノール（灰色棒）の濃度（ g 没食子酸 eq kg 乾重 ）に関連する棒グラフである。

30

【図5】図5は、実施例12の試験に従って H_2O_2 1mMで誘導された酸化ストレスの誘発後のヒトケラチノサイトNCTC2544上の細胞生存率に関係する棒グラフを示す。この細胞を、100、250および500 $\mu\text{g/ml}$ の試料B、FER867、FER868、FER869、FER870およびFER871と16時間インキュベートした。未処理細胞（Control） H_2O_2 1mMで処理された細胞（ H_2O_2 でストレスされた細胞）。*（ $p < 0.05$ ）、**（ $p < 0.01$ ）、***（ $p < 0.005$ ）、****（ $p < 0.001$ ）。これらの結果は、誘導された酸化ストレスに対して試験された化合物の防御を示すものであり、本発明の過程で得られた発酵ビープレッドの顕著な抗酸化作用を強調するものである。

40

【図6A】図6Aは、実施例12に従ってqRT-PCRによって評価されたヒトケラチノサイトNCTC2544におけるTNF 遺伝子発現に関係する棒グラフを示す。細胞を、37 で16（A）および24時間（B）、5% CO_2 でRPMI 2.5% FCS（対照）；RPMI 2.5% FCSおよび10 $\mu\text{g/ml}$ LPS（対照+LPS）；100、250および500 $\mu\text{g/ml}$ 試料A（FRESH）、B（対照）およびFER867、FER868、FER869、FER870およびFER871で処理した。未処理細胞（対照）LPS（LPS）10 $\mu\text{g/ml}$ で処理した細胞値は、2回実施した2回の実験のMean \pm SEMを示す。これらの結果は、抗炎症活性を示すものであり、本発明のプロセスで得られた発酵ビープレッドの顕著な抗炎症作用を強調するものである。

【図6B】図6Bは、実施例12に従ってqRT-PCRによって評価されたヒトケラチ

50

ノサイト NCTC 2544 における TNF 遺伝子発現に関係する棒グラフを示す。細胞を、37 で 16 (A) および 24 時間 (B)、5% CO₂ で RPMI 2.5% FCS (対照); RPMI 2.5% FCS および 10 μg/mL LPS (対照 + LPS); 100、250 および 500 μg/mL 試料 A (FRESH)、B (対照) および FER 867、FER 868、FER 869、FER 870 および FER 871 で処理した。未処理細胞 (対照) LPS (LPS) 10 μg/mL で処理した細胞値は、2 回実施した 2 回の実験の Mean ± SEM を示す。これらの結果は、抗炎症活性を示すものであり、本発明のプロセスで得られた発酵ビープレッドの顕著な抗炎症作用を強調するものである。
【発明を実施するための形態】

【0040】

本発明の一般的な態様によれば、花粉に基づく発酵物質に、Lactobacillus kunkelii 種の有利な乳酸菌の 1 つ以上の選択された株を接種して、ハチ巣のハチ巣の内部に貯蔵された花粉の性質で生じる発酵を実質的に再現する発酵を行う、ビープレッドに類似した発酵花粉の製造のための微生物学的方法が提供される。

【0041】

一般的態様によれば、本発明は、請求項 1 に記載の花粉末発酵プロセスに関する。

【0042】

本発明のプロセスのさらなる実施形態は、請求項 2 ~ 7 に定義されている。

【0043】

本発明者らは、本発明のプロセスで得られた発酵花粉が、新鮮な花粉に関しても、より長い有効期間と共に巣箱で自然発酵したビープレッドに関しても、より良い栄養学的特徴を有することを観察した。この特徴の組み合わせは、本発明の方法で得られた発酵花粉を、栄養的、食事または栄養補助的製品として特に適切にする。

【0044】

例として、本発明の方法で得られる発酵花粉中に存在する総遊離ポリフェノール含有量は、乾燥重量 kg 当たり 84.64 g 当量没食子酸に等しく、Markiewicz-Zukowska et al., 2013; Oltica et al., 2007; Zuluaga et al., 2015 によって文献に記載されているように、乾燥重量 kg 当たり 8.9 ~ 36.52 g 当量没食子酸に等しい天然発酵で得られるビープレッドについての文献に示された含有量よりもかなり高い量である。

【0045】

本明細書中に記載するプロセスの出発物質は、花粉に基づくか、またはそれからなる。適切な花粉は、新鮮なものであっても、除湿されていてもよい。後者は、工業的規模でプロセスを実施するのにより適している。

【0046】

適切な除湿花粉とは、例えば湿度のパーセンテージが 12% 以下になるように、採取後に熱気流で乾燥にさらされる花粉である。例えば、相対湿度が 0.5 を下回るような低い割合の水は、適切に包装され貯蔵されれば花粉を十分に安定な原料とする。

【0047】

典型的には、除湿された花粉は果粒の形態にあり、その色はミツバチが訪れる種または種々の植物種の機能である。

【0048】

一例として、適切な除湿された多植物相花粉は、以下の官能的特徴を有する：

- 外観：小さな粒で、起源の植物種によって色はさまざまである。
- におい：野菜、乾燥草。
- 味：乾燥花に特徴的な野菜で、干し草である。溶解性：水または有機溶媒に溶けにくい。
- 水分：7 ~ 15%
- グルシド：25 ~ 48%
- タンパク質：11 ~ 28%

10

20

30

40

50

- 脂質：1～14%
- 無機塩：1～5%

【0049】

本明細書に記載されているプロセス内で、典型的に顆粒または凝集粒子の形態で起こる除湿された花粉は、そのまま使用されてもよく、または、前に処理して顆粒の外殻を分解または破壊して、内部含有率を接種された微生物の発酵活性に利用できるようにすることができる。

【0050】

典型的にはセルロース、ペクチン物質、カロテノイドおよびポリフェノールを含む花粉粒のコーティング層を破壊するために、物理的処理、例えば、機械的処理または生物学的処理を使用することが可能である。

10

【0051】

適切な機械的処置には、花粉の粉碎、粉砕、微粉碎、高圧および/もしくは超音波または熱処理が含まれる。

【0052】

花粉粒の外壁部を分解するために、出発マトリックスまたは花粉の栄養学的特徴を実質的に改変しない、あるいはより栄養価の高い製品を得ることができるような、より小さな粒子または他の技術で、顆粒の断片化または寸法的減少を行うことが可能である。

【0053】

花粉粒の外層の分解は、そのサイズ縮小のための処理を含み、食品または製薬業界で伝統的に使用されている装置に頼ることができる。

20

【0054】

例えば、振動アーム顆粒剤のような適切なメッシュギャップを有する金属メッシュを通る花粉の通過を含む装置、またはナイフ、ボールベアリング等の種々のタイプのミルまたはこれらの装置の組合せを使用する装置を使用することができる。

【0055】

花粉粒のサイズ縮小または粉砕は、例えば、チョッパーおよびナイフを有する4方向ミキサー、流体媒体、超音波システムおよび他の市販の装置に浸漬したステータロータホモジナイザーを用いて、湿潤技術を用いて行うこともできる。

【0056】

加熱処理は、高圧処理（HPP）のような高圧の助けを借りて低温殺菌を可能にする周囲の圧力よりも高い状態または超音波処理または他のプロセスで任意に使用することもできる。

30

【0057】

例えば、圧力下での熱処理の場合、花粉を10%水中で簡便に再構成することができる。

【0058】

超音波治療の場合は、花粉をそのまま使用してもよい。

【0059】

また、水およびアルコールの混合物など、1つ以上の溶媒抽出段階をあらかじめ受けた昆虫好性花粉から得られた精製花粉抽出物を出発物質として用いることも可能である。

40

【0060】

いくつかの実施形態によれば、花粉の外被層は、例えば、花粉を酵母で処理することによって、生物学的分解によって壊される。

【0061】

したがって、本発明のいくつかの実施形態は、花粉粒を被うペクチン成分を分解または代謝する酵母の添加を提供する。典型的には、酵母の添加は、プロセスの工程a)前または中に行われ得る。

【0062】

添加された酵母は花粉粒と接触し、花粉の外被の崩壊の過程を引き起こし、その工程b)で穀粒内部に存在する栄養素と接種された乳酸菌との接触を容易にする。

50

【0063】

典型的には、酵母の添加は、出発花粉が処理されておらず、特に、穀粒の被覆層を破壊することを目的とした粉碎または粉碎などの機械的作用を受けていない場合に行われる。

【0064】

好ましい実施態様によれば、種 *Wickerhamomyces anomalus* または *Hanseniaspora uvarum* に属する花粉粒をコーティングするペクチン成分を分解または代謝する酵母は、2種の混合物である。

【0065】

1つの実施形態によれば、使用される酵母は、*Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B株である。

10

【0066】

本発明のプロセスの実施形態において、接種材料は、成長基質として花粉自体を用いて調製される。

【0067】

他の実施形態では、接種された微生物の成長基質は、フルクトース酵母ペプトン、FY Pedなどの適切な培養培地であり、任意に、酵母または野菜の抽出物およびペプトンを含み、これらは微生物に急速な成長に必要な栄養を提供する。

【0068】

あるいは、花粉と抽出物/ペプトンの混合物を使用することも可能である。

【0069】

本発明のプロセスの好ましい実施態様において、乳酸菌および酵母の接種材料は、別々に調製される。

20

【0070】

プロセスの発酵b)の工程は、*Lactobacillus* 属に典型的に属する乳酸菌、便宜的には *Lactobacillus kunkeei* 種を接種することによって行われる。

【0071】

好ましい実施態様によれば、工程a)は、*Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15およびPL13株ならびにそれらの混合物から選択される *Lactobacillus kunkeei* 種に属する乳酸菌の接種を含む。これらの選択された各細菌株は、*Lactobacillus kunkeei* 種にも属する他の乳酸桿菌よりも予想外に高い花粉ベースの基質上での成長およびコロニー形成の容量を有する。さらに、以下の実施例で報告された実験の部で立証されているように、前記3株は、抗菌性化合物を酸性化し、産生する驚くべき能力を有する。

30

【0072】

有利には、本発明の方法の発酵工程は、バイオリクター内で、典型的には好氣的条件下で実施される。

【0073】

いくつかの実施形態によると、バイオリクター内部の生成物の湿度は、全質量の30~95%の範囲である。

40

【0074】

典型的には、花粉を含む混合物および接種された微生物は、湿度値が低い場合、半固体の形態、例えば、30~45%であってよく、湿度値が高い場合、半固体または液体の形態、例えば、60~95%であってよい。

【0075】

いくつかの実施形態によると、発酵の工程b)の始めのバイオリクター内の環境のpHは、4~6の範囲にある。

【0076】

本発明の好ましい実施形態において、系のpHは5.25 +/- 0.25の間の値を有し、従来のpH補正器の追加によって前記範囲内で修正される可能性がある。

50

【0077】

一般的には、工程 b) 提供の間、以下の反応パラメータおよび条件をモニタリングする：

- 糖（グルコースおよびフルクトース）の量
- 全滴定酸性度
- pH
- 乳酸および酢酸
- 細胞密度

【0078】

所望の量の有機酸 / 細胞密度 / 遊離フェノール酸 / 残留糖 / 遊離アミノ酸が得られる場合、プロセスを中断することができる。

10

【0079】

本発明の方法の実施形態において、得られた発酵花粉は、微生物負荷を低減する工程 c) に供される。一実施態様によれば、得られた発酵花粉は、任意に工程 c) に供され、低温乾燥段階に供され、例えば、典型的にはライオスタットで低温乾燥される。あるいは、発酵した花粉は、 -40 以下の程度などの温度で、遠心分離後に便宜的に冷凍保存してもよい。

