

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 986**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23L 1/105 (2006.01)
A23L 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2004 E 04787995 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1676908**

54 Título: **Método de fermentación y cultivo, extracto vegetal fermentado, polvo de extracto vegetal fermentado y composición que contiene el extracto vegetal fermentado**

30 Prioridad:

26.09.2003 JP 2003336555
10.05.2004 JP 2004139761

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2015

73 Titular/es:

SOMA, GEN-ICHIRO (50.0%)
10-21, Higashitamagawa 1-chome, Setagaya-ku
Tokyo, 158-0084, JP y
BIOMEDICAL RESEARCH GROUP INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

SOMA, GEN-ICHIRO;
KOHCHI, CHIE;
INAGAWA, HIROYUKI;
NISHIZAWA, TAKASHI y
TAKAHASHI, YUKINORI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 542 986 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de fermentación y cultivo, extracto vegetal fermentado, polvo de extracto vegetal fermentado y composición que contiene el extracto vegetal fermentado

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de fermentación y cultivo para obtener un inmunopotenciador que sea seguro al agregarse a productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi-medicamentos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, forraje y agentes de baño para mamíferos incluidos los seres humanos (en particular, animales domésticos, mascotas, etc.), pájaros (en particular, pollos de criadero, pájaros domésticos, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en particular, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados, un método para producir un extracto vegetal fermentado, un extracto vegetal fermentado que contiene el inmunopotenciador obtenido mediante el método de fermentación y cultivo, polvo que contiene el inmunopotenciador obtenido a partir del extracto vegetal fermentado y un compuesto de extracto vegetal fermentado que contiene el extracto vegetal fermentado.

Técnica anterior

20 Un problema imperioso consiste en establecer métodos de prevención de enfermedades y métodos terapéuticos que incluyan tecnología de prevención de infecciones para los mamíferos incluyendo a los humanos (en particular, animales domésticos, mascotas, etc.), pájaros (en particular, pollos de criadero, pájaros domésticos, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en particular, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados. Además, para ello, se requieren mayormente métodos que no utilizan químicos, sin contaminación ambiental, sin producir bacterias resistentes y sin acumulación en el cuerpo de la persona. Los inventores de la presente solicitud han determinado para los problemas arriba mencionados que los inmunopotenciadores derivados de las plantas, tal como el extracto acuoso de trigo, logran en forma segura los efectos de prevención de enfermedades y efectos terapéuticos (Documento de patente 1, documento no patente 1). También, a fin de lograr el objetivo mencionado anteriormente, los inventores de la presente invención han detectado que es posible utilizar lipopolisacáridos de bajo peso molecular obtenidos a partir de la *Pantoea agglomerans* que es una bacteria simbiótica del trigo (Documento no patente 2). En tanto, estudios recientes han demostrado que varias sustancias además de los lipopolisacáridos exhiben el efecto inmunopotenciador y estos materiales naturales plurales que contienen el inmunopotenciador han llamado la atención.

35 La tecnología de fermentación que utiliza microbios ha sido comúnmente utilizada no solo en los campos de alimentos sino también en campos amplios. La fermentación ha sido ampliamente utilizada para la producción de alcoholes incluyendo vinos, la producción de salsas de soja y pastas de soja, la producción de productos lácteos fermentados tales como quesos, y la producción de productos farmacéuticos. Los microbios utilizados para estas fermentaciones son varios, y las bacterias de levadura de malta de arroz (hongo) y ácido láctico son algunos ejemplos, pero rara vez ha sido informado el uso de bacterias gram-negativas. En general, la fermentación es un fenómeno donde la materia orgánica se descompone por la acción de microbios, y en sentido amplio significa que el microbio produce una sustancia útil (Documento no patente 3). Ejemplos de la fermentación que utilizan microbios incluyen la producción de vinos. La producción de vinos es la tecnología de fermentación que utiliza levadura de vino que se adhiere a la piel de la fruta de las uvas, y su producto es el alcohol. En la tecnología de fermentación que utiliza microbios, como las que usan bacterias gram-negativas, se ha conocido la fermentación de metano que utiliza bacterias de metano, la fermentación acética que utiliza acetobacterias y la fermentación de etanol (fermentación de tequila) a partir de patrones de magüey utilizando *Zymomonas mobilis*, pero rara vez se han conocido cultivos de fermentación que utilizan una planta comestible como material y utiliza los microbios caracterizados por vivir en una relación simbiótica con la planta, y el inmunopotenciador jamás ha llamado la atención como un producto fermentado. Además, el método de fermentación y cultivo para producir el inmunopotenciador jamás ha llamado la atención.

En tanto, cuando la fermentación la lleva a cabo el microbio, en general existen condiciones de nutrientes que debe cumplir un sustrato de fermentación para el crecimiento del microbio. Es decir, la presencia de sustancias disponibles como nutrientes por el microbio es fundamental, a saber, contienen monosacáridos tales como la glucosa y fructosa como fuentes de carbono. Por lo tanto, las frutas tales como las uvas que contienen abundante fructosa pueden utilizarse como el sustrato de fermentación sin proporcionar procesamiento alguno. Sin embargo, en otros casos, se requiere un pretratamiento tal como calentamiento y tratamiento de enzimas para la fermentación por parte del microbio. Por ejemplo, el *Zymomonas mobilis* aquí mencionado es un microbio utilizado para la fermentación de tequila. En este caso, los polisacáridos obtenidos de los patrones de magüey, que no es una planta comestible, se descomponen en monosacáridos fermentables mediante calentamiento, y posteriormente los monosacáridos son fermentados por el microbio para producir el alcohol como el producto de fermentación. Por lo tanto, al llevarse a cabo el cultivo de fermentación utilizando un microbio común, los polisacáridos tales como el almidón no son aptos como sustrato de fermentación. Por ejemplo, se ha descrito que la *Pantoea agglomerans* no puede descomponer el almidón (Documento no patente 4).

Hemos demostrado que un componente activo para potenciar la inmunidad está contenido en un extracto acuoso de harina de trigo (Documento no patente 5). Hemos demostrado también que los componentes activos están contenidos en cereales alimentarios (trigo, arroz), algas marinas (algas pardas, laminarias, algas hijiki (alga oscura) y laver) y judías (soja y judías adzuki) (Documento no patente 6). En cuanto a esta actividad biológica, se ha detectado que tiene efectos preventivos en las enfermedades de los seres humanos y de los ratones (diabetes, hiperlipemia, dermatitis atópica, cáncer) y puede ser eficaz para la prevención de infecciones de peces, crustáceos y gallos (Documento de patente 1, Documento no patente 1). Sin embargo, para poder esperar dicho efecto por parte del extracto acuoso de harina de trigo, es necesario ingerir la harina de trigo en gran cantidad.

Entre tanto, la *Pantoea agglomerans* es una bacteria que vive en una relación simbiótica con el trigo, y se considera útil en el cultivo de trigo dado que la bacteria proporciona a éste fósforo y nitrógeno (Documento no patente 7). Además, la *Pantoea agglomerans* se deposita no solo en el trigo sino también en la epidermis de peras y manzanas. Se ha demostrado en Europa que las enfermedades de podredumbre a causa de hongos pueden evitarse cuando esta bacteria se deposita, y se ha avanzado en el desarrollo del uso de esta bacteria como un fungicida ecológico sin toxicidad (Documento no patente 8). Se ha definido que la simbiosis es "un fenómeno donde los organismos xenogénicos viven juntos. En este caso, es normal que signifique manteniendo constantemente una relación cercana conducta o fisiológica. Por lo tanto, no cae bajo este concepto vivir solo en el mismo hábitat. La simbiosis se clasifica y divide en varias categorías dependiendo del significado de la vida y esencialmente del compañero simbiótico, la sustentabilidad de la relación y el posicionamiento espacial del compañero simbiótico. En general, la simbiosis se divide ampliamente en tres, mutualismo, comensalismo y parasitismo basado en la presencia o ausencia del beneficio/no beneficio de los compañeros simbióticos." (Documento no patente 9). Se ha conocido que la *Pantoea agglomerans* se separa del trigo en algunas regiones y en algunos tipos (Documento no patente 5) y también se separan de las frutas (Documentos no patente 10, 11). Se ha reportado que la *Pantoea agglomerans* protege a las plantas de los hongos y de otras bacterias mediante la generación de antibióticos (Documentos no patente 12, 13) y realiza la fijación de fósforo y nitrógeno (Documento no patente 7). Por lo tanto, se considera que la *Pantoea agglomerans* está siempre presente en plantas y ocupa un rol para otorgar beneficios a las plantas. Por lo tanto, su modo de vida se considera una "simbiosis" y no un "parasitismo". Además, hemos demostrado que el componente activo para potenciar la inmunidad está contenido en la *Pantoea agglomerans*. Además, hemos detectado que el bajo peso molecular obtenido a partir de la bacteria tiene efectos preventivos en seres humanos y ratones (diabetes, hiperlipemia, dermatitis atópica, cáncer) y es eficaz para la prevención de infecciones en peces, crustáceos y gallos (Documento de patente 3, Documento no patente 2).

Bajo tal circunstancia, hemos concebido la idea de establecer un método para producir un extracto vegetal fermentado usando *Pantoea agglomerans* como método para producir un inmunopotenciador seguro y económico. Es decir, nos hemos concentrado en (1) el cultivo de la *Pantoea agglomerans* a bajo costo utilizando un medio que contiene componentes de proteína principales incluidos en una solución de cultivo derivada de plantas así como también fermentar un componente de planta y (2) preparar materiales abundantemente que contengan la *Pantoea agglomerans* contenida en la planta o un producto mediante fermentación, desarrollando de tal modo productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, quasi-medicamentos, productos cosméticos, alimentos funcionales, alimentos, forraje y agentes de baño, para mamíferos incluyendo seres humanos (en particular, animales domésticos, mascotas, etc.), pájaros (en particular, pollos de criadero, pájaros domésticos, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en particular, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados. Sin embargo, esto no significa que un microbio que vive en relación simbiótica con una planta pueda utilizar directamente los componentes de la planta, p.ej., el material derivado de una planta comestible como un sustrato de fermentación. Por ejemplo, la harina de trigo es una sustancia orgánica compuesta de almidón y lo similar presente en granos de trigo, pero aislados de la *Pantoea agglomerans* que es un microbio simbiótico con el trigo a través de la piel externa, y no hace contacto directo. Por lo tanto, no puede demostrarse mediante una relación simbiótica del microbio con el trigo si la *Pantoea agglomerans* puede fermentarse y cultivarse o no usando harina de trigo. De hecho, no se ha conocido ni reportado que la *Pantoea agglomerans* puede asimilar la harina de trigo. Por el contrario, basado en hechos de conocimiento público, se ha descrito que la *Pantoea agglomerans* no puede utilizar almidón de trigo como sustrato de fermentación.

