

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 830**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)	A61K 36/899	(2006.01)
A23L 7/104	(2006.01)		
A23L 33/105	(2006.01)		
A61K 35/74	(2015.01)		
A61P 37/04	(2006.01)		
C12P 1/04	(2006.01)		
C12P 19/04	(2006.01)		
A61K 36/03	(2006.01)		
A61K 36/48	(2006.01)		
A61K 36/88	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2004** **E 11009396 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2444480**

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:
03.02.2017

73 Titular/es:

SOMA, GEN-ICHIRO (50.0%)
1-10-21, Higashi-Tamagawa, 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 2 599 830 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 fármacos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, pienso y agentes de baño para mamíferos incluidos los seres humanos (en concreto, animales domésticos, mascotas, etc.), aves (en concreto, pollos de granja, aves domésticas, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en concreto, 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 por el método de fermentación y cultivo, polvo que contiene el inmunopotenciador obtenido a partir del extracto vegetal fermentado y una composición de extracto vegetal fermentado que contiene el extracto vegetal fermentado.

Técnica anterior

20 Es un problema imperioso establecer métodos de prevención de enfermedades y terapéuticos que incluyan tecnología de prevención de infecciones para los mamíferos, incluyendo a seres humanos (en concreto, animales domésticos, mascotas, etc.), aves (en concreto, pollos de granja, aves domésticas, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en concreto, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados. Además, para conseguir esto, se necesitan mayormente métodos que no utilicen químicos, sin contaminación ambiental, sin producir bacterias resistentes y sin acumulación en el cuerpo humano. Los inventores del presente documento ya han encontrado para los problemas anteriores que los inmunopotenciadores obtenidos de las plantas, tal como el extracto acuoso de trigo, consiguen de forma segura los efectos de prevención de enfermedades y terapéuticos (Documento de patente 1, Documento no de patente 1). Además, para conseguir el objetivo anterior, los presentes inventores han encontrado que es posible utilizar lipopolisacáridos de bajo peso molecular obtenidos a partir de *Pantoea agglomerans*, que es una bacteria simbiótica del trigo (Documento no de patente 2). Entre tanto, estudios recientes han demostrado que diversas sustancias, además de los lipopolisacáridos, presentan el efecto de inmunopotenciación, y estos materiales naturales plurales que contienen el inmunopotenciador han llamado la atención.

35 La tecnología de fermentación que utiliza microbios se ha utilizado comúnmente no solo en los campos de alimentos sino también en campos amplios. La fermentación se ha utilizado ampliamente 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 muchos, y las levadura de la malta de arroz (hongo) y bacterias las ácido-lácticas son representativas, pero rara vez se ha informado sobre el uso de bacterias gramnegativas. En general, la fermentación es un fenómeno donde la materia orgánica se descompone por la acción de los microbios, y en sentido amplio significa que el microbio produce una sustancia útil (Documento no de patente 3). Los ejemplos de la fermentación que utiliza 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 gramnegativas, se ha conocido la fermentación de metano que utiliza bacterias metanógenas, la fermentación acética que utiliza bacterias del ácido acético y la fermentación de etanol (fermentación de tequila) a partir rizomas de maguey utilizando *Zymomonas mobilis*, pero rara vez se han conocido cultivos de fermentación que utilizan una planta comestible como material y utilizan el microbio caracterizado por vivir en una relación simbiótica con la planta, y el inmunopotenciador jamás ha llamado la atención como un producto fermentado. Aún más, el método de fermentación y cultivo con el propósito de producir el inmunopotenciador jamás ha llamado la atención.

Entre tanto, cuando la fermentación la realiza 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 para el microbio es fundamental, es decir, que están contenidos de forma suficiente monosacáridos tales como la glucosa y la 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 necesita un pretratamiento tal como calentamiento y tratamiento enzimático para la fermentación por parte del microbio. Por ejemplo, el mencionado *Zymomonas mobilis* es un microbio utilizado para la fermentación de tequila. En este caso, los polisacáridos obtenidos de los rizomas de maguey, que no es una planta comestible, se descomponen en monosacáridos fermentables mediante calentamiento y, posteriormente, el microbio fermenta los monosacáridos para producir el alcohol como el producto de fermentación. Por lo tanto, cuando se realiza el cultivo de fermentación utilizando un microbio típico, los polisacáridos tales como el almidón no son adecuados como sustrato de fermentación. Por ejemplo, se ha descrito que *Pantoea agglomerans* no puede descomponer el almidón (Documento no de patente 4).