【0080】

本発明の別の実施態様において、発酵花粉は、微生物を生存させ、かつ生命を維持する目的で凍結乾燥される。代わりに、得られた発酵花粉またはバイオマスは、 0 より低い温度で、例えば -40 以下の程度で、典型的には遠心分離後に凍結保存してもよい。

20

【0081】

本発明の目的のために、発酵花粉から水を除去するために、例えば、スプレー乾燥に頼ることによって、他の従来技術を使用することもできる。

【0082】

1つの実施形態によれば、本発明のプロセスは、以下の工程を含む：

- 好ましくは -20 で保存された、または乾燥もしくは除湿された花粉に基づく新鮮な非前処理花粉に基づく出発物質の供給、 $+4$ または室温で便宜的に保存され、および / または粉碎、微粉碎、微粉化、熱処理、高圧、および / または超音波処理、または花粉抽出物により任意に前処理された；

- 蒸留水による任意の希釈および 5.25 ± 0.25 の値に達するまでの花粉 pH 値の補正；

30

- *L. kunkeei* PF12、PF15 および PL13 またはそれらの混合株から選択される乳酸菌を含む細胞懸濁液の接種、ならびに *Wickerhamomyces* 属または *Hanseniaspora uvarum* 種、例えば AN8Y27B 株に属するペクチン分解活性を有する酵母の接種；

- 最終湿度が $30 \sim 95\%$ に達するまで通常蒸留水を加える。典型的には、最終的な水分値には、例えば、約 21.56% に等しい花粉の初期の水分含有量および接種段階の間に加えられる水分も含まれる。

- 滅菌チューブまたはバイオリアクター中で好ましくは 30 で $24 \sim 216$ 時間インキュベートし、発酵花粉を単離した。

40

【0083】

いくつかの実施形態によると、上記のプロセスから得られた発酵花粉を、ライオスタット内で凍結乾燥するか、または、好ましくは遠心分離後に、約 -20 またはそれ以下の温度で凍結することができる。

【0084】

ある実施態様において、発酵花粉は、微生物負荷を減少させるため、水を除去するため、または発酵花粉を安定化させるための他の処理に供することができる。

【0085】

第2の態様によれば、本発明は、本明細書中に記載の実施形態のいずれか1つに記載のプロセスで得られるビープレッドまたは発酵花粉を提供する。本発明の方法で得られた発

50

酵花粉は、出芽花粉よりも高いレベルの遊離水溶性フェノール化合物を有する。これらおよびその他の機能については、以下の例で詳細に説明する。

【0086】

本発明の他の実施形態において、発酵の工程 b) に起因する可能性のある液体画分は、固体成分から分離され、食品、食事または栄養目的に使用される。

【0087】

液体分画と固体状画の両方が栄養学的使用を見つけるかもしれない。

【0088】

本発明の第3の態様によれば、栄養または栄養学的組成物は、本明細書に記載されている実施形態のいずれか1つおよび食用担体に従って得られる発酵花粉を含むことが提供される。

10

【0089】

第4の態様によれば、Lactobacillus kunkeei 株、Lactobacillus kunkeei PF12、PF15およびPL13株およびそれらの混合物、ならびに食用担体に属する乳酸菌を含む組成物が提供される。

【0090】

組成物の細菌株は、例えばタインダリゼーションによって、従来の技術に従って、生存および生存可能であるか、または不活化された形態であり得る。

【0091】

本明細書に記載される組成物は、経口投与に適している。

20

【0092】

経口投与用の組成物は、固体または液体の形態であり得る。固体形態の場合、それらは、生物学的活性成分および1つ以上の生理学的に許容可能な賦形剤として本明細書に記載されるプロセスから得られるビープレッドを含む。

【0093】

典型的な固体形態組成物は、錠剤、顆粒、カプセル、粉末、即時投与形態、キャンディー、チューインガム、異なる組成および形状のゼリー豆を含む。

【0094】

本発明は、本発明を投与するための食用担体となり得る任意の固体状、半固体状および液体剤形に適用される。

30

【0095】

本発明は、固体状、半固体または液体の形態であるように、投与前に製剤を希釈するかまたは使用する全ての剤形に適用される。

【0096】

錠剤は、一般に、植物抽出物が、典型的には乾燥形態で分散されている、適切な担体または賦形剤を含む。

【0097】

この場合、配合物に含有される適切な賦形剤は、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、およびそれらの混合物などのセルロース誘導体である。

40

【0098】

適切な賦形剤のさらなる例は、ラクタムファミリーに属するポリマー、例えば、ピロリドンおよびその誘導体、例えば、ポリビニルピロリドン、ポリビニルポリピロリドンおよびそれらの混合物、無機塩、例えば、カルシウムまたはリン酸二カルシウム、潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、トリアシルグリセロールおよびそれらの混合物を含む。

【0099】

液体形態の場合、組成物は、発酵の工程 b) の最後に分離された液体画分を、生物学的に活性な成分として、および1つ以上の生理学的に許容される賦形剤を含有する。

50

【0100】

液体形態の典型的な組成物は、溶液、エマルジョン、懸濁液、シロップを含む。

【0101】

本発明の組成物に含まれる本発明の方法で得られるビーブレッドまたは発酵花粉は、様々な量で存在し得、例えば、0.0001重量%~100重量%、0.001重量%~50重量%、0.1重量%~20重量%、典型的には0.5~5重量%の範囲に含まれ得る。

【0102】

特定の実施形態によれば、本発明の組成物は、ビタミン、ミネラル、微量栄養素および他の活性物質などの1つ以上の活性物質をさらに含む。

【0103】

いくつかの実施形態によると、経口投与のための組成物は、機能性食品、栄養補助食品組成物、食事生成物、補体または栄養生成物である。

【0104】

この組成物は、固体成分を含有するタイプの袋またはスティックパックの熱耐性アルミニウムの袋、または液体中の固体成分の分散体、液体中の固体の現代的再構成のための容器、食品グレードの油または他の適合性の液体中に分散された固体を含有する硬カプセルまたは軟カプセル、液体中の固体の分散体を含有するバイアルまたはボトルのような従来の剤形で市販され得る。

【0105】

いくつかの態様によると、本発明は、本明細書に記載されたプロセスの実施形態、または代謝、心血管、骨、脳または腸のマイクロバイオーム機能性の処理に使用するために、または腸のマイクロバイオーム機能性のドライバーとして使用するために含有する組成物のいずれか1つによって得られるビーブレッドに関する。

【0106】

他の態様によれば、本発明は、本明細書に記載の方法の実施形態のいずれか1つに従って得られた、またはそれを含有する組成物の、毛髪処理のための、特にアンチエイジング処理としての、または皮膚老化を低減するための、皮膚の経口摂取または美容的使用による処理のための、ビーブレッドの使用を提供する。

【0107】

本発明のプロセスで得られたビーブレッドは、細胞の抗酸化活性を有し、フリーラジカル、典型的には腫瘍、前癌性疾患または日焼け、皮膚のしみ、ざらつきまたは皮膚老化の結果のような発赤状態の非生理的製造を生じる疾患、典型的には腫瘍、前癌性疾患または日光性疾患または発赤状態を生じる疾患の予防または治療に使用される。さらに、本発明のビーブレッドは、生理学的健康状態における個々の生物を維持する際の用途を見出す。

【0108】

さらなる態様によれば、本発明は、PF12、PF15およびPL13から選択される *Lactobacillus kunkeei* 種に属する選択された乳酸菌、ならびにそれらの混合物を提供する。

【0109】

本発明者らは、*Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15、およびPL13株を、同種に属する他の株と比較して、以下の表1に示す成長、酸性化の驚くほど改善された能力について、以下の表2および表3に示す抗菌性化合物の製造のために選択した。

【0110】

例として、*Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15、およびPL13細菌株の選択のために使用されるプロトコルを以下に記載する。以下の実施例1でより詳細に記載されるプロトコルは、花、花粉、ビーブレッド、および八子の胃腸管から単離された細菌株を試験することを含む。

【0111】

同定した菌株の成長、酸性化および抗菌性化合物の産生能を試験した。

10

20

30

40

50

【0112】

細菌成長のモデル系として水性花粉エキスをを用いた。花粉エキスは以下の手順で得た。

【0113】

100グラムの花粉をガラスビーズと共に添加し、1リットルの蒸留水と混合し、500rpmで2時間攪拌した。混合物を、10,000×gで20分間遠心分離した。上清を採取し、残留物をさらに、上記のように酸性化メタノール(0.1% HCl、v/v) 1リットル、ヘキサン/アセトン/エタノールの混合物50:25:25(v/v/v)、および沸騰水でそれぞれ連続的に抽出した。全ての抽出物を乾燥し、10mlのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、一緒に混合し、さらに蒸留水中で希釈して、1リットルの最終体積とした。花粉抽出物は、0.22μmの空隙率の膜上で滅菌ろ過して滅菌した。菌株を約7.0 log CFU/mlの最終細胞密度で個別に接種し、花粉抽出物を30℃で24時間インキュベートした。成長および酸性化をモニタリングし、菌株の成長および酸性化動態を、Gompertz方程式を用いて数学的にモデル化した。菌株の抗菌活性を、8種類の悪化または病原性指標細菌および8種類の指標真菌に対して試験した。菌株の抗菌活性を試験するために、乳酸菌を30℃で24時間花粉抽出物中で増殖させ、上清を4℃で10分間10000×gで遠心分離して回収し、0.22μmの空隙率の膜上で滅菌ろ過して滅菌した。抗細菌活性は、寒天拡散ウェルによりアッセイし、一方抗真菌活性は、寒天希釈アッセイによりアッセイした。

10

【0114】

以下の表1は、様々な種に属し、花、花粉、ピーブレードおよびミツバチの消化管から分離した乳酸菌株を用いて30℃で24時間発酵させた花粉抽出物におけるpH変化量(pH)として表した、光学密度、DO₆₂₀および酸性化として表した細胞密度のデータを示す。

20

【0115】

30

40

50

【表 1 (1)】

表 1.