Los glúcidos contenidos en las plantas son generalmente retenidos como almidón, y esto es notable en plantas comestibles, en particular cereales alimentarios. Generalmente, los microbios no tienen una función en la cual el almidón sea altamente asimilado. En este aspecto, se ha conocido que una parte de bacterias gram-negativas facultativas pueden fermentar el almidón. Por ejemplo, se conoce que la *Erwinia* puede asimilar almidón. Sin embargo, en esta fermentación, cuando se fermenta almidón, se pretende utilizar una actividad amilasa del microbio agregando el microbio cultivado en otro medio óptimo, y jamás se concibió que el cultivo mismo se realice utilizando almidón y que la fermentación se lleve a cabo conjuntamente con él. En la tecnología convencional, se considera que la fermentación objetiva no solo utiliza eficazmente la actividad amilasa del microbio, y no se programa para criar al microbio utilizando almidón como sustrato. Entre tanto, en los Ejemplos de la presente invención, se divulga que un producto fermentado se produce además del crecimiento del microbio utilizando almidón como una fuente de solo carbono, y la presente invención es significativamente diferente a la tecnología convencional en que el presente Ejemplo no solo es fermentación sino también fermentación y cultivo.

65

Por otro lado, si un cierto microbio retiene la función de descomponer almidón, esto no significa directamente que el microbio puede crecer utilizando almidón como sustrato. En el cultivo, en el caso de apuntar también al crecimiento del microbio, la cantidad de microbio agregado al comienzo del cultivo es extremadamente baja. En tal caso, incluso si el microbio tiene levemente actividad amilasa, esta actividad es demasiado débil para descomponer de forma suficiente el sustrato y no se logra el crecimiento del microbio. De hecho, se ha considerado que varios de los microbios no pueden crecer utilizando almidón como única fuente de carbono.

Sin embargo, si la fermentación y cultivo pueden realizarse utilizando la *Pantoea Agglomerans* en el medio que contiene harina de trigo como principal componente para producir un extracto vegetal fermentado (en adelante, el extracto vegetal fermentado obtenido por fermentación y cultivo utilizando la *Pantoea Agglomerans* en el medio que contiene harina de trigo como componente principal se denomina extracto de trigo fermentado) que contiene en forma abundante un inmunopotenciador a bajo costo, como ejemplos específicos, productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi-medicamentos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, forraje, y agentes de baño ecológicos, seguros y eficaces para la prevención de infecciones para seres humanos y en los campos de la industria animal y la acuicultura deberían poder proporcionarse. La presente invención ha sido completada aprovechando la oportunidad de haberse descubierto que la *Pantoea Agglomerans* crecía usando harina de trigo como sustrato en el contexto arriba mencionado y llevando a cabo varios experimentos ampliamente.

El extracto vegetal fermentado proporcionado por la presente invención es un término genérico que incluye una solución de cultivo misma obtenida mediante fermentación y cultivo, un componente líquido obtenido mediante separación de sólido y líquido, y un componente líquido obtenido brindando un proceso de extracción a un componente sólido obtenido mediante la separación sólido-líquido, y lo similar. Es decir, el extracto vegetal fermentado incluye la solución de cultivo misma obtenida mediante el método de fermentación y cultivo de acuerdo con la presente invención, y todos los extractos capaces de ser preparados utilizando todo o parte de la solución de cultivo. A pesar de que es una cuestión de rutina, el extracto vegetal fermentado puede utilizarse por el secado como un polvo de extracto vegetal fermentado o disolviendo el polvo de extracto vegetal fermentado en una concentración opcional en una solución adecuada, p.ej., solución de tampón de fosfato incluyendo una solución salina normal.

Documento de patente 1: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH3-218466

Documento de patente 2: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH8-198902

Documento de patente 3: WO 00/57719

Documento de patente 4: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH6-78756

Documento de patente 5: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH4-187640

Documento de patente 6: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH4-49240

Documento de patente 7: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH4-99481

Documento de patente 8: Solicitud de patente japonesa no examinada N.ºH5-155778

Documento no patente 1: Inagawa, H. y otros, *Biotherapy* 5(4), p. 617-621, 1991

Documento no patente 2: Soma G. y otros, "*Tumor necrosis Factor: Molecular and Cellular Biology and Clinical Relevance*", p. 203-220, 1993

Documento no patente 3: Yamada T. y otros, "*Seibutsugaku Jiten*", 3ra ed., p. 1021, 1983

Documento no patente 4: Gavini, F. y otros, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, p. 337-345, 1989

Documento no patente 5: Nishizawa T. y otros, *Chem. Pharm. Bull.*, 40(2), p. 479-483, 1992

Documento no patente 6: Inagawa H. y otros, *Chem. Pharm. Bull.*, 40(4), p. 994-997, 1992

Documento no patente 7: Neilson A. H., *J. Appl. Bacteriol.*, 46(3), p. 483-491, 1979

Documento no patente 8: Nunes C. y otros, *Int. J. Food Microbiol.*, 70(1-2), p53-61, 2001

Documento no patente 9: Yamada T. y otros, "*Seibutsugaku Jiten*", 3ra ed., p. 287-288, 1983

Documento no patente 10: Nunes C. y otros, *J. Appl. Microbiol.*, 92(2), p. 247-255, 2002

Documento no patente 11: Asis C. A. Jr. y otros, *Lett. Appl. Microbiol.*, 38(1), p. 19-23, 2004

Documento no patente 12: Vanneste J. L. y otros, J. Bacteriol., 174(9), p. 2785-2796, 1992

Documento no patente 13: Kearns L. P. y otros, Appl. Environ. Microbiol., 64(5), p.1837-1844, 1998

5 Las patentes JP-A-6078756, EP 0472467 y US 5,494,819 divulgan, *inter alia*, un método de aislamiento y de posterior cultivo de bacterias de un género *Serratia*, *Enterobacter* y/o *Pantoea*.

10 Inagawa y otros, *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40(4), págs. 994-997 divulga un lipopolisacárido (LPS) desde varias fuentes y su posible valor terapéutico para varias enfermedades.

Inagawa y otros, *Anticancer Research*, 1997, 17, págs. 2153-2158 divulga un posible efecto del lipopolisacárido (LPS) extraído de la *Pantoea agglomerans*.

15 Inagawa y otros, *Biotherapy*, 1997, Volumen 11, No. 3, págs. 464-466 divulga, *inter alia*, el uso de un lipopolisacárido (LPS) como droga antialérgica.

Nishizawa y otros, *Biotherapy*, 1992, Volumen 6, No. 3, págs. 356-357 divulga un lipopolisacárido (LPS) de bajo peso molecular purificado a partir de la *Pantoea agglomerans* que exhibe una acción antiulcerosa.

20 Inagawa y otros, *Biotherapy*, 1992, Volumen 6, No. 3, págs. 358-359 divulga el uso de un lipopolisacárido (LPS) como droga analgésica para la terapia clínica del dolor.

25 Soma, *Advances in Pharmaceutical Sciences*, 2000, Volumen 16, páginas 7-22 divulga una explicación mecánica de los posibles efectos antitumorales de una administración intradérmica del lipopolisacárido (LPS).

Divulgación de la invención

Problema a resolver por la invención

30 Como se describió anteriormente, los inmunopotenciadores están a menudo contenidos en las plantas mismas y son a menudo componentes o productos de los microbios que viven en una relación simbiótica con las plantas. Por lo tanto, para obtener un inmunopotenciador derivado del producto natural que sea seguro al ingerirse, es útil extraer el componente de plantas comestibles *per se* (p.ej., glicolípido de limulus positivo, Documento de patente 1) o cultivar eficazmente el microbio que vive en una relación simbiótica con la planta comestible para adquirir su componente o producto (p.ej., los lipopolisacáridos de bajo peso molecular. Documento de patente 2). Sin embargo, el contenido de inmunopotenciador en la planta comestible es extremadamente bajo, el alimento debe ingerirse en una cantidad extremadamente grande a fin de esperar el efecto inmunopotenciador al comer, y en general no es fácil mantener una cantidad ingerida adecuada del inmunopotenciador. Por lo tanto, su efecto no puede preverse. Además, cuando el inmunopotenciador se extrae de la planta y se lo utiliza como alimento o medicamento, se requiere un alto costo y es de baja practicidad.

45 Entre tanto, al focalizarse en los microbios que viven en una relación simbiótica con una planta, la *Pantoea agglomerans* que es una bacteria simbiótica con el trigo contiene un lipopolisacárido de bajo peso molecular eficaz para la inmunoestimulación como un componente. Sin embargo, hasta ahora, para extraer el lipopolisacárido de bajo peso molecular, ha sido necesario cultivar la *Pantoea agglomerans* usando un medio costoso en donde la principal proteína contenida en el medio se deriva de un animal, p.ej., amina NZ, triptona o ácidos casamino. Por lo tanto, ha sido difícil proporcionarlo económicamente como un inmunopotenciador altamente común. Simultáneamente, la posibilidad de que sustancias nocivas desconocidas tales como las derivadas de BSE contaminen animales no podría negarse.

50 A la luz de los problemas arriba descritos, la presente invención tiene por objetivo proporcionar un método para fermentación y cultivo en donde pueda obtenerse un inmunopotenciador de forma económica y eficaz utilizando materiales seguros, un extracto vegetal fermentado obtenido mediante el método, un polvo de extracto vegetal fermentado obtenido del extracto vegetal fermentado y una composición de extracto vegetal fermentado que contiene el polvo de extracto vegetal fermentado.

Medios para resolver el problema

60 La presente invención se refiere a un método para fermentación y cultivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, y a un extracto vegetal fermentado obtenido por dicho método de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 8. El método de fermentación y cultivo de la presente invención comprende fermentar un material derivado de una planta comestible con una bacteria gram-negativa anaerobia facultativa que vive en una relación simbiótica exclusivamente con una planta y cultivar simultáneamente dicha bacteria gram-negativa anaerobia facultativa de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

65

Se desea que la bacteria gram-negativa anaerobia facultativa sea un bacilo anaerobio facultativo.

Se desea que el bacilo anaerobio facultativo pertenezca a la familia de la *Enterobacteriaceae*.

- 5 Se desea que el bacilo anaerobio facultativo pertenezca a un género *Pantoea*, *Serratia* o *Enterobacter*.

Al convertir la *Pantoea agglomerans* en bacilo anaerobio facultativo, es posible convertir al almidón en una fuente de carbono.

- 10 Es también deseable que la planta comestible se seleccione de un cereal alimentario, alga marina, judías y una mezcla de ellos.

- 15 Es también deseable que la planta comestible sea un cereal alimentario y el material derivado del cereal alimentario se seleccione de harina de trigo y polvo de arroz. En particular, dado que la harina de trigo contiene gluten como fuente de proteína, es posible fermentarla y cultivarla eficazmente incluso sin utilizar el material derivado de un animal.

- 20 Es deseable que la planta comestible sea un alga marina y el material derivado del alga marina se seleccione de polvo de algas pardas, polvo "mekabu" (hoja con esporangios de *Undaria pinnatifida*).

- 25 Cuando la planta comestible es una judía y el material derivado de judías es un deshecho de cuajada de judías, contiene la proteína abundantemente. Por lo tanto, es posible fermentarla y cultivarla eficazmente incluso sin usar el material derivado del animal.