Los inventores han demostrado que está contenido en un extracto acuoso de harina de trigo un componente activo para potenciar la inmunidad (Documento no de patente 5). También han demostrado 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 de patente 6). En cuanto a esta actividad biológica, se ha encontrado que tiene efectos preventivos sobre enfermedades de seres humanos y de ratones (diabetes, hiperlipemia, dermatitis atópica, cáncer) y puede ser eficaz para la prevención de infecciones de peces, crustáceos y gallinas (Documento de patente 1, Documento no de patente 1). Sin embargo, para poder esperar efecto anterior por parte del extracto acuoso de harina de trigo, es necesario ingerir la harina de trigo en gran cantidad.

Entre tanto, *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 suministra fósforo y nitrógeno al trigo (Documento no de patente 7). Además, *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 de patente 8). Se ha definido que la simbiosis es "un fenómeno en que los organismos xenogénicos viven juntos. En este caso, es común que signifique mantener de forma constante una relación conductualmente o fisiológicamente cercana. Por lo tanto, no entra en este concepto solo vivir en el mismo hábitat. La simbiosis se clasifica y divide en diversas categorías dependiendo de la forma de vida y esencialmente del compañero simbiótico, la sostenibilidad de la relación y el posicionamiento espacial del compañero simbiótico. En general, la simbiosis se divide en sentido amplio en tres, mutualismo, comensalismo y parasitismo, a base de la presencia o ausencia del beneficio/no beneficio para la vida de los compañeros simbióticos." (Documento no de patente 9). Se ha conocido que *Pantoea agglomerans* se separa del trigo en algunas regiones y en algunos tipos (Documento no de patente 5) y también se separan de las frutas (Documentos no de patente 10, 11). Se ha descrito que *Pantoea agglomerans* protege a las plantas de los hongos y de otras bacterias mediante la producción de antibióticos (Documentos no patente 12, 13) y que realiza la fijación de fósforo y nitrógeno (Documento no de patente 7). Por lo tanto, se considera que *Pantoea agglomerans* está siempre presente en plantas y desempeña un papel para otorgar beneficios a las plantas. Por lo tanto, su modo de vida se considera una "simbiosis" y no un "parasitismo". Además, los inventores han demostrado que el componente activo para potenciar la inmunidad está contenido en *Pantoea agglomerans*. Además, hemos encontrado que el polisacárido de bajo peso molecular obtenido a partir de esta bacteria tiene efectos preventivos de enfermedades de seres humanos y ratones (diabetes, hiperlipemia, dermatitis atópica, cáncer) y es eficaz para la prevención de infecciones en peces, crustáceos y gallinas (Documento de patente 3, Documento no de patente 2).

Bajo tal circunstancia, los inventores han concebido la idea de establecer un método para producir un extracto vegetal fermentado usando *Pantoea agglomerans* como un método para producir un inmunopotenciador seguro y económico. Es decir, se han centrado en (1) el cultivo de *Pantoea agglomerans* a bajo costo utilizando un medio que contiene componentes de proteína principales incluidos en una solución de cultivo obtenida de plantas, así como fermentar un componente vegetal y (2) preparar de forma abundante materiales que contengan *Pantoea agglomerans*, contenidos en la planta o un producto, mediante fermentación, desarrollando de tal modo productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi fármacos, productos cosméticos, alimentos funcionales, alimentos, pienso y agentes de baño, para mamíferos incluyendo seres humanos (en concreto, animales domésticos, mascotas, etc.), aves (en concreto, pollos de granja, aves domésticas, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en concreto, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados. Sin embargo, esto no significa que el microbio que vive en relación simbiótica con una planta pueda utilizar directamente los componentes de la planta, por ejemplo, el material obtenido de una planta comestible como un sustrato de fermentación. Por ejemplo, la harina de trigo es una sustancia orgánica compuesta de almidón y similares, presente en granos de trigo, pero aislada de *Pantoea agglomerans* que es un microbio simbiótico con el trigo a través de la piel externa, y que no hace contacto directo. Por lo tanto, no puede demostrarse mediante una relación simbiótica del microbio con el trigo si *Pantoea agglomerans* puede fermentarse y cultivarse o no usando harina de trigo. De hecho, no se ha conocido ni descrito que *Pantoea agglomerans* pueda asimilar la harina de trigo. Por el contrario, basado en hechos de conocimiento público, se ha descrito que *Pantoea agglomerans* no puede utilizar almidón de trigo como sustrato de fermentación.