菌株	DO ₆₂₀	ΔpH
<i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12	2.102	1.05
<i>L. kunkeei</i> PF18	2.030	0.83
<i>L. kunkeei</i> PF16	1.993	0.94
<i>L. kunkeei</i> PLA21	1.890	0.71
<i>L. kunkeei</i> PL13	1.882	1.03
<i>L. kunkeei</i> PL9	1.863	0.66
<i>L. kunkeei</i> PL28	1.763	0.97
<i>L. kunkeei</i> PF15	1.762	0.69
<i>L. kunkeei</i> BIII60	1.758	0.78
<i>L. kunkeei</i> B17	1.758	0.79
<i>L. kunkeei</i> BV61	1.734	0.95
<i>L. kunkeei</i> PL24	1.682	0.61
<i>L. kunkeei</i> PLA14	1.636	0.63
<i>L. kunkeei</i> PL15	1.621	0.80
<i>L. kunkeei</i> PFA7	1.601	0.77
<i>L. kunkeei</i> PL33	1.597	0.81
<i>L. kunkeei</i> PF6	1.551	0.63
<i>L. kunkeei</i> PFA3	1.517	0.70
<i>L. kunkeei</i> PL3	1.475	0.75
<i>L. kunkeei</i> PLA6	1.473	0.79
<i>F. fructosus</i> B4	1.426	0.88
<i>L. kunkeei</i> PL31	1.419	0.62
<i>L. kunkeei</i> PFA2	1.412	0.70
<i>L. kunkeei</i> PLA13	1.402	0.58
<i>L. kunkeei</i> PFB7	1.340	0.83
<i>L. kunkeei</i> PL27	1.327	0.71
<i>Lactobacillus plantarum</i> PLB16	1.228	0.55
<i>L. kunkeei</i> PF7	1.222	0.69
<i>L. plantarum</i> PLB15	1.123	0.55

10

20

30

40

50

【表 1 (2)】

菌株	DO ₆₂₀	ΔpH
<i>L. kunkeei</i> B4I	1.105	0.68
<i>L. kunkeei</i> PLA16	0.921	0.48
<i>L. kunkeei</i> PFA15	0.918	0.63
<i>L. kunkeei</i> PLB30	0.892	0.59
<i>L. plantarum</i> PLB1	0.822	0.43
<i>L. kunkeei</i> PFA5	0.801	0.57
<i>L. kunkeei</i> PFA35	0.781	0.42
<i>Fructobacillus fructosus</i> MBIII5	0.686	0.22
<i>L. kunkeei</i> B7	0.678	0.40
<i>L. kunkeei</i> BV114	0.672	0.28
<i>L. kunkeei</i> PLA8	0.640	0.42
<i>L. kunkeei</i> PFB13	0.581	0.47
<i>L. kunkeei</i> B23I	0.538	0.28
<i>L. kunkeei</i> BV152	0.426	0.24
<i>L. kunkeei</i> PFA4	0.421	0.43
<i>L. kunkeei</i> BV20	0.349	0.13
<i>F. fructosus</i> PFB34	0.342	0.34
<i>F. fructosus</i> PFA34	0.324	0.22
<i>L. kunkeei</i> PFA12	0.308	0.28
<i>F. fructosus</i> PFB29	0.305	0.27
<i>L. kunkeei</i> PLA9	0.303	0.12
<i>F. fructosus</i> B5	0.300	0.26
<i>L. kunkeei</i> BIII59	0.296	0.27
<i>F. fructosus</i> PL22	0.285	0.10
<i>F. fructosus</i> B1	0.243	0.06
<i>F. fructosus</i> PFA25	0.231	0.17
<i>F. fructosus</i> PFA18	0.228	0.19
<i>L. kunkeei</i> PFA9	0.224	0.18
<i>L. kunkeei</i> PLB20	0.223	0.14
<i>L. kunkeei</i> PLB18	0.223	0.14

10

20

30

40

50

【表 1 (3)】

菌株	DO ₆₂₀	ΔpH
<i>L. kunkeei</i> PL20	0.182	0.14
<i>L. kunkeei</i> PLB12	0.174	0.19
<i>L. kunkeei</i> PLA24	0.169	0.13
<i>F. fructosus</i> PFA23	0.135	0.15
<i>F. fructosus</i> PL17	0.133	0.04
<i>L. kunkeei</i> PFB3	0.123	0.11
<i>F. fructosus</i> PLA1	0.121	0.09
<i>L. kunkeei</i> PF10	0.112	0.06
<i>Lactobacillus curvatus</i> PFB10	0.112	0.16
<i>L. kunkeei</i> PLB17	0.112	0.12
<i>L. kunkeei</i> PF29	0.110	0.14
<i>Lactococcus lactis</i> PFB12	0.110	0.16
<i>L. curvatus</i> PFB19	0.109	0.10
<i>L. kunkeei</i> PF5	0.108	0.03
<i>F. fructosus</i> MBIII2	0.108	0.27
<i>L. kunkeei</i> PLB29	0.104	0.06
<i>L. kunkeei</i> PL12	0.099	0.16
<i>F. fructosus</i> PL10	0.097	0.11
<i>F. fructosus</i> PLB6	0.096	0.11
<i>F. fructosus</i> PL25	0.086	0.02
<i>L. curvatus</i> PL34	0.085	0.10
<i>Leuconostoc citreum</i> PFB11	0.084	0.08
<i>L. curvatus</i> PL32	0.082	0.08
<i>F. fructosus</i> PFB26	0.082	0.13
<i>L. curvatus</i> PLB7	0.080	0.03
<i>L. kunkeei</i> BV117	0.080	0.03
<i>F. fructosus</i> PL21	0.078	0.09
<i>L. lactis</i> EF70	0.075	0.06
<i>L. curvatus</i> PFB30	0.073	0.05
<i>L. curvatus</i> PFB8	0.073	0.04

10

20

30

40

【表 1 (4)】

菌株	DO ₆₂₀	ΔpH
<i>L. lactis</i> EF67	0.069	0.04
<i>L. lactis</i> PFB15	0.052	0.04
<i>L. kunkeei</i> PLB34	0.046	0.07
<i>L. kunkeei</i> PF1	0.044	0.09

50

【 0 1 1 6 】

実験データからわかるように、選択した *Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15、および PL13 株は、同じ細菌種に属する、試験した他の株で認められたものよりも驚くほど高い成長能、酸性化能を有する。

【 0 1 1 7 】

以下の表 2 は、30 で 24 時間乳酸菌株で発酵させた花粉抽出物の阻害スペクトル*を示す。病原性または悪化指標菌 † 8 株に対する抗菌力を検討した。対照として未発酵花粉エキスをを用いた。

【 0 1 1 8 】

【表 2 (1) 】

表 2.

	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	大腸菌 DSM 30083	<i>Bacillus megaterium</i> F6	<i>Pantoea agglomerans</i> DTB8	<i>Escherichia hermannii</i> PS2	<i>Serratia marcescens</i> DR8	<i>Serratia marcescens</i> DR10
未発酵花粉抽出物	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12	+	+++	+++	++++	++	+++	++	+++
<i>L. kunkeei</i> PF16	+	++	++	+++	++++	+++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PL13	+	++	++	++++	+++	+++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PL28	-	++	++	++++	++++	+++	++	-
<i>L. kunkeei</i> BV61	-	++	++	++++	++	-	++	-
<i>L. kunkeei</i> PF18	-	+	++	++++	-	-	++	+++
<i>L. kunkeei</i> B17	+	++	++	++++	++++	+	++	-
<i>L. kunkeei</i> BIII60	-	+	++	++++	+	+	++	-
<i>L. kunkeei</i> PF15	+	++	+++	++++	++++	+	+++	+++
<i>L. kunkeei</i> PL9	-	+	++	++++	-	-	++	+++
<i>L. kunkeei</i> PLA21	-	+	+++	++++	+++	-	++	+++
<i>F. fructosus</i> B4	-	+	++	++++	++	+++	++	+++
<i>L. kunkeei</i> PFB7	+	++	++	++++	+++	+++	++	-
<i>L. kunkeei</i> PL27	-	+	+	++++	++	+	+	++
<i>L. kunkeei</i> PFA2	-	++	++	++++	++	-	+	++
<i>L. kunkeei</i> PFA3	-	+++	++	+++	++++	-	++	+++
<i>L. kunkeei</i> PL3	-	+	+	++++	++	+	+	++
<i>L. kunkeei</i> PLA6	+	++	+++	++++	+	-	++	+++
<i>L. kunkeei</i> PL33	-	+	+	++++	+++	-	+++	-
<i>L. kunkeei</i> PL15	-	+	+	++++	++	+	+	++
<i>L. kunkeei</i> PFA7	-	+++	++	++++	+++	-	+	++
<i>L. kunkeei</i> PL24	-	+	++	++++	+	++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PLA14	+	+++	+	++++	++	++	+	-
<i>L. kunkeei</i> PF6	-	+	++	+++	+	+	+	-
<i>L. kunkeei</i> PL31	+	+++	+	++++	++	++	+	-
<i>L. kunkeei</i> PLA13	-	++	++	++++	++	++	++	-

10

20

30

40

50

【表 2 (2)】

	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	大腸菌 DSM 30083	<i>Bacillus megaterium</i> F6	<i>Pantoea agglomerans</i> DTB8	<i>Escherichia hermannii</i> PS2	<i>Serratia marcescens</i> DR8	<i>Serratia marcescens</i> DR10
<i>Lactobacillus plantarum</i> PLB16	-	+	++	++++	+	+	-	-
<i>L. plantarum</i> PLB15	-	+	++	+++	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i> B41	+	+	+	++++	+	-	+	-
<i>L. kunkeei</i> PF7	-	++	+++	++++	++++	+++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PFA15	-	+	++	++++	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLB30	+	+++	+	+++++	++	++	+	-
<i>L. kunkeei</i> PFA5	-	++	++	+++++	++	++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PLA16	+	+	+	++++	+	-	+	-
<i>L. plantarum</i> PLB1	-	+	+	++++	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA35	+	+++	+++	+++++	++	+	++	-
<i>L. kunkeei</i> B7	-	++	++	+++++	++++	++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PLA8	-	+	++	+++++	+	++++	++	-
<i>L. kunkeei</i> PFB13	-	++	++	+++++	++++	++	++	++
<i>L. kunkeei</i> PFA4	-	++	++	+++	+++	++	++	++

*抗菌活性は、以下のように評価した：-：阻害なし、+：直径 1mm 未満の阻害ハロー、++:直径 1~2.5mm の阻害ハロー、+++:直径 2.5~4.0mm の阻害ハロー、++++:直径 4.0~6mm の阻害ハロー、+++++:直径 6mm 超の阻害ハローと評価した。

*成長条件: *Staphylococcus aureus* DSM 20231、トリプチカーゼ大豆酵母エキス培地を 37°C、*Listeria monocytogenes* ATCC 19115、脳心臓注入培地を 37°C、大腸菌 DSM 30083、Luria-Bertani プロスを 37°C、*Bacillus megaterium* F6、Luria-Bertani プロスを 30°C、*Pantoea agglomerans* DTB8、栄養素プロスを 30°C、*Escherichia hermannii* PS2、栄養素プロスを 30°C、*Serratia marcescens* DR8、栄養素プロスを 30°Cとした。

【 0 1 1 9 】

以下の表 3 は、30 で 24 時間乳酸菌で発酵させた花粉抽出物の阻害スペクトル*を示したものである。指標菌 † 8 株に対する抗真菌活性を検討した。未発酵花粉抽出物を添加したジャガイモデキストロス寒天 (P D A) 上での指標菌株の成長に関して、菌系成長の阻害のパーセンテージを計算した。

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 (1)】

表 3.