- El extracto vegetal fermentado de la invención se obtiene mediante el método de fermentación y cultivo.

El polvo de extracto vegetal fermentado de la invención se obtiene del extracto vegetal fermentado.

- 30 La composición de extracto vegetal fermentado de la invención contiene el extracto vegetal fermentado o el polvo de extracto vegetal fermentado.

- 35 Las composiciones de extracto vegetal fermentado pueden seleccionarse de un producto farmacéutico, un producto farmacéutico para animales, un cuasi-medicamento, un producto cosmético, un alimento, un alimento funcional, un forraje, y un agente de baño.

Es deseable que el extracto vegetal fermentado tenga las siguientes propiedades fisicoquímicas.

- 40 El extracto vegetal fermentado exhibe una capacidad de activación de macrófagos incluso en presencia de polimixina B de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. El extracto vegetal fermentado tiene efecto inmunopotenciador.

Efecto de la invención

- 45 De acuerdo con la presente invención, dado que el cultivo se realiza en el medio que no contiene componentes derivados de un animal, no existe contaminación con impurezas derivadas de componentes animales. Por lo tanto, no hay posibilidad de sustancias nocivas desconocidas como las derivadas de contaminantes BSE, y es posible proporcionar un método altamente seguro y económico para producir extracto vegetal fermentado capaz de abordar varios usos previstos y proporcionar de forma segura y económica extracto vegetal fermentado o polvo de extracto vegetal fermentado que contiene el inmunopotenciador. Además, es posible proporcionar la solución de cultivo, el
50 inmunopotenciador y el extracto y el polvo de extracto, y otros productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi-medicamentos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, forraje, y agentes de baño que contienen el extracto o el polvo del extracto.

- 55 Jamás se ha concebido y no existen hechos fácilmente presumidos a partir de los hallazgos de la tecnología de fermentación convencional de que la fermentación y cultivo puedan realizarse mediante un simple proceso por el que material derivado de una planta comestible es exclusivamente fermentado por la bacteria gram-negativa anaerobia facultativa que vive en una relación simbiótica con una planta y simultáneamente la bacteria gram-negativa anaerobia facultativa se cultiva.

- 60 Puede utilizarse si el FNT se produce a partir de macrófagos o no (acción inductora de FNT) como un indicador de que cierta sustancia exhibe el efecto inmunopotenciador. Además, el efecto inmunopotenciador puede cuantificarse por la cantidad de FNT producido. Por lo tanto, la producción de FNT a partir de macrófagos fue examinada utilizando un glicolípido vegetal de limulus positivo derivado de la harina de trigo y el lipopolisacárido de bajo peso molecular derivado de la *Pantoea agglomerans*. La producción de FNT a partir de macrófagos fue interrumpida por
65 el tratamiento con polimixina B tanto en el glicolípido vegetal de limulus positivo derivado de la harina de trigo como en el lipopolisacárido de bajo peso molecular derivado de la *Pantoea agglomerans*. Sin embargo, se demostró en

varios Ejemplos que incluso cuando el extracto vegetal fermentado de la presente invención fue tratado con polimixina B, se produjo FNT a partir de los macrófagos. Esto indica que el extracto vegetal fermentado obtenido por la fermentación y cultivo tiene un efecto inmunopotenciador cualitativamente diferente a los efectos inmunopotenciadores debido a los componentes de la planta misma, que ha sido el material y el microbio mismos
5 usados para la fermentación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista que muestra los efectos inhibitorios de la ocurrencia de herpes de koi por forrajes que
10 contienen un extracto de trigo fermentado.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación se describen en detalle realizaciones adecuadas de la presente invención.

15 I. Función esencial del método para producir extracto vegetal fermentado usando la *Pantoea agglomerans*

En la presente invención, hemos detectado por primera vez que la *Pantoea agglomerans* puede crecer directamente
20 utilizando almidón como fuente de carbono, y hemos inventado un método para producir de modo económico un extracto de trigo fermentado que contiene abundantemente el inmunopotenciador como producto fermentado y un producto cultivado utilizando la *Pantoea agglomerans*. Esto puede proporcionar cuasi-medicamentos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales y forrajes ecológicos y seguros eficaces para la prevención de infecciones en seres humanos y en los campos de la industria animal y la acuicultura.

25 1: Aislamiento de *Pantoea agglomerans*

Cuando la harina de trigo se suspende en agua y se aplica el sobrenadante en un medio de cultivo agar L y se
30 cultiva, aparecen colonias de microbios. En estas colonias, los microbios se identifican mediante métodos estándar. Por ejemplo, los que tienen las mismas propiedades que la *Pantoea agglomerans* estándar se seleccionan mediante la selección de las colonias que son coloración de gram negativa, reacción de metabolismo anaeróbico de glucosa positivo y acción oxidasa negativa y utilizando una prueba de identificación EB-20 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.). La *Pantoea agglomerans* estándar está disponible en el Instituto de Investigación Física y Química, Bioresource Center (Documento no patente 4). En la siguiente descripción, el porcentaje es un valor en peso salvo indicación en
35 contrario.

2: Evaluación de la acción de inmunopotenciación

En las presentes realizaciones, como indicador del efecto inmunopotenciador que exhibe el extracto de trigo
40 fermentado, se evaluó la capacidad de activación de macrófago mediante la producción de FNT a partir de los macrófagos.

3: Lipopolisacárido de bajo peso molecular derivado de *Pantoea agglomerans*

Como uno de los componentes activos inmunopotenciados por la fermentación y cultivo utilizando la *Pantoea*
45 *agglomerans*, se anticipa que contiene lipopolisacáridos de bajo peso molecular derivados de la *Pantoea agglomerans*. Los lipopolisacáridos de bajo peso molecular tienen notablemente una más alta seguridad y actividad biológica superior que los lipopolisacáridos de alto peso molecular (normalmente lipopolisacáridos) utilizados comúnmente. Por lo tanto, se midió el contenido del lipopolisacárido de bajo peso molecular. Los lipopolisacáridos de bajo peso molecular se describen en detalle en el Documento de patente 2. El presente Ejemplo
50 se refiere a un extracto de trigo fermentado, pero la presente invención no significa que la planta se limita a trigo y que el inmunopotenciador se limita a lipopolisacáridos de bajo peso molecular.

Pantoea agglomerans puede cultivarse utilizando un método de conocimiento público (Documento de patente 2,
55 Documento no patente 8), pero los principales componentes de proteínas contenidos en el medio de cultivo son derivados de los animales, y el costo del medio es alto. Además, cuando el alimento funcional y el forraje funcional se suministran al animal, o se usan percutáneamente, la contaminación con impurezas derivada de los animales tipificados por BSE es problemática en términos de inocuidad de los alimentos, y además, el costo de producción se torna elevado y el método es de pobre practicabilidad. Por lo tanto, como resultado de un extenso estudio para obtener un producto natural seguro y económico que tenga la acción inmunopotenciadora, los inventores de la
60 presente han completado el método de fermentación y cultivo utilizando la *Pantoea agglomerans* para obtener el extracto de trigo fermentado como se muestra en los Ejemplos. El principal componente de la proteína contenida en el medio de cultivo fue derivado de forma convencional de los animales, pero la presente invención hizo que éste sea derivado de las plantas. Normalmente, el producto obtenido mediante la descomposición de la proteína tal como derivados de la caseína de la leche de vaca con una enzima digestiva se agrega a la solución de cultivo. En este
65 caso, el costo primario por litro del medio es alrededor de 250 yen, pero si pudiera reemplazarse por la harina de trigo, el costo primario es de alrededor de 16 yen. A fin de concentrar altamente y fusionar sinérgicamente la acción

inmunopotenciadora derivada tanto de la planta como del microbio que vive en una relación simbiótica con ella, jamás se ha llevado a cabo la fermentación.

5 Los contenidos de la invención se describen a continuación como Ejemplos, pero la presente invención no se limita a la *Pantoea agglomerans* como el microbio, al trigo como una planta comestible o a la harina de trigo como el material descrito en los presentes Ejemplos. La presente invención puede también aplicarse a un material obtenido mediante un proceso típico de otras plantas comestibles que contienen el inmunopotenciador abundantemente, p.ej., algas pardas, cereales alimentarios (que contienen harina de trigo, polvo de arroz, que es un material derivado de cereales alimentarios), algas marinas (que contienen polvo de algas pardas, polvo de mekabu, que es un material derivado de las algas marinas), y judías (que contienen el desecho de cuajada de judías, que es un material derivado de las judías). Se conoce que las proteínas y los azúcares están contenidos en estas plantas. Estas plantas pueden aplicarse a la fermentación y al cultivo utilizando la *Pantoea agglomerans*. Es ampliamente conocido que las bacterias indígenas, p.ej., bacterias que pertenecen al género *Serratia* o *Enterobacter*, viven en una relación simbiótica con estas plantas (Documento no patente 4). Como cuestión de rutina, los microbios utilizados para la fermentación incluyen bacterias gram-negativas anaerobias facultativas que viven en una relación simbiótica con estas plantas.

II: Síntesis de puntos importantes de la presente invención

- 20 (1) El extracto de trigo fermentado mismo como la sustancia que tiene la acción de inmunopotenciación producida por fusión del trigo, la *Pantoea agglomerans* que es la bacteria simbiótica asociada a ella y los productos fermentados por una combinación de ellos son novedosos, pero la presente invención no se limita a ello.
- 25 (2) Es una novedad producir un extracto vegetal fermentado utilizando la *Pantoea agglomerans* que es la bacteria gram-negativa, pero la presente invención no se limita a ello.

III: Método específico para producir extracto de trigo fermentado

- 30 (1) La *Pantoea agglomerans* se aísla de la harina de trigo a través del método estándar (Documento no patente 1). Una vez aislada e identificada, esta bacteria puede almacenarse en 50 % de glicerol.
- 35 (2) Se preparan 0,05 a 5 % de sal, 0,005 a 1 mol de tampón de fosfato, o una solución salina mixta (0,5 a 10 % de fosfato de sodio (II), 0,05 a 5 % de fosfato de potasio (I), 0,05 a 5 % cloruro de sodio, 0,05 a 5 % de cloruro de amonio).
- (3) La harina de trigo se suspende en una concentración de 0,05 a 10 % en agua.
- (4) Se prepara una solución de 0,2 a 3 moles de cloruro de magnesio
- 40 (5) Se prepara una solución de 0,2 a 3 moles de cloruro de calcio.
- (6) En algunos casos, se esterilizan soluciones de (2) a (5) mediante autoclave, etc.
- 45 (7) Las soluciones de (2) a (5) se mezclan en cantidades adecuadas, y se agrega agua para crear una suspensión que contiene 0,1 a 5 % de harina de trigo. En algunos casos, el pH se neutraliza agregando una solución alcalina o una solución ácida.
- (8) En algunos casos, el almidón de trigo puede digerirse parcialmente agregando a (7) 10 a 50.000 unidades de amilasa por litro del medio e incubando a 10 a 80 °C durante 1 a 24 horas.
- 50 (9) La *Pantoea agglomerans* aislada en (1) se agrega a (7) u (8).
- (10) (9) se fermenta a 1 a 40 °C. En algunos casos, el recipiente de fermentación puede dejarse quieto o agitarse. Alternativamente, puede llevarse a cabo una agitación cada varias horas.
- 55 (11) (10) es fermentado durante 6 horas a una semana. Cuando la fermentación avanza, la solución de harina de trigo desarrolla un color amarillo.
- (12) La solución alcalina puede agregarse opcionalmente durante la fermentación de (11) para neutralizar el pH, o puede agregarse suspensión de harina de trigo o sales inorgánicas.
- 60 (13) La fermentación finaliza, y se recoge un componente sólido como un precipitado mediante centrifugado (1.000 a 5.000 rpm, 10 a 60 minutos). El precipitado puede utilizarse directamente como un producto de harina de trigo fermentada para el forraje o como la materia prima para mezclar con el forraje.