Los hidratos de carbono contenidos en las plantas en general se retienen como almidón, y esto es notable en plantas comestibles, en concreto cereales alimentarios. Normalmente, los microbios no tienen una función en la cual el almidón se asimile de forma elevada. En este aspecto, se ha conocido que una parte de las bacterias gramnegativas facultativas pueden fermentar almidón. Por ejemplo, se sabe que *Erwinia* tiene la capacidad de asimilar almidón. Sin embargo, en esta fermentación, cuando se fermenta almidón, se pretende utilizar una actividad amilasa del microbio agregando el microbio cultivado en una gran cantidad en otro medio óptimo, y jamás se ha concebido que el propio cultivo se realice utilizando almidón y que la fermentación se realice de forma conjunta con él. En la tecnología convencional, se considera que la fermentación objetiva no solo utiliza de forma eficaz la actividad amilasa del microbio, y no se programa para crecer al microbio utilizando almidón como sustrato. Entre tanto, en los Ejemplos de la presente invención, se divulga que además del crecimiento del microbio se produce un producto fermentado utilizando almidón como única fuente carbono, y la presente invención es significativamente distinta de la tecnología convencional en que el presente Ejemplo no solo es fermentación sino también fermentación y cultivo.

Por otro lado, si un determinado microbio conserva 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 añadido al inicio del cultivo es extremadamente pequeña. En tal caso, incluso si el microbio tiene ligeramente actividad amilasa, esta actividad es demasiado débil para descomponer de forma suficiente el sustrato y no se consigue el crecimiento del microbio. De hecho, se ha considerado que muchos de los microbios no pueden crecer utilizando almidón como única fuente de carbono.

Sin embargo, si la fermentación y cultivo pueden realizarse utilizando *Pantoea agglomerans* en el medio que contiene harina de trigo como principal componente, para producir un extracto vegetal fermentado (en lo sucesivo en este documento, el extracto vegetal fermentado obtenido por fermentación y cultivo utilizando *Pantoea agglomerans* en el medio que contiene harina de trigo como el componente principal, se denomina extracto de trigo fermentado) que contiene en forma abundante un inmunopotenciador a bajo costo, como ejemplos concretos, deberían poder proporcionarse productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi fármacos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, pienso y agentes de baño que sean ecológicos, seguros y eficaces para la prevención de infecciones para seres humanos y en los campos de la industria animal y la acuicultura. La presente invención se ha completado aprovechando la oportunidad de haberse descubierto que *Pantoea agglomerans* crecía usando harina de trigo como sustrato en el contexto anterior y llevando a cabo muchos experimentos de forma extensa.

El extracto vegetal fermentado que proporciona la presente invención es un término genérico que incluye una solución de cultivo en sí misma, obtenida realizando fermentación y cultivo, un componente líquido obtenido mediante separación de sólido/líquido de esta solución de cultivo, y un componente líquido obtenido proporcionando un proceso de extracción de un componente sólido obtenido mediante la separación sólido/líquido, y similar. Es decir, el extracto vegetal fermentado incluye la solución de cultivo en sí, obtenida mediante el método de fermentación y cultivo de acuerdo con la presente invención, y todos los extractos tienen la capacidad de prepararse utilizando toda o una parte de la solución de cultivo. Aunque es una cuestión de rutina, el extracto vegetal fermentado puede utilizarse secándolo como un polvo de extracto vegetal fermentado o disolviendo el polvo de extracto vegetal fermentado en una concentración opcional en una solución apropiada, por ejemplo, solución de tampón fosfato incluyendo solución salina normal.