	<i>Aspergillus versicolor</i> CBS 117286	<i>Aspergillus niger</i> DPPMAF3	<i>Penicillium roqueforti</i> DPPMA1	<i>Penicillium polonicum</i> CBS 112490	<i>Penicillium albocoremium</i> CBS 109582	<i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 971.97	<i>Penicillium paneum</i> CBS 101032	<i>Penicillium bialowiezense</i> CBS 110102
<i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12	+++	++	++	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF16	+++	-	-	-	++	+	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL13	+++	-	-	+	++	++	++	-
<i>L. kunkeei</i> PL28	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> BV61	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF18	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> B17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> BIII60	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA21	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. fructosus</i> B4	-	-	++	-	-	++	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFB7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL27	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA2	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA3	-	-	++	-	-	-	-	+
<i>L. kunkeei</i> PL3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL33	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL24	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA14	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF6	-	++	+	-	-	++	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL31	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA13	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> PLB16	-	-	+	-	++	-	-	-
<i>L. plantarum</i> PLB15	-	-	-	-	-	-	-	-

10

20

30

40

50

【表 3 (2)】

	<i>Aspergillus versicolor</i> CBS 117286	<i>Aspergillus niger</i> DPPMAF3	<i>Penicillium roqueforti</i> DPPMA1	<i>Penicillium polonicum</i> CBS 112490	<i>Penicillium albocoremium</i> CBS 109582	<i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 971.97	<i>Penicillium paneum</i> CBS 101032	<i>Penicillium bialowiezense</i> CBS 110102
<i>L. kunkeei</i> B4I	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLB30	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA16	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> PLB1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA35	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> B7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA8	-	-	+	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFB13	++	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA4	-	-	+	-	-	-	-	-

*抗真菌活性は、以下のように評価した：-：阻害なし、+：菌糸体の半径方向成長の阻害25%未満、++：菌糸体の半径方向成長の阻害25～50%、+++：菌糸体の半径方向成長の阻害50～75%、++++：菌糸体の半径方向成長の阻害75%超。

‡成長条件：ジャガイモデキストロースカンテン25℃、8日間。

【0121】

表2および3の実験データは、さらに、選択された*Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15、およびPL13株が、同じまたは他の細菌種に属する、試験された他の株について見出されたものよりも驚くほど高い抗菌活性を有することを強調する。

【0122】

用語

本文脈において、花粉という用語は、ミツバチを採餌して集め、それらによって処理される昆虫好性花粉を意味する；前記花粉は、単一の植物種（単相）またはいくつかの植物種（多相）から来ることがある。

【0123】

機能性食品とは、その中に含まれる従来の栄養素に加えて、問題または生理学的状態に対して便益または保護を提供し得るあらゆる改変食品または食品成分を意味する。

【0124】

「栄養補助食品」とは、食用物質から単離または精製された生成物をいう。栄養補助食品とは、それが生理学的利益を有するか、またはそれが問題または生理学的障害に対する保護を提供することが示された場合である。

【0125】

栄養補助食品とは、ビタミン、ミネラル、植物抽出物、アミノ酸、代謝産物、抽出物、

濃縮物またはこれらの成分の混合物を含む製品を意味する。

【0126】

「食用担体」という用語は、食品、栄養補助食品または食事 / 食品サプリメントの調合において使用され得るあらゆる食用担体を意味する。

【0127】

本記載の範囲内で、本発明の方法で得られたビーブレッドおよび発酵花粉という用語は、同一の生成物を表示し、互換可能である。

【0128】

従来技術専用の前章に記載された伝統的なビーブレッドの官能特性および / または栄養特性は、本発明の方法で得られた発酵花粉のものと実質的に類似している。

10

【0129】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態のみの例示的な目的のために提供される。

【実施例】

【0130】

実施例 1

Lactobacillus kunkeei PF12、PF15およびPL13の細菌株の選択に関するプロトコル

乳酸スターター細菌の3細菌株を選択するために、種々の種に属し、花、花粉、ビーブレッドおよびミツバチの胃腸管から分離した93細菌株について、その成長、酸性化および抗細菌性化合物産生能を試験した。

20

【0131】

細菌成長のモデル系として花粉抽出物を用いた。花粉抽出物は以下のように得られた。

【0132】

100グラムの花粉をガラスビーズと共に添加し、1リットルの蒸留水と混合し、500rpmで2時間撹拌した。混合物を、10000×gで20分間遠心分離した。上清を採取し、残留物をさらに、それぞれ上記のように酸性化メタノール(0.1% HCl、v/v)1リットル、ヘキサン/アセトン/エタノール混合物50:25:25(v/v/v)、沸騰水で連続的に抽出した。全ての抽出物を乾燥し、10mlのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、一緒に混合し、さらに蒸留水中で希釈して、1リットルの最終体積とした。花粉抽出物は、0.22μmの空隙率の膜上で滅菌ろ過して滅菌した。菌株を約7.0 log CFU/mlの最終細胞密度で個別に接種し、花粉抽出物を30で24時間インキュベートした。成長および酸性化をモニタリングし、菌株の成長および酸性化動態を、Gompertz方程式を用いて数学的にモデル化した。菌株の抗菌活性を、8種類の悪化または病原性指標細菌および8種類の指標真菌に対して試験した。菌株の抗菌活性を試験するために、乳酸菌を30で24時間花粉抽出物中で成長させ、上清を4で10分間10000×gで遠心分離して回収し、0.22μmの空隙率の膜上で滅菌ろ過して滅菌した。抗細菌活性は寒天拡散ウェルによりアッセイし、一方抗真菌活性は寒天希釈アッセイによりアッセイした。

30

【0133】

L. kunkeei PF12、PF15、PL13株は、成長能、酸性化能(上記表1)および抗菌化合物の産生能(上記表2、3)が良好であったため選択した。

40

【0134】

実施例 2

乳酸菌を用いた花粉抽出物の発酵

実施例1に記載のプロトコルに従って得られた花粉抽出物を、93の乳酸菌の成長のためのモデル系として使用し、その成長および酸性化の能力を試験した。菌株を、30で24時間、FYPブロス(蒸留水1L当たりD-フルクトース10g、酵母抽出物10g、ポリペプトン*5g、酢酸ナトリウム2g、Tween 80 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、MnSO₄·4H₂O 0.01g、FeSO₄·7H₂O 0.01g、NaCl 0.01g [pH 6.8])で成長させた。遠心分離(4で10分間10

50

000 × g) により細胞を回収し、50 mMリン酸緩衝液 pH 7.0 で2回洗浄し、花粉抽出液中に約 7 Log CFU/ml の最終密度まで懸濁した。その後、花粉抽出物を、30 で24時間インキュベートした。成長(光学密度、 DO_{620})と酸性化(pH変化、pH)を、インキュベーション中にモニタリングした。

【0135】

結果

種々の種に属する93の乳酸菌株について、花粉抽出物中の成長能および酸性化能を試験した(表1)。細胞密度の最高値($DO_{620} \text{ } 1.473 \sim 2.102$)および最も高い酸性化能力は、種 *Lactobacillus kunkeei* に属する株で発酵した花粉抽出物において見出された(表1)。

10

【0136】

実施例3

選択した乳酸菌株で発酵した花粉抽出物の抗微生物活性

花粉発酵中の乳酸菌の抗菌性化合物産生能を試験するために、細菌を、実施例1に記載したように花粉抽出物中で成長させ、遠心分離(4 で10分間10000 × g)により上清を回収し、0.22 μmの空隙率の膜上で滅菌ろ過により滅菌した。抽出物の抗細菌活性を、寒天ウェルからの拡散アッセイによりアッセイした。分析は、指標菌株の成長のための寒天-水15 ml(2%寒天、w/v)および特定寒天培地5 mlからなる2層で行い(表2)、至適成長温度で24時間インキュベートした指標菌株の培養から回収した細胞を細胞密度約 4 Log CFU/ml まで接種した。ウェル(直径5 mm)を二重層にし、各ウェルに発酵および無細胞花粉抽出物100 μlを添加した。対照として未発酵花粉抽出物を用いた。プレートは、花粉抽出物の放射状拡散を可能にするために4 で1時間保存し、30または37 で24時間インキュベートした。抽出物の抗真菌活性を、寒天希釈アッセイによりアッセイし、指標として用いた真菌菌糸体の半径方向成長速度を評価した(表3)。発酵および無細胞花粉抽出物を、30%(v/v)の濃度で成長培地(ジャガイモデキストロース寒天、PDA)に加え、培地15 mlをペトリ皿(直径90 mm)に注いだ。対照プレートは、花粉抽出物を添加せずにPDAのみを含んでいた。アッセイは、培養培地を含むペトリ皿の中央に直径3 mmの菌糸体キャップを置くことによって行った。好気条件で25 で8日間インキュベートした後、菌糸体(直径mm)の半径方向成長を測定した。成長阻害パーセンテージは、以下のように計算される： $[(\text{対照における菌糸体の成長} - \text{花粉抽出物の存在下における菌糸体の成長}) / \text{対照における菌糸体の成長}] \times 100$ 。その結果は、少なくとも4回の菌糸成長の測定値の平均として表される。

20

30

【0137】

結果

発酵花粉抽出物は、高い抗菌活性および抗真菌活性を有し、未発酵花粉抽出物よりも有意に高かった($P < 0.05$)(表2および3)。混合スターターの形態で *L. kunkeei* PF12、PF15およびPL13株を使用することで、最も広い阻害スペクトルが確保される。

【0138】

実施例4

Lactobacillus kunkeei PF12、PF15、PL13の培養物の調製および接種のプロトコル

1) FYPブロス中で *L. kunkeei* PF12、PF15およびPL13株(D-フルクトース10 g、酵母抽出物10 g、ポリペプトン*5 g、酢酸ナトリウム2 g、Tween 80 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g、蒸留水[pH6.8]1リットル当たり0.01 gのNaCl)を30 で24時間成長させる。

2) 各培養ブロスを10000 × gで10分間、4 で遠心分離する。

3) 上清を除去し、細胞を生理的溶液(9 g/lのNaCl)に再懸濁する。

40

50

- 4) 各細胞懸濁液を $10000 \times g$ で $4^\circ C$ で10分間遠心分離する。
 - 5) 上清を除去し、細胞を生理的溶液 ($9 g/l$ の $NaCl$) に再懸濁する。
 - 6) 各セル懸濁液を $10000 \times g$ で $4^\circ C$ で10分間遠心分離する。
 - 7) 上清を除去し、細胞を生理的溶液 ($9 g/l$ の $NaCl$) に再懸濁する。
 - 8) 各セル懸濁液を、光学密度 0.25 に相当する 9 Log CFU/ml の細胞密度になるように、細胞懸濁液 $100 \mu l$ および水 $900 \mu l$ を含むキュベット上の波長 620 nm における分光光度計で読み取る。
 - 9) 8 Log CFU/g に相当する最終接種材料を得るために、各株の細胞懸濁液を $1:10$ の比率で花粉に加える (あらかじめ解凍して室温に持ち込んだ)。
- * ポリペプトンは、他のタンパク質加水分解物 (例えば、ペプトン、肉抽出物、トリプトン) と置き換えてもよい。