65

(14) En caso de producir extracto de trigo fermentado, (13) se suspende en agua o tapón de sal, que luego se calienta a 80 a 140 °C durante 10 minutos a 6 horas. El componente sólido puede quitarse mediante centrifugado o filtrado. El agua o el tapón pueden agregarse nuevamente al precipitado removido para repetir la extracción por calentamiento varias veces.

5 (15) El extracto de trigo fermentado producido en (14) puede ser simplemente purificado aún más dependiendo de los usos previstos. Es decir, cuando se agrega al extracto (14) la sal tal como el cloruro de sodio en una concentración final de 0,05 a 1 mol/L y posteriormente se agrega el solvente tal como etanol en una a tres veces la cantidad del extracto, ocurre un precipitado. Éste puede recogerse por centrifugación. Este precipitado puede ser lavado aún más con un solvente tal como etanol. Cuando éste se seca, puede crearse un polvo.

A. Ejemplos relativos a un método para producir extracto de trigo fermentado

Ejemplo 1

15 Estudio de crecimiento de *Pantoea agglomerans* en medio de harina de trigo

Para confirmar si la *Pantoea agglomerans* que es la bacteria simbiótica nativa con el trigo puede crecer utilizando la harina de trigo como la fuente de carbono, se examinó el crecimiento de la *Pantoea agglomerans* en un medio sólido de harina de trigo.

(1) Se creó un medio agar M9 que contenía 0,5 % de harina de trigo como la fuente de carbono.

25 (2) Una colonia de *Pantoea agglomerans* se recogió del medio agar LB, y se la suspendió en 1 ml de PBS. Esta fue diluida secuencialmente 10 veces a 10.000 veces, y se sembró 0,1 ml de cada alícuota en el medio agar M9 de (1).

(3) Tras cultivarlo a 37 °C durante 6 días, se observó la aparición de colonias. Como resultado, se observaron alrededor de 300 colonias en una placa de Petri donde se habían sembrado 0,1 ml de la dilución 10.000 veces.

30 Esto ha confirmado que la *Pantoea agglomerans* puede utilizar harina de trigo como la fuente de carbono.

Ejemplo 2

35 Producción de extracto de trigo fermentado

(1) Se agregó agua destilada (5ml) a 0,5 g de harina de trigo a suspender, se agregó 0,1ml del sobrenadante al medio de cultivo agar L, y se cultivó a 37 °C durante toda la noche.

40 (2) Se aisló una colonia amarilla, se identificó una bacteria a través de los métodos estándar, la *Pantoea agglomerans* fue aislada, suspendida en 50 % de solución de glicerol, y almacenada en un freezer. Una parte de esta sustancia se aplicó en el medio agar LB, que se dejó quieto a 37 °C para hacer una colonia independiente de *Pantoea agglomerans*.

45 (3) En un frasco de 2 litros, se agregaron 64 g de fosfato de sodio (II) heptaidratado, 15 g de fosfato de potasio (I), 2,5 g de cloruro de sodio, y 5 g de cloruro de amonio, y se agregó agua purificada para hacer un volumen total de un litro (solución mixta de sal inorgánica). El agua purificada se agregó a 13,1 g de cloruro de magnesio dihidratado para hacer que el volumen total sea 100 ml (solución de cloruro de magnesio). Se agregó agua purificada a 11,1 g de cloruro de calcio para hacer que el volumen total sea 100 ml (solución de cloruro de calcio). El agua purificada (4 L) se agregó en un frasco cónico de 5 L (agua purificada). Las soluciones anteriores y el agua purificada se esterilizaron mediante autoclave (TOMY BS-325, 120 °C durante 20 minutos).

50 (4) Se agregó harina de trigo (24 g) (Nisshin Flour Milling Co., Ltd.) a un frasco cónico de 1 L y se agregó agua purificada para hacer que el volumen total sea 600 ml. Tras autoclave similar de ello, se agregó 3 mg de α -amilasa (SIGMA, Bacillus, acción enzimática de 1500 a 3000 unidades por mg de la proteína), y se calentó en un baño de agua a 65 °C durante 12 horas (solución de harina de trigo tratada con amilasa).

55 (5) Las soluciones preparadas y lo similar en las cantidades mostradas en la Tabla 1 se colocaron en un frasco Sakaguchi esterilizado de 3 L para crear una harina de trigo media.

60 Tabla 1

Materiales	Dosificación
Solución mixta de sal inorgánica	200ml
Agua purificada	550ml
Solución de harina de trigo tratada con amilasa	200ml

ES 2 542 986 T3

Solución de cloruro de magnesio	2,0ml
Solución de cloruro de calcio	0,1ml

5 (6) Preparación de inóculo: una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de la harina de trigo en (2) se agregó a 10 ml del medio de harina de trigo de (5) preparada previamente en la misma composición, y fermentada mediante agitación suave a 37 °C durante toda la noche (12 a 15 horas) para preparar el inóculo para la fermentación de la harina de trigo.

10 (7) La cantidad total de (6) se agregó a (5), y se fermentó a 37 °C durante 20 a 30 horas con agitación. El pH de la solución fermentada se midió y ajustó en pH 7 agregando agua amoniacal. Estérilmente, se agregó a ello 150 ml de la solución de harina de trigo tratada con amilasa y 37,5ml de la solución mixta de sal inorgánica, y de modo similar se fermentaron durante 20 a 30 horas. La misma manipulación se repitió para fermentar por un total de 65 a 80 horas.

15 (8) La solución de harina de trigo fermentada se centrifugó (Hitachi, centrifugadora de enfriamiento de alta velocidad, SCR-20B, 5.000 rpm, 20 minutos, 4 °C), y se recogió el precipitado.

20 (9) Se agregó un tampón de fosfato al precipitado de (8), que luego se suspendió para hacer que el volumen total sea 100 ml, cada 33 ml de alícuota se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml, y se extrajo el calor en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. Una vez terminado el calentamiento, la solución se enfrió a temperatura ambiente, y se centrifugó (Hitachi, centrifugadora de enfriamiento de alta velocidad, SCR-20B, 10.000 rpm, 20 minutos, 20 °C). Luego de la centrifugación, se recogieron 82 ml del sobrenadante con un color amarillo pálido en otro recipiente por decantación.

25 (10) La solución de cloruro de sodio (8,9 ml, 5 moles) se agregó a 80 ml del sobrenadante en (9). Cuando se agregó a ello 178 ml de etanol, ocurrió una turbidez blanca. Esto se dejó quieto en un freezer (-90 °C) durante toda la noche, y luego la solución se centrifugó (Hitachi, centrifugadora de enfriamiento de alta velocidad, SCR-20B, 10.000 rpm, 20 minutos, 4 °C). El precipitado se obtuvo removiendo el sobrenadante. Luego de agregar 10 ml de 70 % de etanol enfriado al precipitado, que luego se suspendió, la solución se centrifugó (Hitachi, centrifugadora de enfriamiento de alta velocidad, SCR-20B, 10.000 rpm, 20 minutos, 20 °C), y el precipitado se lavó. El precipitado se secó con aire y se disolvió en agua destilada para producir 11ml del extracto de trigo fermentado.

35 (11) Medición de peso en seco: 0,3 ml se transfirieron a un tubo plástico de 1,5 ml previamente pesado, y luego de congelarse, se llevó a cabo la liofilización mediante un liofilizador, y consecuentemente el peso fue 7,45 mg. Por lo tanto, el peso en seco del extracto de trigo fermentado en (10) fue 24,8 mg por 1 ml de la solución y 273 mg por cantidad total de 11 ml.

40 (12) El extracto de trigo fermentado se produjo 8 veces independientemente mediante el mismo método, y se midió la proteína en cada muestra mediante el método Bradford utilizando la cuantificación de proteína BSA como la proteína estándar. Como objetos comparativos, se utilizaron el glicolípido purificado de limulus positivo (Documento de patente 1) y el lipopolisacárido de bajo peso molecular (Documento de patente 2). Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 2. En las Tablas 2 a 5 y 7, un valor numérico para el extracto de trigo fermentado se representó como el contenido por mg por 1 g del peso obtenido secando el extracto de trigo fermentado obtenido en el punto (10) anterior.

45 (13) Medición de contenido de azúcar: El contenido de azúcar se midió mediante un método de sulfato de fenol utilizando glucosa como el azúcar estándar. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 3.

50 (14) Medición del contenido de ácido nucleico: Se midió la absorbencia a 210 a 340 nm de la muestra diluida 100 veces. El contenido máximo se calculó utilizando un valor obtenido mediante la sustracción de la absorbencia a 320 nm a partir de la absorbencia a 260 nm y 50mg por 10D de absorbencia como DNA. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 4.

55 (15) Medición de contenido de sustancia de limulus activa mediante ensayo de limulus: Para la medición, se utilizó un sistema Toxi-color provisto por Seikagaku Corporation, y se usó el Et-1 de Seikagaku Corporation como la sustancia activa de limulus estándar. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 5.

60 (16) Reacción yodo-almidón: Un reactivo de yodo 1N (10 ml de agua fue agregada a 12,7 g de yodo y 25 g de yoduro de potasio, mezclado cuidadosamente, y luego se agregó agua para llegar a 100 ml) se diluyó 200 veces con agua en uso. Esto (5 µL) se agregó a 0,1 ml del extracto de trigo fermentado previamente disuelto a una concentración de 1 mg/mL, y se mezcló cuidadosamente. En el extracto de trigo fermentado, la solución desarrolló inmediatamente un color púrpura pálido a púrpura oscuro (positivo). En el glicolípido de limulus positivo y el lipopolisacárido de bajo peso molecular, la misma manipulación no indujo a dicho desarrollo de color (negativo). Los resultados arriba mencionados se resumen en la Tabla 6.