[Documento de patente 1]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º de publicación H3-218466

[Documento de patente 2]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º de publicación H8-198902

[Documento de patente 3]: documento WO 00/57719

[Documento de patente 4]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º publicación H6-78756

[Documento de patente 5]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º publicación H4-187640

[Documento de patente 6]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º publicación H4-49240

[Documento de patente 7]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º publicación H4-99481

[Documento de patente 8]: Solicitud de patente japonesa no examinada N.º publicación H5-155778

[Documento no de patente 1]: Inagawa, H. *et al.*, *Biotherapy* 5(4), p. 617-621, 1991

[Documento no de patente 2]: Soma G. *et al.*, "Tumor necrosis Factor: Molecular and Cellular Biology and Clinical Relevance", p. 203-220, 1993

[Documento no de patente 3]: Yamada T. *et al.*, "*Seibutsugaku Jiten*", 3ª ed., p. 1021, 1983

[Documento no de patente 4]: Gavini, F. *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, p. 337-345, 1989

[Documento no de patente 5]: Nishizawa T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 40(2), p. 479-483, 1992

[Documento no de patente 6]: Inagawa H. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 40(4), p. 994-997, 1992

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

[Documento no de patente 8]: Nunes C. *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.*, 70(1-2), p53-61, 2001

[Documento no de patente 9]: Yamada T. *et al.*, "*Seibutsugaku Jiten*", 3ra ed., p. 287-288, 1983

[Documento no de patente 10]: Nunes C. *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 92(2), p. 247-255, 2002

[Documento no de patente 11]: Asis C. A. Jr. *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 38(1), p. 19-23, 2004

[Documento no de patente 12]: Vanneste J. L. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 174(9), p. 2785-2796, 1992

[Documento no de patente 13]: Kearns L. P. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(5), p.1837-1844, 1998

Los documentos JP-A-6078756, EP 0472467 y US 5.494.819 divulgan, entre otros, un método de aislamiento y de posterior cultivo de bacterias del género *Serratia*, *Enterobacter* y/o *Pantoea*.

Inagawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40(4), págs. 994-997 divulga un lipopolisacárido (LPS) procedente de diversas fuentes y su posible valor terapéutico para diversas enfermedades.

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

Inagawa *et al.*, *Biotherapy*, 1997, Volumen 11, N.º 3, págs. 464-466 divulga, entre otros, el uso de un lipopolisacárido (LPS) como droga antialérgica.

Nishizawa *et al.*, *Biotherapy*, 1992, Volumen 6, No. 3, págs. 356-357 divulga un lipopolisacárido (LPS) de bajo peso molecular purificado de *Pantoea agglomerans* que muestra una actividad antiulcerosa.

5 Inagawa *et al.*, *Biotherapy*, 1992, Volumen 6, No. 3, págs. 358-359 divulga el uso de un lipopolisacárido (LPS) como un fármaco analgésico para la terapia clínica del dolor.

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

10 Divulgación de la invención

Problema a resolver por la invención

15 Como ya se describió, los inmunopotenciadores a menudo están 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 obtenido del producto natural que sea seguro al ingerirse, es útil extraer el componente de plantas comestibles *per se* (por ejemplo, glucolípido de limulus-positivo, Documento de patente 1) o cultivar de forma eficaz el microbio que vive en una relación simbiótica con la planta comestible, para adquirir su componente o producto (por ejemplo, los lipopolisacáridos de bajo peso molecular. Documento de patente 2). Sin embargo, el contenido de inmunopotenciador en la planta comestible es extremadamente pequeño, el alimento debe ingerirse en una cantidad extremadamente grande para, al comer, prever el efecto inmunopotenciador, y en general no es fácil mantener una cantidad ingerida del inmunopotenciador apropiada. Por lo tanto, su efecto no puede preverse. Además, cuando el inmunopotenciador se extrae de la planta y se lo utiliza como un alimento o un medicamento, se necesita un alto costo y su practicabilidad es mala.