10

【0139】

実施例 5

Wickerhamomyces anomalus または Hanseniaspora uvarum AN8Y27B または Wickerhamomyces 属もしくは Hanseniaspora 属に属する他の酵母の培養物の調製および接種のプロトコル:

- 1) Wickerhamomyces anomalus または Hanseniaspora uvarum AN8Y27B、または Wickerhamomyces もしくは Hanseniaspora 属に属する別の酵母を酵母抽出物ペプトンデキストロースブロス (YPD, Oxoid) 中で $30^\circ C$ で $48 \sim 72$ 時間成長させる。
- 2) 培養ブロスを $10000 \times g$ で10分間、 $4^\circ C$ で遠心分離する。
- 3) 上清を除去し、細胞を生理的溶液 ($9 g/l$ の $NaCl$) に再懸濁する。
- 4) 細胞懸濁液を $10,000 \times g$ で $4^\circ C$ で10分間遠心分離する。
- 5) 上清を除去し、細胞を生理的溶液 ($9 g/l$ の $NaCl$) に再懸濁する。
- 6) 細胞懸濁液を $10000 \times g$ で $4^\circ C$ で10分間遠心分離する。
- 7) 上清を除去し、細胞を生理的溶液 ($9 g/l$ の $NaCl$) に再懸濁する。
- 8) 細胞懸濁液を、光学密度 0.1 に相当する 7 Log CFU/ml の細胞密度になるように、細胞懸濁液 $100 \mu l$ および水 $900 \mu l$ を含むキュベット上の波長 600 nm における分光光度計で読取する。
- 9) 細胞懸濁液を $10000 \times g$ で $4^\circ C$ で10分間遠心分離し、上清を除去し、細胞を最初の体積より 100 倍低い体積に再懸濁する
- 10) 8 Log CFU/g に相当する最終接種材料を得るために、 $1:10$ の割合で株の細胞懸濁液を花粉 (以前に解凍して室温に持ち込んだもの) に加える。

20

30

【0140】

実施例 6

Lactobacillus kunkeei PF12、PF15、および PL13 の培養物の調製および接種のプロトコル

- 1) L. kunkeei PF12、PF15 および PL13 を FYF ブロス (蒸留水 [$pH 6.8$] $1 L$ 当たり D -フルクトース $10 g$ 、酵母抽出物 $10 g$ 、ポリペプトン* $5 g$ 、酢酸ナトリウム $2 g$ 、Tween 80 $0.5 g$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0.2 g$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ $0.01 g$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $0.01 g$ 、 $0.01 g$ の $NaCl$) 中で、前接種材料の調製のために $30^\circ C$ 、 24 時間成長させる。
- 2) 顆粒中の乾燥花粉で調製し、 $+4^\circ C$ で保存した成長培地中の各株の前接種材料の培養を 10% ずつ移し、顆粒の外被層を少なくとも部分的に破壊するためにミルまたは顆粒剤で前処理し、 $10 \sim 20\%$ の濃度 (重量/重量) で滅菌脱塩水中に再懸濁し、 pH 値 5.25 ± 0.25 にし、 $30^\circ C$ で 24 時間インキュベートする。
- 3) $7 \sim 8 \text{ Log CFU/g}$ に相当する最終接種材料を得るように、バイオリアクター内で各菌株の培養物を $1:10$ の比率で接種する。成長培地は、花粉を顆粒中で乾燥させて調製し、 $+4^\circ C$ で保存し、ポイント 1 に記載されるように顆粒の外壁部を弱めるために前処理し、 $10 \sim 20\%$ の濃度まで滅菌脱塩水中に再懸濁させる。

40

50

* ポリペプトンは、他のタンパク質加水分解物（例えば、細菌学的ペプトン、肉抽出物、トリプトン）と置き換えてもよい。

【0141】

実施例7

選択した株 *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 および PL13 ならびに酵母 *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B から構成される混合スターターを用いた新鮮花粉の発酵

1) 原材料：未処理の新鮮花粉で -20℃ 保存

2) 10^8 CFU/g の細胞密度で接種した *L. kunkeei* PF12、PF15 および PL13、ならびに *H. uvarum* AN8Y27B から構成される混合スターターの接種。*L. kunkeei* PF12、PF15、および PL13、ならびに *H. uvarum* AN8Y27B の培養物の調製および接種のプロトコルを、実施例4および5に記載する。

3) 最終湿度が40%になるまで蒸留水を加える（最終湿度値には、花粉の初期水分量 [約21.56%] および接種ステップ中に加えた水分も含まなければならない）。

4) 50ml 滅菌チューブで30℃で216時間インキュベートする。

【0142】

結果

Lactobacillus kunkeei PF12、PL13 および PF15、ならびに *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B の選択された株から構成される混合スターターの密度 8 Log CFU/g に接種し、最終的な花粉湿度40%で30℃で216時間インキュベートすることを含む、新鮮花粉の発酵プロトコルを定義した。FYP 寒天培地でのプレート計数および滴定酸性度 (TTA) の測定により、インキュベーション中の乳酸菌の成長および酸性化を、発酵中にモニタリングした (図1)。TTA 乳酸菌の細胞密度を、混合スターター接種を除いて同じ条件で処理した、非接種花粉 (対照) の自然発酵中にモニターした (図1)。TTA 乳酸菌の細胞密度は、混合スターター接種を除いて同じ条件で処理された、接種されていない花粉 (対照) の自発的な発酵中にモニタリングされた (図1)。選択した混合スターターを添加すると、花粉中の乳酸菌の細胞密度は、96時間後に約 9 Log CFU g^{-1} に達し、144時間まで一定に保たれ、残りのインキュベーション時間中約 7 Log CFU g^{-1} に減少した。そうでなければ、花粉の自発的な発酵中に、乳酸菌は120時間後にのみ約 9 Log CFU g^{-1} の密度に達し、残りのインキュベーション時間中に急速に 4 Log CFU g^{-1} に低下した。発酵中のTTAの増加は、乳酸菌の成長と一致した。花粉の自発的な発酵中、酸性化は、選択した混合スターターで行った発酵に比べて遅く、強度も低かった ($P < 0.05$)。

【0143】

実施例8

花粉発酵プロトコル

1) 原料：前処理しておらず、-20℃で保存した、または+4℃もしくは室温で保存した乾燥もしくは除湿し、 5.25 ± 0.25 の値に達するまで花粉のpH値を粉砕および補正して前処理した新鮮な花粉、

2) 10^7 CFU/g の細胞密度で、選択した乳酸菌 *L. kunkeei* PF12、PF15 および PL13、ならびに酵母 *Wickerhamomyces anomalus* から構成される混合スターターの接種。

3) 最終湿度70%まで蒸留水を加える。

4) 滅菌試験管またはバイオリアクター中で30℃で60時間インキュベートする。

【0144】

発酵花粉は、ライオスタットで凍結乾燥する。

【0145】

実施例9

機械的前処理による酵母接種なしで選択した *Lactobacillus kunkeei* PF 12 株、PF 15 株および PL 13 株を用いたバイオリクターにおける花粉発酵プロトコル

- 1) 原料：顆粒中で乾燥し + 4 で保存した花粉で、ミルまたは顆粒剤中で機械的に前処理し、滅菌脱塩水中でバイオリクター内に再懸濁した顆粒の外壁部を破壊して、最終容量 5 L に至る濃度 10 ~ 20 % (重量 / 重量) になるようにする
- 2) 5 . 25 + / - 0 . 25 の間の値に達するまでの pH 値の補正。
- 3) $10^7 \sim 10^8$ CFU / g の細胞密度での *L. kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 で構成されたスターターの接種。 *L. kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 の培養物の調製および接種のためのプロトコルは、以下の実施例 6 に記載される。
- 4) 30 で 2 ~ 4 日間、70 ~ 100 rpm で攪拌しながらインキュベートし、発酵培地を均質に保つ。
- 5) 発酵花粉をライオスタットで凍結乾燥する (9 A) か、またはスプレー乾燥して乾燥させる (9 B)。

【 0 1 4 6 】

実施例 10

熱前処理による酵母接種なしで選択した *Lactobacillus kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 株を用いたバイオリクターにおける花粉発酵プロトコル

- 1) 原料：顆粒中の除湿花粉、熱前処理 (121、15') したものをバイオリクター内で滅菌脱塩水中に 10 ~ 20 % の濃度 (重量 / 重量) で再懸濁し、最終容量 5 L とした。
- 2) 5 . 25 + / - 0 . 25 の間の値に達するまでの pH 値の補正。
- 3) $10^7 \sim 10^8$ CFU / g の細胞密度での *L. kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 で構成されたスターターの接種。 *L. kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 の培養物の調製および接種のためのプロトコルは、以下の実施例 6 に記載される。
- 4) 30 で 2 ~ 4 日間、70 ~ 100 rpm で攪拌しながらインキュベートし、発酵培地を均質に保つ。
- 5) 発酵花粉をライオスタットで凍結乾燥する (10 A) か、またはスプレー乾燥して乾燥させる (10 B)。

L. kunkeei PF 12、PF 15、PL 13 で構成されたスターターの接種。 *L. kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 の培養物の調製および接種のためのプロトコルは、以下の実施例 6 に記載される。

30 で 2 ~ 4 日間、70 ~ 100 rpm で攪拌しながらインキュベートし、発酵培地を均質に保つ。

発酵花粉をライオスタット (10 A) で凍結乾燥するか、噴霧乾燥 (10 B) して乾燥させる。

【 0 1 4 7 】

実施例 11

選択株 *Lactobacillus kunkeei* PF 12、PF 15 および PL 13 ならびに酵母 *Hanseniaspora uvarum* AN 8 Y 27 B から構成される混合スターターを用いた発酵花粉の栄養強化

実施例 7 に記載されたプロトコルに従って得られた発酵花粉を、化学的および栄養学的観点から特性評価した。花粉中の単一、全および遊離アミノ酸含有量は、カチオン交換カラムを装備した Biochrom 30 Amino Acid Analyzer (Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, England) により測定した (図 2)。in vitro 消化をシミュレートする多相プロトコルを用いて、花粉タンパク質の消化性を推定した (図 3)。さらに、Superose 12 10 / 300 GL カラムおよび 214 nm UV 検出器を搭載した AEKTA FPLC システムを用いて、花粉のペプチドプロファイルを解析した (図 3)。Folin

10

20

30

40

50

- Ciocalteu法(図4)により、水およびメタノールに可溶である有利フェノール化合物中の含有量を測定した。

【0148】

結果

Lactobacillus kunkeei PF12、PL13およびPF15、ならびにHanseniaspora uvarum AN8Y27B(図2)およびペプチド(図3)からなる混合スターターを用いた発酵花粉では、新鮮花粉と比較して、それぞれ約14および12g kg⁻¹(乾燥重)の有意な総遊離アミノ酸の増加(P<0.05)が観察された。さらに、発酵花粉は、新鮮な花粉(62.11±0.8%)と比較して、可消化性タンパク質(75.14±0.7%)においてより大きな(P<0.05)含有率を示した(図3)。さらに、新鮮花粉(8.43±0.85および45.73±4.81g没食子酸eq.kg乾燥重量⁻¹)と比較して、発酵花粉では水溶性(15.98±0.64g没食子酸eq.kg乾燥重量)およびメタノール溶性(69.53±4.52g没食子酸eq.kg乾燥重量⁻¹)遊離フェノール化合物のより高い濃度(P<0.05)が認められた。