5 Como es aparente a partir de los resultados anteriores, es obvio que el extracto de trigo fermentado es diferente al
 10 glipolípido limulus positivo y el lipopolisacárido de bajo peso molecular en cuanto al contenido de proteína, el
 contenido de azúcar, el contenido de ácido nucleico (salvo el glipolípido limulus positivo dado que no existen datos),
 el contenido de sustancia de limulus positiva y la reacción yodo-almidón, y es claro que la presente sustancia es
 novedosa. Los resultados arriba mencionados se resumen en la Tabla 7. Es decir, el extracto vegetal fermentado en
 los presentes Ejemplos es novedoso, y es diferente al glipolípido de limulus positivo y al lipopolisacárido de bajo
 peso molecular en cuanto exhibe las siguientes propiedades fisicoquímicas. El extracto de trigo fermentado exhibe
 un contenido de proteína de 5 a 15 %, contenido de azúcar de 20 a 45 %, contenido de ácido nucleico de 10 a 35 %
 y contenido de sustancia limulus positiva content de 10 a 40 %, y es de reacción yodo-almidón positiva, y exhibe la
 capacidad de activación de los macrófagos incluso en presencia de la polimixina B.

Tabla 2

Contenido de proteína en extracto fermento	
Muestra	Contenido de proteína (mg/g)
Extracto de trigo fermentado 1	60
Extracto de trigo fermentado 2	71
Extracto de trigo fermentado 3	90
Extracto de trigo fermentado 4	105
Extracto de trigo fermentado 5	103
Extracto de trigo fermentado 6	82
Extracto de trigo fermentado 7	88
Extracto de trigo fermentado 8	88
Glipolípido limulus positivo	40
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	3,8 o menos

15 Tabla 3

Contenido de azúcar en extracto fermentado	
Muestra	Contenido de azúcar (mg/g)
Extracto de trigo fermentado 1	318
Extracto de trigo fermentado 2	428
Extracto de trigo fermentado 3	313
Extracto de trigo fermentado 4	232
Extracto de trigo fermentado 5	372
Extracto de trigo fermentado 6	324
Extracto de trigo fermentado 7	298
Extracto de trigo fermentado 8	329
Glipolípido limulus positivo	133
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	668

Tabla 4

Contenido de ácido nucleico en extracto fermentado	
Muestra	Contenido de ácido nucleico (mg/g)
Extracto de trigo fermentado 1	102
Extracto de trigo fermentado 2	102
Extracto de trigo fermentado 3	226
Extracto de trigo fermentado 4	291
Extracto de trigo fermentado 5	302
Extracto de trigo fermentado 6	240
Extracto de trigo fermentado 7	218
Extracto de trigo fermentado 8	216
Glipolípido limulus positivo	No reportado
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	2,8

20

Tabla 5

Contenido de sustancia de limulus activa en extracto fermentado	
Muestra	Contenido de sustancia de limulus activa (mg/g)
Extracto de trigo fermentado 1	242
Extracto de trigo fermentado 2	18

Extracto de trigo fermentado 3	125
Extracto de trigo fermentado 4	458
Extracto de trigo fermentado 5	224
Extracto de trigo fermentado 6	231
Extracto de trigo fermentado 7	356
Extracto de trigo fermentado 8	289
Glipolípido limulus positivo	970
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	993

Tabla 6

Reacción yodo-almidón del extracto fermentado	
Muestra	Determinación
Extracto de trigo fermentado 1	Positivo
Extracto de trigo fermentado 2	Positivo
Extracto de trigo fermentado 3	Positivo
Extracto de trigo fermentado 4	Positivo
Extracto de trigo fermentado 5	Positivo
Extracto de trigo fermentado 6	Positivo
Extracto de trigo fermentado 7	Positivo
Extracto de trigo fermentado 8	Positivo
Glipolípido limulus positivo	Negativo
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	Negativo

5 Tabla 7

Resumen de diferencias entre el extracto de trigo fermentado y productos similares					
Muestra	Contenido de proteína	Contenido de azúcar	Contenido de ácido nucleico	Contenido de sustancia de limulus activa	Reacción yodo-almidón
Extracto de trigo fermentado (Media ± Desviación estándar)	86±15mg/g	327± 57mg/g	212± 75mg/g	255± 113mg/g	Positivo
Glipolípido limulus positivo	Muy inferior	Muy inferior	No medido	Muy por encima	Negativo
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	Muy inferior	Muy por encima	Muy inferior	Muy por encima	Negativo
Muy inferior: valores considerablemente inferiores al rango de valores del extracto de trigo fermentado (Media ± Desviación estándar) Muy por encima: valores considerablemente superiores al rango de valores del extracto de trigo fermentado (Media ± Desviación estándar)					

Ejemplo 3

10

Acción inmunopotenciadora del extracto de trigo fermentado

15

Se colocó un medio de línea celular leucémica mielógena aguda, THP-1 ($1 \times 10^6/250 \mu\text{L}$, RPMI1640 que contenía 10 % de suero fetal bobino) utilizado como macrófagos humanos en una placa de 48 pocillos, y se las precultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 250 μL del medio (volumen final 500 μL) de modo tal que la concentración final de cada muestra fue 1 a 10, 000 ng/mL. Las muestras se proporcionaron con un grupo que contenía polimixina B (12,5 $\mu\text{g/ml}$). Tras cultivarlo durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes del cultivo y las células. La actividad de FNT en los sobrenadantes se midió mediante un ensayo de citotoxicidad usando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los macrófagos produjeron FNT incluso en presencia de polimixina B por el extracto de trigo fermentado, pero con la presencia de la polimixina B, los macrófagos no podían producir FNT mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular y el glipolípido de limulus positivo. A partir de ello, es obvio que el extracto de trigo fermentado tiene una actividad biológica diferente a la del lipopolisacárido de bajo peso molecular y del glipolípido de limulus positivo.

25

Tabla 8

Producción de FNT a partir de macrófagos mediante el extracto de trigo fermentado y el efecto inhibitorio de la polimixina B (acción de inducción de FNT del extracto de trigo fermentado)						
Concentración de la muestra (ng/ml)	Extracto de trigo fermentado con agregado de polimixina B	Extracto de trigo fermentado sin agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin agregado de polimixina B	Glipolípido limulus positivo con agregado de polimixina B	Glipolípido limulus positivo sin agregado de polimixina B
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0,64	0	1,2
10	0	1,2	0	6,3	0	4,2
100	0	8,7	0	10,2	0	14,2
1000	1,7	28,3	0	6,3	0	26,2
10000	26	50,4	0	3,8	0	13,2

B. Ejemplo de aplicación de extracto de trigo fermentado a forraje

Ejemplo 4

5 Forraje para pollos de criadero que contiene extracto de trigo fermentado (efecto inhibitorio de mortalidad en criaderos en un estudio a gran escala)

10 Se produjo un forraje que contenía 430 µg/kg del extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2. Se utilizaron pollos comerciales de criadero con alrededor de 5.500 a 6.000 pollos por grupo. En el grupo de prueba de control, se suministró el forraje que no contenía extracto de trigo fermentado. El forraje que contenía el extracto de trigo fermentado se suministró a los pollos a las 3 semanas de vida luego de la incubación, y se administró diariamente hasta las 7 semanas de vida. Diariamente se contó la cantidad de gallos muertos. Los gallos que no cumplían el estándar al momento del envío se descartaron. Los resultados se muestran en la Tabla 9. La tasa de remoción fue 1,9 % en el grupo de prueba (forraje que contenía el extracto de trigo fermentado) que era bajo, y 3,3 % en el grupo de control. Una tasa creciente fue de 98,1 % en el grupo de ensayo y 96,7 % en el grupo de control. Por lo tanto, se observó un aumento del 1,4 % en la tasa de crecimiento. Se realizó un estudio de la significación estadística de las diferencias de la cantidad de gallos realmente enviados y la cantidad de gallos quitados entre el grupo de ensayo y el grupo de control, y se observó la diferencia significativa de $p < 0,0001$ en el ensayo X2. A partir de lo anterior, se mostró el efecto de protección contra infecciones del forraje que contenía el extracto de trigo fermentado en la cría de pollos.

Tabla 9

Efectos del forraje que contiene extracto de trigo fermentado en criadero de pollos		
	Grupo de ensayo	Grupo de control
Cantidad de pollos	5906	5525
Cantidad de pollos realmente enviada	5792	5345
Cantidad de pollos removidos	114	180
Tasa de remoción	1,9 %	3,3 %
Tasa de crecimiento	98,1 %	96,7 %

Ejemplo 5

30 Forraje para peces cultivados que contiene extracto de trigo fermentado (efecto preventivo de infecciones en pruebas al aire libre de serviolas)

35 Para examinar el efecto de prevención de infecciones, se cultivaron alrededor de 5.200 serviolas por grupo en una prueba al aire libre mediante el forraje que contenía el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 10. La mortalidad a causa de *Streptococcus* en un grupo no administrado alcanzó el 4,8 %. En el grupo donde se ingirió 100 µg/kg/día (por peso corporal 1 kg y por cada día) (grupo de ensayo), se observó que la mortalidad se redujo significativamente ($p < 0,00001$) en comparación al grupo no administrado (grupo de control).

Tabla 10

Efecto de la prevención de infecciones del forraje que contiene extracto de trigo fermentado en serviolas en una prueba al aire libre				
Tratamiento	Cantidad de peces criados	Cantidad de peces muertos	Mortalidad	Prueba de diferencia significativa (prueba X2)

Grupo de control	5201	249	4,79	0
Grupo de ensayo	5193	101	1,94	(P<0,00001)

Ejemplo 6

5 Forraje para peces cultivados que contiene extracto de trigo fermentado (efecto preventivo de infecciones en herpes de koi)

(1) Carpa: se usaron carpas blancas cuyo peso corporal era 70 g. La prueba se realizó utilizando 20 carpas por grupo.

10 (2) Preparación de herpes de koi: se agregaron 10ml de solución salina balanceada Hanks (HBSS) a 1 g de *branchi* de las carpas que murieron de infección de herpes de koi, y se la homogeneizó, filtró con un filtro de 0,45 µm, y su filtrado se convirtió en una solución viral.

15 (3) Infección con virus herpes de koi: El filtrado anterior (600 µL /100 g peso corporal) se inyectó por vía intraperitoneal.

(4) Preparación de forraje que contiene extracto de trigo fermentado: Se mezclaron 0,5, 10 y 20 mg/kg de los extractos de trigo fermentado producidos en el Ejemplo 2 con un forraje disponible en el comercio.

20 (5) Método de alimentación: Cada forraje de 1 % de peso por peso corporal se suministró una vez al día. Esto corresponde a 0,50, 100 o 200 µg/kg de peso corporal/día en términos de la cantidad del extracto de trigo fermentado.

25 (6) Experimento: El forraje que contenía el extracto de trigo fermentado se suministró durante una semana, luego se infectó a las carpas con el virus, y posteriormente se suministró el forraje que contenía el extracto de trigo fermentado por 10 días. Se observó una tasa de supervivencia de las carpas por 10 días tras la infección con el virus. Los resultados se muestran en FIG. 1.

30 Al final del sexto día, todas las carpas del grupo al cual no se había suministrado el extracto de trigo fermentado habían muerto. En tanto, se demostró que en los grupos donde se había suministrado el extracto de trigo fermentado, la tasa de supervivencia aumentó significativamente en el día 10 luego de la infección (método Kaplan Meier, prueba log-rango, el porcentaje de riesgo fue 0,01 % o menos). En particular, la tasa de supervivencia de 65 % se mostró en el grupo donde se suministró 100 µg/kg peso corporal/día del extracto de trigo fermentado.