25 Entre tanto, al centrarse en los microbios que viven en una relación simbiótica con una planta, *Pantoea agglomerans*, que es una bacteria simbiótica con el trigo, contiene un lipopolisacárido de bajo peso molecular eficaz como componente para la inmunoestimulación. Sin embargo, hasta ahora, para extraer el lipopolisacárido de bajo peso molecular ha sido necesario cultivar *Pantoea agglomerans* usando un medio costoso en el que la principal proteína contenida en el medio se obtiene de un animal, por ejemplo, NZ amina, triptona o ácidos casamino. Por lo tanto, ha sido difícil proporcionarlo de forma económica como un inmunopotenciador altamente común. De forma simultánea, no podría negarse la posibilidad de que estén presentes sustancias nocivas desconocidas tales como las derivadas de animales contaminados con EEB.

35 A la luz de los anteriores problemas, la presente invención apunta a proporcionar un método de fermentación y cultivo en el que 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.

40 Medios para resolver el problema

45 La presente invención se refiere a un método de fermentación y cultivo en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y a un extracto vegetal fermentado obtenido por tal método en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5-9.

50 El método de fermentación y cultivo de la presente invención comprende fermentar un material obtenido de una planta comestible y que contiene hidratos de carbono cuyo componente principal es un polisacárido, con una bacteria gramnegativa anaerobia facultativa que vive en una relación simbiótica de forma exclusiva con una planta y cultivar de forma simultánea la bacteria gramnegativa anaerobia facultativa, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

La bacteria gramnegativa anaerobia facultativa es *Pantoea agglomerans*.

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

60 Es también conveniente que la planta comestible se seleccione de un cereal alimentario, alga marina, judía y una mezcla de los mismos.

Es también conveniente que la planta comestible sea un cereal alimentario y el material obtenido del cereal alimentario se seleccione de harina de trigo, polvo de arroz, polvo de salvado de trigo, salvado de arroz y posos de sake. En concreto, dado que la harina de trigo contiene gluten como fuente de proteína, es posible fermentarla y cultivarla de forma eficaz incluso sin utilizar el material obtenido de un animal.

65

Es conveniente que la planta comestible sea un alga marina y el material obtenido del alga marina se seleccione de polvo de algas pardas, polvo de "mekabu" (esporofilo de *Undaria pinnatifida*) y polvo de laminarias.

5 Cuando la planta comestible es una judía y el material obtenido de judías es un deshecho de cuajada de soja, contiene la proteína de forma abunda. Por lo tanto, es posible fermentarlo y cultivarla de forma eficaz incluso sin usar el material obtenido del animal.

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

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

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

15 Las composiciones de extracto vegetal fermentado pueden seleccionarse de un producto farmacéutico, un producto farmacéutico para animales, un cuasi fármaco, un producto cosmético, un alimento, un alimento funcional, un pienso, y un agente de baño.

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

El extracto vegetal fermentado presenta una capacidad de activación de macrófagos incluso en presencia de polimixina B, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. El extracto vegetal fermentado tiene el efecto inmunopotenciador.

25 La bacteria gramnegativa anaerobia facultativa es *Pantoea agglomerans* y la planta comestible se selecciona de un cereal alimentario, alga marina, una judía y una mezcla de los mismos.

30 Es conveniente que el material obtenido del cereal alimentario se seleccione de harina de trigo, polvo de arroz, polvo de salvado de trigo, salvado de arroz y posos de sake.

Es conveniente que el material obtenido del alga marina se seleccione de polvo de algas pardas, polvo de mekabu y polvo de laminarias.