10

【0149】

実施例12

1. 実験的試験

2. 実験作業の目的

以下に報告する実験手順は、発酵花粉(ビーブレッド)の異なる試験のin vitro活性を検討し、ヒトケラチノサイトに対するその抗酸化活性および抗炎症活性(TNF-)を特性化することを目的とする。

20

【0150】

3. 材料

3.1 試験試料

【表4】

社内名称	B	FER 867	FER 868	FER869	FER 870	FER871
固有の識別名	対照	発酵	発酵	発酵	発酵	発酵
LOT	Lot 06/03/18B					
説明	接種せずに30°Cで9日間インキュベートした花粉	接種菌株 <i>L. kunkeii</i> PF12, <i>L. kunkeii</i> PF15 <i>L. kunkeii</i> PL13. 121°C、5'	接種菌株 <i>L. kunkeii</i> PF12, <i>L. kunkeii</i> PF15 <i>L. kunkeii</i> PL13 121°C、5'	接種菌株 <i>L. kunkeii</i> PF12, <i>L. kunkeii</i> PF15 <i>L. kunkeii</i> PL13	接種菌株 <i>L. kunkeii</i> PF12, <i>L. kunkeii</i> PF15 <i>L. kunkeii</i> PL13 <i>H. uvarum</i> AN8Y27B	接種菌株 <i>L. kunkeii</i> PF12, <i>L. kunkeii</i> PF15 <i>L. kunkeii</i> PL13 121°C、5'
保存	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
濃度	100-250-500-µg/mL	100-250-500-µg/mL	100-250-500-µg/mL	100-250-500-µg/mL	100-250-500-µg/mL	100-250-500-µg/mL

30

40

* 選択したスターターは、L. kunkeei PF12、PF15、およびPF3、ならびにWickerhamomyces anomalus LCF1695で構成される

【0151】

発酵生成物は、30 で12時間保持した。

【0152】

すべての抽出物を培地(100%溶液溶解度ストック)で50mg/mlに希釈し、滅菌ろ過した(5mg/ml)。保存株は、-20 で保存した。

【0153】

50

3.2 使用した試薬および器具

【表5】

試薬	供給者
30%過酸化水素	SIGMA, 216763
アガロース (日常使用用)	SIGMA, A9539-100G
RPMI-1640培地	SIGMA, R0883
牛胎仔血清	SIGMA, F7524
ジメチルスルホキシド	SIGMA, D2438-50ML
ゲンタマイシン溶液	SIGMA, G1272
L-グルタミン	SIGMA, G7513
ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水	SIGMA, D8537
臭化エチジウム溶液 (10mg/mL: 分子生物学用、水溶液)	SIGMA, E1510
ゲル負荷緩衝液 RNAse、検出されず	SIGMA, G2526
MTT	SIGMA- Aldrich, M2128
ペニシリン-ストレプトマイシン	SIGMA, P0781
PRIME SCRIPT RT試薬キット(Perfect Real time)	Takara
PreMix Ex Taq	TAKARA, RR039A
GAPDHのためのTaqMan (登録商標) 遺伝子発現アッセイ Hs99999905_m1	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
TNF- α のためのTaqMan (登録商標) 遺伝子発現アッセイ Hs00174128_m1	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
トリプシン-EDTA溶液	SIGMA, T3924
α -トコフェロール	SIGMA, T3251

【0154】

10

20

30

40

50

【表 6】

機器	供給者
QiaExpert	Qiagen
15 L デジタル水浴 + 5 °C ~ + 100 °C から (Mod: Swbd1, BS-SWB2D)	Stuart
バランス (Mod. XS204)	Mettler Toledo
層流キャビネット (Mod: Gemini) + 反射防止装置付き UV ランプ	SterilManufacturingDivision
HeraCell CO ₂ インキュベーター (Mod: 150 ADV)	ThermoScientific
85 °C 水平冷凍機 ULT130, 120 L (Mod: Labfrost, MME-TE21140)	Elcold
Bürker 計数チャンバー w / クランプ (DI-DA-443/3)	Carlo Erba
マイクロプレートオートリーダー (EL 808)	Biotek
ボルテックス	Arhos160-PBI International
MX3000p RT 機器	Stratagene

10

20

【0155】

3.3 使用した生物学的モデル

3.3.1 ヒトケラチノサイトの培養

ヒトケラチノサイト NCTC 2544 の不死化株を使用し (Perry V. P. et al., 1957)、滅菌フラスコ (25 cm³) で培養し、ウシ胎児血清 (FBS)、1% ペニシリンおよびストレプトマイシンと 0.1% ゲンタマイシンの存在下でグルタミン 2 mM を添加した RPMI 培養培地中で、5% CO₂ の湿気下で 37 °C でインキュベートした。

30

【0156】

1:3 分割は、1X PBS (Ca²⁺ および Mg²⁺ を含まないリン酸緩衝液) で洗浄し、細胞をトリプシン - EDTA 液で 37 °C で 2 分間脱離することにより、単層を達成した後に 2 日毎に行う。この細胞を、25 cm³ の滅菌フラスコ中で培養に保持し、5% CO₂ の湿潤雰囲気中で 37 °C でインキュベートした。

【0157】

【表 7】

ICLC カタログコード	HL97002
寄託者	Prof. M. Ferro, DIMES, General Pathology, University of Genoa, Italy
ビブリオグラフィック参照	<ul style="list-style-type: none"> Arch Dermatol Res 1976; 256 (3): 255-260- PMID: 990102 Arch Dermatol Res 1976; 261 (1): 27-31

40

【0158】

3.3.2 対照

50

3.3.2.1 誘導された酸化ストレスMTT試験

陰性対照：2.5%ウシ胎児血清(FBS)、グルタミン2mMを添加したRPMIで処理していない細胞を、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンと0.1%ゲンタマイシンの存在下で、37 °Cおよび5%CO₂(暗所)で(96ウェル)培養プレートに保存した。

【0159】

陽性対照：2.5%ウシ胎児血清(FBS)、グルタミン2mMを添加したRPMI中で過酸化水素1mMで2時間処理した細胞を、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンと0.1%ゲンタマイシンの存在下で、37 °Cおよび5%CO₂(暗所)で(96ウェル)培養プレートに保持した。

10

【0160】

3.3.2.2 抗炎症活性試験

陰性対照：2.5%ウシ胎児血清(FBS)、グルタミン2mMを添加したRPMIで処理していない細胞を、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンと0.1%ゲンタマイシンの存在下で、37 °Cおよび5%CO₂の25cm²培養プレート中(12ウェル)に保存した。

【0161】

陽性対照：2.5%ウシ胎児血清(FBS)、グルタミン2mMを添加したRPMIで処理していない細胞を、1%ペニシリンおよびストレプトマイシンと0.1%ゲンタマイシン10μg/mL LPSの存在下で、37 °Cおよび5%CO₂の25cm²培養プレートに(12ウェル)保存した。

20

【0162】

4. 方法

4.1 ヒトケラチノサイト株NCTC2544に誘導される酸化ストレスに対する保護の研究

4.2.1 方法の原理

Rajapakseおよび共同研究者(2005)により2005年に実施された研究は、活性化化合物の*in vitro*抗酸化活性を研究するためにMTTアッセイのような高度に使用され汎用される方法を用いる可能性を実証した。具体的には、この方法によって、このような化合物の後に酸化ストレスにさらされた細胞に対する保護作用を検討することが可能である。酸化ストレスの誘導は、ROSの形成を介して細胞内の酸化的損傷の産生を誘導する薬剤である過酸化水素とインキュベートすることによって行われる。いかなる保護作用も、同じ酸化ストレスにさらされた細胞と比較して、試験される活性化化合物に前処理/前曝露された細胞の酸化ストレス後の細胞生存性の評価を通して決定することができる。より高い細胞生存率は、試験した化合物の保護作用に対応するであろう。

30

【0163】

4.2.2 実験手順

アッセイは、Codaと共同研究者(Coda et al., 2012)が記載した方法に従って実施し、若干の変更を加えた。

【0164】

ヒトケラチノサイトNCTC2544を、5×10⁴細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し、約80%のコンフルエントに達するまで5%CO₂で37 °Cでインキュベートした。

40

【0165】

次に、それぞれ試料B、FER867、FER868、FER869、FER870およびFER871について、細胞を、それぞれ100~250および500μg/mLの濃度で、試験すべき活性化化合物およびそれぞれの対照と16時間インキュベートした。

【0166】

希釈液は、1%ペニシリンとストレプトマイシンおよび0.1%ゲンタマイシンの存在下で、DMSOのストック50mg/mLから開始し、滅菌ろ過し、2.5%ウシ胎児血

50

清 (F B S)、グルタミン 2 m M を添加した R P M I 培地を用いて調製した。

【 0 1 6 7 】

陽性対照として H₂O₂ 1 m M で処理した細胞を用いた。代わりに、培養物のみで保持した細胞 (R P M I 2 . 5 % F B S) を陰性対照として用いた。

【 0 1 6 8 】

アルファトコフェロールを基準値酸化防止剤として、それぞれ 1 0 0、2 5 0 および 5 0 0 μ g / m l の濃度で試験した。

【 0 1 6 9 】

1 6 時間の前処理を経て、細胞は P B S 1 X で洗浄され、暗所で 3 7 ° C、5 % の C O₂ で、1 m m の H₂O₂ 溶液 (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O , U S A) で 9 0 分間インキュベートされた。

10

【 0 1 7 0 】

いったん酸化ストレス誘導段階が終了したら、ポイント 4 . 1 . 2 (M T T アッセイ) に記載された方法に従って、様々な試料の細胞生存率を評価した。

【 0 1 7 1 】

データは、以下の式に従って、ストレスを与えなかった対照細胞 (c t r) と比較した細胞生存率のパーセンテージで表した：

$$\% \text{ 細胞生存率} / \text{ctr} = (\text{Abs 試料} / \text{Abs ctr}) * 100$$

【 0 1 7 2 】

すべての試験は少なくとも 2 回、2 つ 1 組で実施された。

20

【 0 1 7 3 】

4 . 3 抗炎症活性 (T N F - α) の検討

4 . 4 . 1 実験手順

N C T C 2 5 4 4 細胞における T N F - α 炎症マーカーの遺伝子発現を、相対定量 R T - P C R (定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 - q R T - P C R) により評価した。

【 0 1 7 4 】

この分析には 3 段階の連続ステップが必要であった：

- ・全 R N A の抽出；
- ・c D N A の逆転写；

q R T - P C R。

30

【 0 1 7 5 】

ヒトケラチノサイト N C T C 2 5 4 4 を、0 . 5 × 1 0⁶ 細胞 / ウェルの密度で 1 2 ウェルプレートに播種し、約 8 0 % のコンフルエントに達するまでインキュベートした。