35 C. Ejemplos de aplicación del extracto de trigo fermentado a productos cosméticos y agentes de baño

Ejemplo 7

40 Producción de crema para manos que contiene extracto de trigo fermentado

El extracto de trigo fermentado en aproximadamente 10 % producido en el Ejemplo 2 fue mezclado con una pomada de un sustrato liposoluble 1 en una formulación descrita en la Tabla 11 para obtener la pomada.

Tabla 11

45

Composición	Dosis
Vaselina blanca	250 g
Alcohol estearílico	200 g
Alcohol propileno	120 g
Aceite de ricino curado con polioxietileno 60	40 g
Monoesterato de glicerina	10 g
Paraoxibenzoato de metilo	1 g
Paraoxibenzoato de propilo	1 g
Agua purificada	Cantidad razonable

Ejemplo 8

50 Producción de crema humectante que contiene extracto de trigo fermentado

1. Formulación de crema humectante que contiene extracto de trigo fermentado

Los componentes utilizados se muestran en la Tabla 12. La combinación A se calentó y disolvió a 70 °C, y se agregaron a ella la combinación B mezclada en agua purificada en una cantidad de 1/4 y calentada/disuelta a 70 °C y la combinación C mezclada en agua purificada en una cantidad de 1/4 y calentada/disuelta a 70 °C. La mezcla se mezcló cuidadosamente mediante un homogeneizador y luego enfriada a 40 °C. Luego se agregó la combinación D, y se ajustó el pH a 6,8. Posteriormente, el agua purificada remanente y el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se agregaron en una cantidad adecuada, y mezclados cuidadosamente para obtener una loción lechosa. El extracto de trigo fermentado fue disuelto previamente a 5 mg/mL en agua purificada, y 0,1 ml del mismo fue agregado a 100 g de la loción lechosa.

10 Tabla 12

Componentes	% p/p	Combinación
Escualano	5,0	A
Aceite de oliva	10,0	A
Aceite de jojoba	5,0	A
Ácido esteárico	4,0	A
Monoestearato de sorbitán polioxietilenado (20E.O.)	1,8	A
Polisiloxano de metilo	0,3	A
Monoestearato de sorbitán	0,5	B
Monoestearato de glicerina autoemulsionado	3,0	B
Paraoxibenzoato de metilo	0,2	B
Paraoxibenzoato de propilo	0,2	B
1,3-Butilenglicol	5,0	B
Glicerina concentrada	6,0	B
Polímero de carboxivinilo	0,22	C
Hidróxido de potasio	Cantidad razonable	D
Extracto de trigo fermentado (5mg/ml)	0,1	
Agua purificada	Cantidad razonable	
Cantidad total	100,00	

2. Efecto de la crema humectante que contiene extracto de trigo fermentado

15 Esta crema fue utilizada por 43 hombres y mujeres, y se llevó a cabo una encuesta mediante cuestionario. Como resultado, para el efecto humectante, 18 personas contestaron que hubo realmente un efecto humectante, 18 personas contestaron que hubo un leve efecto humectante, 2 personas contestaron que no hubo efecto humectante, y 5 personas no contestaron (prueba de signos de una muestra: $p < 0,0001$). Para un efecto mejorado en pieles ásperas, 6 personas contestaron que fue realmente efectiva, 13 personas contestaron que fue levemente efectiva, ninguna persona contestó que no hubo efectos, y 24 personas no contestaron (prueba de signos de una muestra: $p < 0,0001$). En cuanto al deterioro de la condición de la piel, ninguna persona contestó que hubo deterioro. Esta crema fue utilizada por 4 personas con síntomas atópicos leves, y se les realizó la encuesta por cuestionario. Para la mejora de la dermatitis atópica, 3 personas contestaron que fue realmente efectiva, y una contestó que fue levemente efectiva (prueba de signos de una muestra: $p < 0,125$). Además, uno contestó que las cicatrices provocadas por el acné se recuperaron rápidamente. Esta crema fue utilizada por 9 hombres luego de afeitarse, y se les realizó la encuesta por cuestionario. Ocho hombres contestaron que había sido efectiva para la reducción del dolor luego de afeitarse, la prevención de sequedad y la cura rápida de cortes de la afeitadora (prueba de signos de una muestra: $p < 0,01$). Además, esta crema fue usada por 2 personas que tenían los síntomas de hombros entumecidos a causa de la edad, aplicándola sobre los hombros para reducir el dolor. Una persona contestó que la crema fue efectiva.

Además, esta crema se usó para pacientes con lesiones de quemaduras. En pacientes con lesiones de quemaduras en la piel de ambas manos de igual extensión, la crema que contenía el extracto de trigo fermentado producida en el Ejemplo 2 se aplicó en una mano, y la crema que no contenía extracto de trigo fermentado se aplicó en la otra mano. La mano tratada con la crema que contenía el extracto de trigo fermentado obviamente se recuperó más rápido. Esta crema fue utilizada para 10 pacientes con lesiones de quemaduras incluyendo este caso. En consecuencia, en todos los lugares tratados con la crema que contenía el extracto de trigo fermentado, las heridas se curaron más rápido que en los lugares tratados con la crema que no contenía el extracto de trigo fermentado (probabilidad exacta de Fisher: $p < 0,0001$). A partir de lo anterior, se demostró que el extracto de trigo fermentado exhibió el efecto terapéutico sobre las lesiones de quemaduras.

Ejemplo 9

Producción de loción para piel que contiene extracto de trigo fermentado

45

1. Formulación de loción para piel que contiene extracto de trigo fermentado

Los componentes utilizados se muestran en la Tabla 13. El extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 fue disuelto previamente en 5 mg/mL en agua purificada, y 0,1 ml del mismo se agregó a 100g de la loción para piel.

5 Tabla 13

Componentes	%
Citrato de socio	0,1
Pirrolidona carboxilato de sodio	1,0
1,3-Butilenglicol	5,0
POE(30)POP(6) deciltetradecil éter	0,6
Agua purificada	Cantidad razonable
Extracto de trigo fermentado (5mg/ml)	0,1
Conservante	Cantidad razonable
Etanol	10,0
Cantidad total	100,0

2. Efectos de la loción para la piel que contiene extracto de trigo fermentado

10 Esta loción para la piel fue usada por 5 mujeres, y se realizó una encuesta por cuestionario. Como resultado, 3 mujeres contestaron que la loción tenía una buena acción humectante, y 2 mujeres contestaron que tenía la acción humectante normal. Ninguna de las mujeres tenía problemas en la piel.

15 Ejemplo 10

Producción de agente de baño que contiene extracto de trigo fermentado

20 Se creó un agente de baño que contenía el extracto de trigo fermentado a fin de mejorar las funciones corporales. Los componentes básicos del agente de baño se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14

Componentes	Contenido
Sulfato de socio	25,0 g
Silicato de calcio	0,26 g
Perfume (yuzu (<i>citrus junos</i>))	0,5 g

25 El agente de baño que contenía el extracto de trigo fermentado se creó agregando 110 µg del extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 a los componentes mencionados anteriormente. El agente de baño contenía el extracto y el agente de baño que no contenía extracto se suministraron aleatoriamente a 102 sujetos, que luego los usaron en una bañera (160 a 200 litros) al tomar le baño, y se realizaron los cuestionarios [(1) grado de calentamiento del cuerpo, (2) dificultad para sentir frío tras el baño, (3) efecto de recuperación de fatiga, (4) facilidad para dormir, (5) grado de recuperación de entumecimiento en los hombros, (6) efecto sobre el dolor muscular, (7) efecto sobre el dolor neural, (8) efecto sobre el dolor lumbar, (9) efecto sobre la sensibilidad a temperaturas frías, (10) efecto de mejoramiento sobre culebrilla del pie, (11) efecto de mejora sobre piel seca, (12) efecto sobre la dermatitis atópica]. Como resultado, un 7 % o más de la mejora comparada con el control se observó en (1) el grado de calentamiento del cuerpo (10 %), (2) la dificultad para sentir frío tras el baño (7,9 %), (6) el efecto sobre el dolor muscular (13 %), (8) el efecto sobre el dolor lumbar (16 %), (9) el efecto sobre la sensibilidad a temperaturas frías (10 %) y (11) la mejora sobre la piel seca (7,3 %) (prueba de Mantel-Haenszel: p<0,04). A partir de los resultados anteriores, se observaron efectos de relajación sobre los dolores y mejoras en el calentamiento del cuerpo utilizando el extracto de trigo fermentado como agente de baño.

40 D. Ejemplo de aplicación del extracto de trigo fermentado a alimentos funcionales

Ejemplo 11

Producción de caramelo que contiene extracto de trigo fermentado

45 (1) Como materia prima, se mezcló azúcar granulada, jarabe de almidón, mezcla de agua y el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 en una proporción de 5:5:5:1, y se cocieron mediante calentamiento a 120 °C a 160 °C. (2) Se obtuvieron los caramelos enfriando lo obtenido en (1) sobre una placa de acero para enfriamiento, extendiéndose en forma de palo, y moldeándolo en formas de granos de alrededor de 1 g.

50

Una cantidad adecuada de estos caramelos se colocaron en 20 ml de agua, y se disolvieron por calentamiento. Se midió en esta solución la cantidad de lipopolisacárido y el componente activo del extracto de trigo fermentado, y en consecuencia era de 4,6 µg/g. Este caramelo fue ingerido por 6 hombres y mujeres que estaban resfriados y con angina. Luego, se realizó la encuesta para la angina por cuestionario. Para la angina, las 6 personas sintieron un alivio (prueba de signos de una muestra: $p < 0,03$).

Ejemplo 12

Producción de alimentos funcionales con descomposición alcohólica que contiene extracto de trigo fermentado

El extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se mezcló con un producto disponible en el comercio como un alimento funcional con descomposición alcohólica, y se examinó si se observó o no un alivio de la faringalgia como una nueva acción.

Producto disponible en el comercio: marca "Nonde oiki"

Los componentes se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15

Componentes	Tasa de contenido de componente
Azúcar pulverizada	78,98 %
Vitamina C	10,00 %
Toyoriden-P	5,00 %
Vitamina B2	0,02 %
Perfume (mentol)	0,50 %
Jiaogulan (<i>Gynostemma pentaphylla</i>) (saponina)	3,50 %
Concentrado de aromatizante T 13189B (flavonoide)	2,00 %

El "Nonde oiki" actual contiene el extracto de jiaogulan (*Gynostemma pentaphylla*) y el extracto de té verde, pero contiene solo alrededor de 0,002 µg por paquete de lipopolisacárido que es uno de los componentes activos del extracto vegetal. Por lo tanto, se prevé que adquirirá una nueva función agregando la cantidad adecuada de extracto de trigo fermentado que contiene lipopolisacárido abundantemente. Es deseable combinar 1 a 30 µg por 2 g de paquete de lipopolisacárido que es uno de los componentes activos del extracto de trigo fermentado (5 a 150 µg como extracto de trigo fermentado). Por lo tanto, se produjo primero el producto en donde se había combinado 50 µg del extracto de trigo fermentado en un paquete. En el proceso de producción de Nonde oiki, se agregó 2,5 mg del extracto de trigo fermentado por cada 100 g del producto. Como resultado, se produjo un nuevo producto que contenía 50 µg del extracto de trigo fermentado por cada 2 g de producto.