【 0 1 7 6 】

次いで、細胞を、1 0 0、2 5 0 および 5 0 0 μ g / m L の濃度で、試料 B、F E R 8 6 7、F E R 8 6 8、F E R 8 6 9、F E R 8 7 0 および F E R 8 7 1 とともに、それぞれ 1 6 および 2 4 時間インキュベートした。

【 0 1 7 7 】

希釈液は、1 % ペニシリンとストレプトマイシンおよび 0 . 1 % ゲンタマイシンの存在下で、2 . 5 % ウシ胎児血清 (F B S)、グルタミン 2 m M を添加した培地 (R P M I) 中のストック 5 0 m g / m L から始めて調製した。

40

【 0 1 7 8 】

L P S (リポ多糖類) を 1 0 μ g / m L の量で炎症のインデューサーとして使用し、1 6 および 2 4 時間処理溶液と共にインキュベートした。

【 0 1 7 9 】

陰性対照として、培養培地のみで保持した細胞 (R P M I 2 . 5 % F B S) を用いた。

【 0 1 8 0 】

代わりに、培養培地のみ (R P M I 2 . 5 % F B S) および 1 0 μ g / m L L P S に保持した細胞を、陰性対照として用いた。

【 0 1 8 1 】

50

インキュベート後、RNAを抽出した。

【0182】

ChomczynskiとMackey(1995)によって記載されたものに従って、NCTC2544細胞から全RNAを抽出した。

【0183】

関心の活性化化合物とのインキュベーション後、細胞をPBS(1x)で洗浄し、最終的にRNA抽出手順に供した。抽出後、抽出RNAをQiaExpert(Qiagen)装置を用いて定量し、260nm波長で抽出された全RNAの $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中の濃度を計算した。

【0184】

最後に、1%アガロースゲル上で電気泳動を行うことによって、RNAの完全性($2\mu\text{g}/\text{mL}$)を評価した。

【0185】

RNAの鎖を鋳型として用いてNA分子を合成できる酵素を用いて、全RNAをcDNA(相補的DNA)に変換した。このDNA-ポリメラーゼRNA依存性酵素は、逆転写酵素とよばれる。

【0186】

それは、RNAの一本鎖の3'末端に結合し、ランダムプライマーおよびデオキシヌクレオシド三リン酸(DNTPS)を介して、それは、cDNAの鎖を合成する。

【0187】

この目的のために、5X PrimeScript Buffer(リアルタイム用); PrimeScript RT Enzyme Mix1; OligodTPrimer; Random 6 mers; RNAse非含有2 dH₂Oを含む市販キット「PrimeScript(商標)RT試薬キット(perfect Real Time)」(TakaraBioInc.、日本)を使用した。

【0188】

抽出し、定量したRNAを、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈し、cDNAに逆転写した。10 μL のマスターミックス(5X PrimeScript Buffer(リアルタイム用); PrimeScript RT Enzyme Mix1; OligodTPrimer; Random 6 mers 100 μM)を調製し、そこに10 μL のRNA($2\mu\text{g}/\text{mL}$)を加えた。

【0189】

試料を、サーマルサイクラー(Stratagene Mx3000P Real Time PCR System, Agilent Technologies Italy S.p.A.、イタリア、ミラノ)に置き、次の条件で再登録に供した：

37、15分間；

85、5秒間；

4 保持

【0190】

逆転写後、試料にDEPC水30 μL を加えて、最終濃度40ng/ μL のcDNAを得た。

【0191】

qRT-PCRは、反応中に放出される蛍光をモニタリングすることにより、増幅産物をリアルタイムに増幅および定量する方法である。

【0192】

RT-PCR増幅には、TaqMan(登録商標)(Applied Biosystems)プローブシステムを用いた。以下のTaqManプローブを用いた：Hs00174128__m1(TNF-)およびHs99999905__m1(GAPDH)。GAPDH、対照遺伝子(ハウスキーピング)としてHs99999905__m1を用いた。

【0193】

10

20

30

40

50

Taqmanプローブは、増幅が進むにつれて蛍光の発達を可能にするプローブの一種である。レポーター（フルオロフォアFAM（商標））はその5'末端に結合し、一方クエンチャーは3'末端に結合する。レポーターとクエンチャーとの間の近さは、蛍光シグナル発光を打ち消す。耐熱性DNAポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ）蛍光の5'エソヌクレアーゼ活性のみが検出され、増幅産物の蓄積は、各サイクルの間に増加するレポーターの蛍光の増加を通して評価することができる。

【0194】

qRT-PCR用にマスターミックスを以下のように設定した：

- ・ 10 μ lの「2X Premix Ex Taq」；
- ・ 1 μ lの「20x TaqMan Gene Expression Assays」（2つのプライマーおよびフルオロフォア標識蛍光プローブFAM（商標）を含む）；
- ・ 0.4 μ lの受動的参照Rox II；
- ・ 5 μ lのDEPC水

10

【0195】

Master Mixには、標的遺伝子用に4 μ LのcDNAを、ハウスキーピング遺伝子用に1 μ LのcDNAを添加した。

【0196】

増幅は、以下の条件で40回実施した：

- ・ 95、30秒（Amplification）；
- ・ 95、5秒（変性）
- ・ 60、20秒（アニーリング-延長）；

20

【0197】

各分析は、2つ1組で実施した。

【0198】

得られたデータは、 2^{-Ct} の方法に従って解析し、したがってハウスキーピング遺伝子と比較して標準化し、対照試料（未処理細胞）上で校正した、目的遺伝子の式の相対値を算出することが可能であった：

$$Ct = Ct_{target-housekeeping}(\text{対照}) - Ct_{target-housekeeping}(\text{処理細胞})$$

【0199】

2^{-Ct} は、増幅率を100%と仮定して算出した。

30

【0200】

5. 結果

5.1 誘導された酸化ストレスに対する保護アッセイ

図5は、既知の作用の抗酸化剤、 α -トコフェロールと比較して、試験した試料の誘導された酸化ストレスに対する保護の活性に関するデータを示す。

【0201】

結果は、250および500 μ g/mLの濃度で分析した全ての化合物に対し誘導された酸化ストレスに対する有意な保護活性を示し、この活性は α -トコフェロールのそれと同等である。

40

【0202】

5.2 抗炎症活性（TNF- α ）の検討

添付した図6AおよびBは、試料B（対象）、FER867、FER868、FER869、FER870およびFER871を、それぞれ100~250および500 μ g/mLの濃度で16時間（図6a）および24時間（図6b）処理した後のTNF- α 遺伝子発現データを示す。

【0203】

16時間の処理後、100、250および500 μ g/mLの濃度で試験した試料B、およびFER867は、最も有意な抗炎症活性を示す（図6A）。

【0204】

50

抗炎症活性は、特に F E R 8 6 7 試料については、処理の 2 4 時間後により明白である (図 6 B) 。

【 0 2 0 5 】

6 . 結 論

結論として、実施した試験は、250および500 μ g / m l の濃度で試験した全試料について、誘導された酸化ストレスに対する有意な保護活性を示した (図 5) 。

【 0 2 0 6 】

さらに、消炎作用の研究では、16時間の治療後に、100および250 μ g / m l の濃度で試験した試料 B , F E R 8 6 7 が有意な消炎活性を示すことが示された (図 6 A) 。

【 0 2 0 7 】

化合物 F E R 8 6 9 について、500 μ g / m l の濃度は、T N F - 関連 mRNA 式を有意に低下させた。100および500 μ g / m l の濃度の F E R 8 7 1 は、mRNA 産生の減少を示す。被験化合物の抗炎症活性は、特に F E R 8 6 7 化合物については、24時間の処理後により明らかである (図 6 B) 。

【 0 2 0 8 】

書 誌 学

Arch Dermatol Res 1976 ; 256 (3) : 255 - 260 - P M I D : 990102

Arch Dermatol Res 1976 ; 261 (1) : 27 - 31

Mosmann T , 1983 . Rapid Colorimetric Assay f or Cellular Growth and Survival : Applicati on to Proliferation and Cytotoxicity Assa ys . J Immunol Methods 65 (1 - 2) , 55 - 63 .

Rajapakse N , Mendis E , Byun HG , Kim SK , 2005 . Purification and in vitro antioxidative e ffects Of giant squid muscle peptides On fr ee radical - mediated Oxidative systems . J Nu tr Biochem 16 (9) , 562 - 569 .

Coda R , Rizzello CG , Pinto D , Gobetti M , 201 2 . Selected Lactic Acid Bacteria Synthesiz e Antioxidant Peptides during Sourdough F ermentation Of Cereal Flours . Appl Environ Microbiol 78 (4) , 1087 - 1096 .

Chomczynski P , Mackey K . Modification Of the TRI reagent procedure for isolation Of RNA from polysaccharide - and proteoglycan - ric h sources . Biotechniques 1995 ; 19 : 942 - 5 .

【 0 2 0 9 】

実施例 1 3

軟質ゼリーカプセル

各ソフトゼリーカプセル (真珠) は、以下を含有する : q . t y u . m .

酵母を接種せずに、選択した Lactobacillus kunkeei 菌株 P F 1 2 、 P F 1 5 、 および P L 1 3 で発酵させた花粉、例 5 参照 100mg

大豆油 250mg

大豆レシチン 5mg

脂肪酸のモノグリセリドおよびジグリセリド 30mg

シェルの構成成分 :

ゼラチン 145mg

グリセロール 67mg

【 0 2 1 0 】

10

20

30

40

50

実施例 1 4

錠剤

各投与量は、以下を含む。q . t y u . m .

酵母を接種せずに、選択した *Lactobacillus kunkeei* 菌株 PF 1 2、PF 1 5、および PL 1 3 で発酵させた花粉、例 5 参照 2 0 0 m g

微結晶セルロース 1 0 0 m g

B i o G A B A [ブドウのマスト (*Vitis vinifera* L . フルーツ) の発酵からのガンマアミノ酪酸、*Lactobacillus plantarum* C 4 8] 1 0 0 m g

ポリビニルプロピリドン 3 5 m g

10

コメ (*Oryza sativa* L 種子乾燥抽出物) 5 0 m g

アルファルファ (*Medicago sativa* L 花乾燥抽出物) 4 0 m g

クロレラ (*Chlorella pyrenoidosa* H C h i c k) 葉状物乾燥抽出物 3 0 m g

ホスファチジルセリン 4 0 m g

Melissa (*Melissa Officinalis* L) の葉および花の乾燥抽出物 1 0 0 m g

グリホニア [*Griffonia simplicifolia* (D C) B a i l l] 種子乾燥抽出物 5 1 m g

L - テアニン 1 2 . 6 m g

20

二酸化ケイ素 1 0 m g

ステアリン酸マグネシウム 1 0 m g

【 0 2 1 1 】

実施例 1 5

チュアブル錠剤

各投与量は、以下を含む。q . t y u . m .