Se sometió a 20 hombres y mujeres adultas que tenían faringalgia luego de tomar bebidas y divertirse en un karaoke, y se suministró "Nonde oiki" común y "Nonde oiki" que contenía el extracto de trigo fermentado a 10 personas, respectivamente, y se examinó una acción mejorada de una capacidad de descomposición alcohólica que era la acción conocida públicamente un efecto aliviador de la faringalgia. Inmediatamente tras ello, se realizó la encuesta por cuestionario en cuanto al efecto de alivio de la faringalgia. Como resultado, se observó una reducción de la faringalgia en 8 de 10 personas que habían recibido "Nonde oiki" que contenía el extracto de trigo fermentado, y en 2 de 10 personas que habían recibido "Nonde oiki" común. Por lo tanto, se observó una diferencia estadísticamente significativa (probabilidad exacta de Fisher: $p < 0,012$) en comparación al control.

E. Ejemplo relativo a los beneficios medicinales del extracto de trigo fermentado

Ejemplo 13

Producción de solución de glicerol que contiene extracto de trigo fermentado (efecto terapéutico sobre la dermatitis atópica)

Una solución de 50 % de glicerol que contenía 50 µg/mL del extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se suministró 2 o 3 veces al día con una dosis de 2 a 3 ml por administración a 9 pacientes masculinos y femeninos con dermatitis atópica refractaria (25 a 34 años de edad) donde se observaban erupciones en la cara, manos y piernas, tronco, cuello, brazos y espalda, y los síntomas subjetivos eran moderados a severos. Los síntomas subjetivos (prurito) se clasificaron en niveles leve, moderado y severo según las quejas de los pacientes. Dos semanas a dos meses luego de comenzar a usarla, los pacientes volvieron a la visita, y se evaluaron los efectos. En los resultados, los casos de respuesta total (mejora notable de erupciones y casi desaparición del síntoma subjetivo) fue 4 (44 %), los casos de respuesta parcial (leve mejoría de erupciones y reducción del síntoma subjetivo) fue 4 (44

%), el caso donde no se vieron cambios fue uno (11 %) y el caso de deterioro fue 0 (prueba de signos de una muestra: $p < 0,03$). A partir de los resultados anteriores, se determinó que una tasa efectiva era 89 %.

Ejemplo 14

5

Efecto analgésico del extracto de trigo fermentado

10 El extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se disolvió en agua destilada, y 0,2 ml por ratón se administró por vía oral a ratones utilizando una sonda. Luego de 90 minutos, 0.7 % de ácido acético se administró por vía interperitoneal a los ratones. Tras observar a los ratones durante 5 minutos, se contó la cantidad de retorcimiento provocado durante 30 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 16 como la cantidad de cada muestra requerida para inhibir 30 % de la cantidad de retorcimientos en el control de agua destilada. Cuando la actividad eficaz del lipopolisacárido de bajo peso molecular derivado de la *Escherichia coli* era 1, la actividad eficaz del extracto de trigo fermentado era 7, mostrando que el extracto de trigo fermentado exhibió un excelente efecto analgésico.

15

Tabla 16

Efecto analgésico del extracto de trigo fermentado en dolor inducido por ácido acético en ratones		
Tratamiento	Cantidad que induce a inhibición 30	Actividad relativa
Agua destilada	230±190 mg	1
Extracto de trigo fermentado	33±35 mg	7,0

20

Ejemplo 15

Efecto inhibitorio del extracto de trigo fermentado en dermatitis atópica

25 Para examinar el efecto del extracto de trigo fermentado en dermatitis atópica, se introdujo un modelo de alergia tipo I. Se administró por vía intravenosa un anticuerpo monoclonal dinitrofenilo (1 µg/ratón) a ratones BALB/c machos (3 a 4 por grupo). Luego de una hora, el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se administró por vía intracutánea (sitio abdominal) (4 µg /ratón) u oral (100 µg /ratón). Luego de otra hora adicional, se aplicó 20 µL de una solución mixta (4:1) de aceite de oliva-acetona que contenía 0,25 % de dinitrofluorobenceno como un alérgeno en la superficie y cara posterior del pabellón de una oreja de un ratón. El grosor del pabellón de la oreja se midió usando un calibrador 1, 2, 24 y 48 horas luego de la aplicación. El valor (Δ) obtenido sustrayendo el espesor justo antes de la aplicación era un nivel de edema. El efecto de la administración de la droga se evaluó mediante la tasa de inhibición obtenida por la siguiente fórmula en la inhibición en una reacción de fase temprana observada una hora luego de la administración del alérgeno y una reacción retardada inducida tras 24 horas.

30

35

Tasa de inhibición = $(1 - \Delta \text{ Edema del pabellón de oreja tras la administración de la droga} / \Delta \text{ Edema del pabellón de oreja en el control}) \times 100$. Los resultados se muestran en la Tabla 17. Como puede verse en la tabla, el extracto de trigo fermentado inhibió una reacción alérgica tanto mediante la administración intracutánea como oral.

Tabla 17

40

Efecto inhibitorio del extracto de trigo fermentado en reacción alérgica			
Método de administración del extracto de trigo fermentado	Dosificación (/ratón)	Tasa de inhibición (%) (luego de una hora)	Tasa de inhibición (%) (luego de 24 horas)
Administración intracutánea	4 µg	81,0	102,1
Administración oral	100 µg	41,3	60,8

Ejemplo 16

45

Efecto de prevención de infecciones del extracto de trigo fermentado

50 A fin de examinar el efecto de prevención de infecciones del extracto de trigo fermentado, se introdujo un modelo de infección de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente a la meticilina. Se administró ciclofosfamida (CY, 200mg/kg) por vía intraperitoneal a ratones BALB/c machos (6 a 8 semanas de vida) (10 por grupo), y luego de 5 días, se administró el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 por vía intracutánea. Luego de 3 horas, se administró MRSA (3 x 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC)) por vía intravenosa, y se examinó la cantidad de días de supervivencia. Los resultados se muestran en la Tabla 18. Como surge de la tabla, el extracto de trigo fermentado exhibió el efecto de prevención de infecciones en MRSA con una diferencia estadísticamente significativa (prueba X²: $p < 0,001$) en comparación al grupo salino (control).

55

Tabla 18

Efecto de prevención del extracto de trigo fermentado sobre la infección MRSA		
Medicamento administrado	Tasa de supervivencia	Tasa de riesgo
Salina	0/10	
Extracto de trigo fermentado (0,004 µg)	9/10	P<0,001
Extracto de trigo fermentado (0,04 µg)	6/10	P<0,005

Ejemplo 17

Efecto terapéutico del extracto de trigo fermentado en cáncer metastásico

5

A fin de examinar el efecto terapéutico del extracto de trigo fermentado en cáncer metastásico, se introdujo un modelo de metástasis de pulmón de células Meth A. Las células cancerígenas Meth A (1 x 10⁵ células) se administraron intravenosamente a ratones BALB/c machos (6 a 8 semanas de vida) (10 por grupo), y tras 12 días, el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se administró intracutáneamente durante 4 días consecutivos. Veinte días luego de trasplantar las células, se realizó una autopsia, se extrajo el pulmón y se lo fijó con formalina. Se observó el pulmón a simple vista y se contó la cantidad de nodos. Los resultados se muestran en la Tabla 19. Como surge de la tabla, el extracto de trigo fermentado exhibió el efecto terapéutico sobre cáncer metastásico de pulmón Meth A con una diferencia estadísticamente significativa (prueba-t: p<0,001) en comparación al grupo salino (control).

10

15

Tabla 19

Efecto terapéutico de extracto de trigo fermentado en cáncer metastásico Meth A		
Medicamento administrado	Cantidad de nodos (Media ± Desviación estándar)	Tasa de riesgo
Salina	60 ± 11	
Extracto de trigo fermentado (40 µg/kg)	33 ± 8	P<0,001
Extracto de trigo fermentado (400 µg/kg)	19 ± 6	P<0,001

F. Ejemplos relativos a extracto de desecho de cuajada de judías fermentado

20

Ejemplo 18

Producción de extracto de desecho de cuajada de judías fermentado

25

(1) 1,0 L de agua, 0,2 g de fosfato de potasio (I), 1,15 g de fosfato de sodio II, 8 g de sal común y 0,2 g de cloruro de potasio se agregaron a un frasco cónico de 2 litros.

(2) Se agregó un desecho de cuajada de judías seco (20g) a (1).

30

(3) (2) se esterilizó mediante autoclave.

35

(4) Preparación de inóculo: Una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de la harina de trigo se agregó a 5ml de 2 % de un medio de desecho de cuajada de judías preparada previamente en la misma composición, y fermentada a 37 °C durante toda la noche (15 horas) agitando suavemente para preparar el inóculo para la fermentación del desecho de cuajada de judías.

(5) La cantidad total de (4) se agregó a (3), y se fermentó a 37 °C durante 48 horas 2 agitando suavemente.

40

(6) La solución de desecho de cuajada de judías fermentado de (5) se extrajo mediante calentamiento a 120 °C durante 20 minutos en autoclave. Esto se centrifugó (Kubota 8800, 2.000 rpm, 10 minutos), y se recogió el sobrenadante para crear un extracto de desecho de cuajada de judías fermentado.

45

(7) Medición del peso seco: 0,3 ml se transfirió a un tubo plástico de 1,5 ml previamente pesado, y luego de congelarse, se realizó la lipofilización mediante el lipofilizador, y en consecuencia el peso fue 5,97 mg. Por lo tanto, el peso seco del extracto de desecho de cuajada de judías fermentado de (6) fue 19,9 mg por de la solución y 19,9 g por monto total de 1.000 ml.

50

(8) La cantidad de proteína se midió en la muestra diluida 10 veces mediante el método Bradford usando la cuantificación de proteínas BSA como la proteína estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

(9) Medición del contenido de ácido nucleico: Se midió la absorbencia en 210 a 340 nm de la muestra diluida 100 veces. El contenido máximo se calculó utilizando un valor obtenido sustrayendo la absorbencia a 320 nm desde la absorbencia a 260 nm y 50 µg por 10D de absorbencia como DNA.

5 (10) Medición de contenido de azúcar: El contenido de azúcar se midió mediante el método de sulfato fenol utilizando la glucosa como el azúcar estándar.