マルトデキストリン 5 0 ~ 3 0 0 m g

デキストロース 5 0 ~ 3 0 0 m g

フルクトース 5 0 ~ 3 0 0 m g

酵母を接種せずに、選択した *Lactobacillus kunkeei* 菌株 PF 1 2、PF 1 5、および PL 1 3 で発酵させた花粉、例 5 参照 1 0 0 m g

30

芳香 1 0 ~ 3 0 m g

トウモロコシデンブ 1 0 ~ 3 0 m g

微結晶セルロース 1 0 ~ 3 0 m g

二酸化ケイ素 5 ~ 1 5 m g

ロイシン 5 ~ 1 5 m g

【 0 2 1 2 】

実施例 1 6

錠剤

各投与量は、以下を含む。q . t y u . m .

40

リン酸カルシウム 1 5 0 m g

酵母を接種せずに、選択した *Lactobacillus kunkeei* 菌株 PF 1 2、PF 1 5、および PL 1 3 で発酵させた花粉、例 5 参照 5 0 m g

ボスウェリア (*Boswellia serrata* R o x b) 乾燥抽出物樹脂 1 5 0 m g

パルミトイルエタノールアミド (P E A) 1 5 0 m g

B i o G A B A [ブドウのマスト発酵 (*Vitis vinifera* L . フルーツ) からのガンマアミノ酪酸、*Lactobacillus plantarum* C 4 8] 1 0 0 m g

- アミノ酪酸 4 9 m g

50

ウコン (<i>Curcuma longa</i> L.) 乾燥抽出物	100 mg	
微結晶セルロース	50 mg	
ビタミンD (コレカルシフェロール)	0.005 mg	
ビタミンB3 (ニコチンアミド)	16 mg	
ヒドロキシプロピルセルロース	30 mg	
二酸化ケイ素	6 mg	
脂肪酸のモノおよびジグリセリド	10 mg	
ビタミンB1 (一硝酸チアミン)	1.36 mg	
ビタミンB2 (リボフラビン)	14 mg	
ビタミンB5 (パントテン酸カルシウム)	6.5 mg	10
ビタミンB6 (ピリドキシン塩酸塩)	1.7 mg	
ビタミンK2 (メナキノン-7)	0.075 mg	
ビタミンB12 (シアノコバラミン)	0.026 mg	
【0213】		
実施例17		
錠剤		
各投与量は、以下を含む。q.t.y u.m.		
アシュワガンダ (<i>Withania somnifera</i> L Dunal) 根乾燥抽出物	150 mg	
選択した菌株 <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12、PF15、PL13、および酵母 <i>Hanseniaspora uvarum</i> AN8Y27 Bref で構成される混合スターターを使用して発酵させた花粉。例4参照	50 mg	20
微結晶セルロース	100 mg	
酸化マグネシウム	100 mg	
バコパ (<i>Bacopa monnieri</i> L Pennel) 乾燥抽出物	100 mg	
BioGABA [ブドウのマスト (<i>Vitis vinifera</i> L. フルーツ) の発酵からのガンマアミノ酪酸、 <i>Lactobacillus plantarum</i> C48]	100 mg	
リン酸カルシウム	100 mg	
- アミノ酪酸	49 mg	30
サフラン (<i>Crocus sativus</i> L) 花抽出物	30 mg	
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	30 mg	
ビスグリシン酸亜鉛	10 mg	
二酸化ケイ素	7 mg	
(6S)5-メチルトetraヒドロ葉酸、グルコサミン塩	0.2 mg	
ステアリン酸マグネシウム	11 mg	
【0214】		
実施例18		
免疫刺激BAR	30 グラム	
酵母を接種せずに、選択した菌株 <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12、PF15、およびPL13で発酵させた花粉、例5参照	2 g	40
グルコースおよびフルクトースシロップ	10 ~ 14 g	
米片	10 ~ 12 g	
ヒマワリレシチン	0.5 ~ 3 g	
パーム油 (<i>Elaeis guinensis</i>)	0.5 ~ 3 %	
トウモロコシマルトデキストリン	1 ~ 2 g	
アカイ (<i>Euterpe Oleracea</i>) 脱水果実	3 ~ 4 g	
レイシ (<i>Vitis apyrena</i> L) 脱水果実	1 ~ 2 g	
クエン酸	q. b	
芳香	q. b	50

【0215】

実施例19

硬質ゼリーカプセル

各硬質ゼリーカプセルは、以下を含む：q . t y u . m .

選択した菌株 *Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15、PL13、および酵母 *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bref で構成される混合スターターを使用して発酵させた花粉。例4参照 200mg

マルトデキストリン 5~50mg

不溶性天然繊維 5~100mg

ステアリン酸マグネシウム 1~10mg

二酸化ケイ素 3~6mg

天然ゼリー外被

【0216】

実施例20

経口水溶性顆粒

各サシェには以下が含まれる：q . t y u . m .

選択した菌株 *Lactobacillus kunkeei* PF12、PF15、PL13、および酵母 *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27Bref で構成される混合スターターを使用して発酵させた花粉。例4参照 1000mg

イヌリン 200~600mg

マルトデキストリン 0.5~3.0g

リンゴ酸 1~10mg

芳香 10.0~50.0mg

スクラロース 0.005mg

【0217】

実施例21

スティックパック中の顆粒状ブレンド

各サシェは、以下を含む：q . t y u . m .

酵母を接種せずに、選択した *Lactobacillus kunkeei* 菌株 PF12、PF15、および PL13 で発酵させた花粉、例5参照 500mg

エキナシア (*Echinacea purpurea*) 地上部乾燥抽出物 300mg

蜂蜜芳香 10mg

イヌリン 1~2g

アラビアゴム 0.5~2g

リンゴ酸 0~100mg

スクラロース 0.005mg

芳香 0.25mg

【0218】

例22

錠剤

各錠剤は、以下を含む：

酵母を接種せずに、選択した *Lactobacillus kunkeei* 菌株 PF12、PF15、および PL13 で発酵させた花粉、例5参照 50mg

微結晶セルロース 50mg

Broccoli (*Brassica Oleracea italica var*) 花序乾燥抽出物 125mg

BioGABA [ブドウのマスト (*Vitis vinifera* L. フルーツ) の発酵からのガンマアミノ酪酸 100mg

発酵花粉 100mg

マスタード (*Brassica juncea* L Czern) 種子乾燥抽出物 75mg

10

20

30

40

50

- Artichoke (Cynara scolymus L) 葉乾燥抽出物 60 mg
- アセロラ (Malpighia glabra L) 果実乾燥抽出物 100 mg
- オレンジ (Citrus sinensis L) 果実乾燥抽出物 50 mg
- リン酸カルシウム 50 mg
- ベートルート (Beta vulgaris L) 全植物乾燥抽出物 50 mg
- ヒドロキシプロピルセルロース 20 mg
- ベイベリー (Myrica cerifera L) 樹皮乾燥抽出物 30 mg
- Astragalus (Astragalus membranaceus) 根乾燥抽出物 30 mg
- ケルセチン 30 mg
- ビタミンE (トコトリエノールトコフェロール) 6 mg
- シトステロール 20 mg
- リコピン 10 mg
- ニコチンアミド 16 mg
- 二酸化ケイ素 10 mg
- 脂肪酸のモノおよびジグリセリド 10 mg
- ガレオプシス (Galeopsis segetum Necker) 地上部乾燥抽出物 5 mg
- スペルミジン三塩酸塩 0.5 mg
- ビオチン 0.05 mg

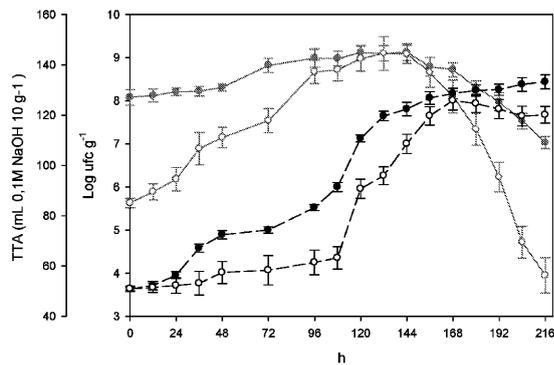
10

20

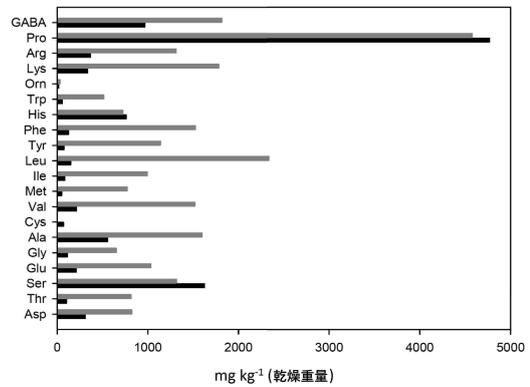
【図面】

【図1】

Figure 1



【図2】

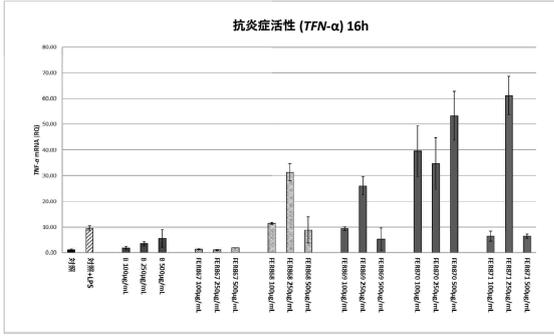


30

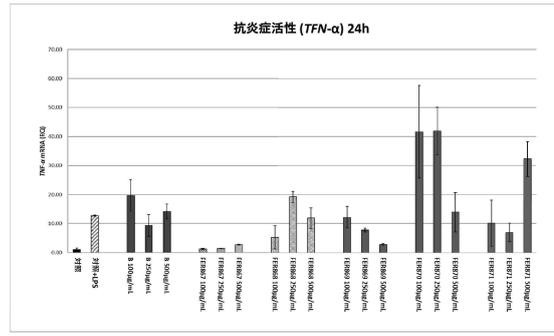
40

50

【 6 A 】



【 6 B 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 K	36/18
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/04
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
C 1 2 R	1/225(2006.01)	A 6 1 P	17/00
		C 1 2 R	1:225

DSMZ DSM32845

- (72)発明者 フィラニーノ パスクアーレ
イタリア国 7 6 1 2 1 バーレッタ ヴィア イルデブランド ピッツェッティ 4
- (72)発明者 カントーレ ヴィンチェンツォ
イタリア国 7 0 0 3 7 ルヴォ ディ ブグリア ヴァネッラ ネットロ ロッセッリ 5
- (72)発明者 マスコーロ アントニオ
イタリア国 2 0 1 2 6 ミラノ ヴィア プレダ 1 4 0
- (72)発明者 マルツァーニ バーバラ
イタリア国 2 7 0 2 0 カルボナーラ アル ティチーノ ヴィア ジー . マルコーニ 1 3

審査官 小田 浩代

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 1 0 2 6 6 8 (W O , A 1)
中国特許出願公開第 1 4 8 8 2 8 2 (C N , A)
特表 2 0 1 0 - 5 2 5 8 0 9 (J P , A)
Anderson K. et al. , PLoS One , 2013年 , Vol. 8:e83125 , pp. 1-16

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d