(11) Medición de sustancia limulus activa mediante ensayo de limulus: Para la medición, se utilizó un sistema Toxi-color provisto por Seikagaku Corporation, y se usó Et-1 de Seikagaku Corporation como la sustancia activa de limulus estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20

Contenidos de componentes en extracto de desecho de cuajada de judías fermentado	
Componentes	(mg/g)
Proteína	112
Azúcar	537
Ácido nucleico	No detectable
Limulus active substance	10

15 Ejemplo 19

Acción inmunopotenciadora de extracto de desecho de cuajada de judías fermentado

20 Se colocó una línea celular leucémica mielógena aguda, THP-1 ($1 \times 10^6/250 \mu\text{L}$, medio RPMI1640 que contiene 10 % de suero fetal bovino) utilizado como macrófagos humanos en una placa de 48 pocillos, y se pecultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 250 µL del medio (volumen final 500 µL) de modo que la concentración final de cada muestra fue 100 a 10.000 ng/mL. Las muestras se proporcionaron con un grupo que contenía polimixina B (12,5 µg/mL) (ningún grupo contenía polimixina B solo a 100 ng/mL). Luego de cultivar durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes y las células del cultivo. La actividad FNT en el sobrenadante se midió mediante una prueba de citotoxicidad utilizando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Los macrófagos produjeron FNT incluso en presencia de polimixina B por medio del extracto de desecho de cuajada de judías fermentado, pero en presencia de la polimixina B, los macrófagos no pudieron producir FNT mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular. A partir de ello, es obvio que el extracto de desecho de cuajada de judías fermentado tiene una actividad biológica diferente a la del lipopolisacárido de bajo peso molecular.

30

Tabla 21

Producción de FNT a partir de macrófagos mediante extracto de desecho de cuajada de judías fermentado y efecto inhibitorio de polimixina B (actividad inductora de FNT de extracto de desecho de cuajada de judías fermentado)						
Actividad inductora de FNT de extracto de desecho de cuajada de judías fermentado y efecto inhibitorio de polimixina B (acción FNT)						
Concentración de muestra (ng/ml)	Extracto de desecho de cuajada de judías fermentado con agregado de polimixina B	Extracto de desecho de cuajada de judías fermentado sin agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin agregado de polimixina B	Extracto de trigo fermentado con agregado de polimixina B	Extracto de trigo fermentado sin agregado de polimixina B
0	0	0	0	o.	0	0
100	N.R.	0,45	0	0,39	0	3,27
1000	0,38	4,6	0	0,42	0,5	11,3
10000	11,1	11,1	0	0,28	14,4	25,3
N.R.: No realizado						

35 G. Ejemplos relativos a extracto de polvo de arroz fermentado

Ejemplo 20

Producción de extracto de polvo de arroz fermentado

40 (1) Se agregó 1,0 L de agua, 0,2 g de fosfato de potasio (I), 1,15 g de fosfato de sodio II, 8 g de sal común y 0,2 g de cloruro de potasio a un frasco cónico de 2 litros.

(2) Se agregó un polvo de arroz seco (20g) a (1).

(3) (2) se esterilizó por autoclave.

5 (4) Preparación de inóculo: Una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de la harina de trigo se agregó a 5 ml de un medio de polvo de arroz al 2 % preparado previamente en la misma composición, y se fermentó a 37 °C durante toda la noche (15 horas) agitando suavemente para preparar el inóculo para la fermentación del polvo de arroz.

10 (5) La cantidad total de (4) se agregó a (3), y se fermentó a 37 °C durante 72 horas agitando suavemente.

(6) La solución de polvo de arroz fermentado de (5) se extrajo mediante calentamiento a 120 °C durante 20 minutos en el autoclave. Esto se centrifugó (Kubota 8800, 2.000 rpm, 10 minutos), y se recogió el sobrenadante para hacer un extracto de polvo de arroz fermentado.

15 (7) Medición de contenido de limulus active substance mediante ensayo de limulus: Para la medición, se utilizó un sistema Toxi-color provisto por Seikagaku Corporation, y se usó Et-1 de Seikagaku Corporation como la standard limulus active substance. El contenido de la limulus active substance en el extracto de polvo de arroz fermentado se midió en 1.7µg/mL.

20 Ejemplo 21

Acción de inmunopotenciación del extracto de polvo de arroz fermentado

25 Se colocó una línea celular leucémica mielógena aguda, THP-1 (1 x 10⁶/250 µL, RPMI1640 medio que contenía 10 % de suero fetal bovino) utilizado como macrófagos humanos en una placa de 48 pocillos, y se la precultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 250 µL del medio (volumen final 500 µL) de modo tal que la concentración final de cada muestra fue 1 a 10.000 ng/mL. Las muestras se proporcionaron con un grupo que contenía polimixina B (12,5 µg/mL). Tras cultivarlo durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes del cultivo y las

30 células. La actividad de FNT en los sobrenadantes se midió mediante un ensayo de citotoxicidad usando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 22. Los macrófagos produjeron FNT incluso en presencia de polimixina B por el extracto de polvo de arroz fermentado, pero con la presencia de la polimixina B, los macrófagos no podían producir FNT mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular. A partir de ello, es obvio que el extracto de polvo de arroz fermentado tiene una actividad biológica diferente a la del lipopolisacárido de bajo peso molecular y del glicolípido

35 limulus positivo.

Tabla 22

Producción de FNT a partir de macrófagos mediante extracto de polvo de arroz y efecto inhibitorio de polimixina B (actividad inductora de FNT del extracto de polvo de arroz fermentado)				
Concentración de muestra (ng/ml)	Extracto de polvo de arroz fermentado con agregado de polimixina B	Extracto de polvo de arroz fermentado sin agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin agregado de polimixina B
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0,1
10	0	0	0	2,2
100	0	0,1	0	6,1
1000	0,1	0,6	0	23,9
10000	0,5	2,4	0	29,3

40 H. Ejemplos relativos a extracto de algas pardas fermentadas

Ejemplo 22

Producción de extracto de algas pardas mekabu fermentadas

45 (1) 1,0 L de agua, 0,2 g de fosfato de potasio (I), 1,15 g de fosfato de sodio II, 8 g de sal común y 0,2 g de cloruro de potasio se agregaron a un frasco cónico de 2 litros.

(2) Se agregó algas pardas mekabu (20g) a (1).

50 (3) (2) se esterilizó mediante autoclave.

(4) Preparación de inóculo: Una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de la harina de trigo se agregó a 5 ml de 2 % de un medio de algas pardas mekabu preparado previamente en la misma composición, y fermentado a 37 °C durante toda la noche (15 horas) agitando suavemente para preparar el inóculo para la fermentación de las algas pardas mekabu.

5

(5) La cantidad total de (4) se agregó a (3), y se fermentó a 37 °C durante 72 horas agitando suavemente.

(6) La solución de algas pardas mekabu fermentada de (5) se extrajo mediante calentamiento a 120 °C durante 20 minutos en autoclave. Esto se centrifugó (Kubota 8800, 2.000 rpm, 10 minutos), y se recogió el sobrenadante para hacer un extracto de algas pardas mekabu fermentadas.

10

(7) Medición de contenido de sustancia de limulus activa mediante ensayo de limulus: Para la medición, se utilizó un sistema Toxi-color provisto por Seikagaku Corporation, y se usó Et-1 de Seikagaku Corporation como la sustancia de limulus activa estándar. El contenido de la sustancia de limulus activa en el extracto de algas pardas mekabu fermentadas se midió en 132 µg/mL.

15

Ejemplo 23

Acción de inmunopotenciación del extracto de algas pardas mekabu fermentadas

20

Se colocó un línea celular leucémica mielógena aguda, THP-1 (1 x 10⁶/250 µL, RPMI1640 medio que contenía 10 % de suero fetal bovino) utilizado como macrófagos humanos en una placa de 48 pocillos, y se la precultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 250 µL del medio (volumen final 500 µL) de modo tal que la concentración final de cada muestra fue 1 a 10.000 ng/mL. Las muestras se proporcionaron con un grupo que contenía polimixina B (12,5 µg/mL). Tras cultivarlo durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes del cultivo y las células. La actividad de FNT en los sobrenadantes se midió mediante un ensayo de citotoxicidad usando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 23. Los macrófagos produjeron FNT incluso en presencia de polimixina B por el extracto de polvo de arroz fermentado, pero con la presencia de la polimixina B, los macrófagos no podían producir FNT mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular. A partir de ello, es obvio que el extracto de polvo de arroz fermentado tiene una actividad biológica diferente a la del lipopolisacárido de bajo peso molecular y del glicolípido limulus positivo.

25

30

Tabla 23

Producción de FNT a partir de macrófagos mediante extracto de algas pardas mekabu fermentadas y efecto inhibitorio de polimixina B (actividad inductora de FNT del extracto de polvo de arroz fermentado)				
Concentración de muestra (ng/ml)	Extracto de algas pardas mekabu fermentadas con agregado de polimixina B	Extracto de algas pardas mekabu fermentadas sin agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con agregado de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin agregado de polimixina B
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0,1
10	0	0	0	2,2
100	0	3,2	0	6,1
1000	2,4	14,4	0	13,9
10000	18,7	31,8	0	29,3

35

Aplicación industrial

De acuerdo con la presente invención, es posible producir de modo económico el extracto vegetal fermentado que es un inmunopotenciador seguro. El extracto vegetal fermentado así obtenido puede utilizarse en productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi-medicamentos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, forraje, y agentes de baño para mamíferos incluyendo seres humanos (en particular, animales domésticos, mascotas, etc.), aves (en particular, pollos de criadero, pájaros domésticos, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en particular, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para fermentación y cultivo que comprende fermentar un material seleccionado de harina de trigo, polvo de arroz, polvo de salvado de trigo, salvado de arroz, *sake lees*, polvo de algas pardas mekabu, polvo de laminarias y desechos de cuajada de judías, con una bacteria gram-negativa anaerobia facultativa que vive en una relación simbiótica exclusivamente con una planta y cultivar simultáneamente dicha bacteria gram-negativa anaerobia facultativa.
- 10 2. El método de fermentación y cultivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha bacteria gram-negativa anaerobia facultativa pertenece a los géneros *Pantoea*, *Serratia* o *Enterobacter*.
- 15 3. El método de fermentación y cultivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha bacteria gram-negativa anaerobia facultativa es *Pantoea agglomerans*.
- 20 4. Un extracto vegetal fermentado obtenido por el método de fermentación y cultivo de acuerdo con la reivindicación 3, donde el material fermentado se selecciona de harina de trigo, polvo de arroz, polvo de algas pardas mekabu y desechos de cuajada de judías, donde dicho extracto vegetal fermentado exhibe una capacidad de activación macrófaga incluso en presencia de 12,5 µg/ml de polimixina B y en una concentración del extracto vegetal fermentado de 1000 a 10000 ng/ml.
- 25 5. El extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 4, que posee una actividad inmunopotenciadora.
- 30 6. El polvo de extracto vegetal fermentado obtenido a partir del extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 4.
7. Una composición de extracto vegetal fermentado que contiene el extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 4 o el polvo de extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 6.
8. La composición de extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicha composición de extracto vegetal fermentado se selecciona de un producto farmacéutico, un producto farmacéutico para animales, un cuasi-medicamento, un producto cosmético, un alimento, un alimento funcional, un forraje y un agente de baño.

FIG. 1

EFFECTO INHIBITORIO DE FORRAJE QUE CONTIENE EXTRACTO DE TRIGO FERMENTADO EN INCIDENCIA DE HERPES KOI