Efecto de la invención

35 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 posibilidad de contaminación con sustancias nocivas desconocidas impurezas derivadas de componentes animales. Por lo tanto, no hay posibilidad de sustancias nocivas desconocidas como las derivadas de contaminantes de la EEB, y es posible proporcionar un método altamente seguro y económico para
40 producir extracto vegetal fermentado capaz de atender los diversos usos previstos y proporcionar de forma segura y económica extracto vegetal fermentado o polvo de extracto vegetal fermentado que contenga el inmunopotenciador. Además, es posible proporcionar la solución de cultivo, el inmunopotenciador y el extracto y el polvo de extracto, y productos farmacéuticos adicionales, productos farmacéuticos para animales, cuasi fármacos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, pienso, y agentes de baño que contengan el extracto o el polvo del
45 extracto.

50 Jamás se ha concebido, y no existen hechos fácilmente presumidos a partir de los hallazgos de la tecnología de fermentación convencional, que la fermentación y cultivo puedan realizarse mediante un proceso simple por el que material obtenido de una planta comestible se fermente exclusivamente por la bacteria gramnegativa anaerobia facultativa que vive en una relación simbiótica con una planta y que de forma simultánea se cultive la bacteria gramnegativa anaerobia facultativa.

55 Si el TNF se produce a partir de macrófagos o no (acción inductora de TNF) puede utilizarse como un indicador de que una determinada sustancia presenta el efecto inmunopotenciador. Además, el efecto inmunopotenciador puede cuantificarse por la cantidad de TNF producido. Por lo tanto, se examinó la producción de TNF a partir de macrófagos, utilizando un glucolípido vegetal limulus-positivo obtenido de harina de trigo y el lipopolisacárido de bajo peso molecular obtenido de *Pantoea agglomerans*. La producción de TNF a partir de macrófagos se interrumpió tratando con polimixina B tanto el glucolípido vegetal de limulus-positivo obtenido de la harina de trigo como en el lipopolisacárido de bajo peso molecular obtenido de *Pantoea agglomerans*. Sin embargo, se demostró en varios
60 Ejemplos que incluso cuando el extracto vegetal fermentado de la presente invención se trató con polimixina B, se produjo TNF a partir de los macrófagos. Esto indica que el extracto vegetal fermentado obtenido por la fermentación y cultivo tiene un efecto inmunopotenciador cualitativamente distinto a los efectos inmunopotenciadores debidos a los componentes de la propia planta que ha sido el material, y al propio microbio usado para la fermentación.

65

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista que muestra los efectos inhibidores de la aparición de herpes de koi por piensos que contienen un extracto de trigo fermentado.

5

Mejor modo de llevar a cabo la invención

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

10 I. Característica esencial del método para producir extracto vegetal fermentado usando *Pantoea agglomerans*

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

15

20 1: Aislamiento de *Pantoea agglomerans*

Cuando la harina de trigo se suspende en agua y se aplica el sobrenadante en un medio caldo agar L y se cultiva, aparecen colonias de microbios. En estas colonias, los microbios se identifican mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los que tienen las mismas propiedades que *Pantoea agglomerans* estándar se seleccionan mediante la selección de las colonias que son de coloración de gramnegativa, reacción de metabolismo anaeróbico de glucosa positiva 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 de patente 4). En la siguiente descripción, el porcentaje es un valor en peso salvo que se indique otra cosa.

25

30 2: Evaluación de la actividad de inmunopotenciación

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

35

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

Como uno de los componentes activos inmunopotenciados por la fermentación y el cultivo utilizando *Pantoea agglomerans*, se anticipa que contiene lipopolisacáridos de bajo peso molecular derivados de *Pantoea agglomerans*. Los lipopolisacáridos de bajo peso molecular tienen, notablemente, seguridad más elevada y actividad biológica superior a la de los lipopolisacáridos del tipo 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 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.

40

45

Pantoea agglomerans puede cultivarse utilizando un método de conocimiento público (Documento de patente 2, Documento no de patente 8), pero los principales componentes de proteínas contenidos en el medio de cultivo se obtienen de animales, y el costo del medio es alto. Además, cuando se proporcionan el alimento funcional y el pienso funcional al animal, o se usan por vía percutánea, la contaminación con impurezas derivada de los animales tipificados por EEB es problemática en términos de seguridad de los alimentos y, adicionalmente, el costo de producción se torna elevado y el método es de mala practicabilidad. Por lo tanto, como resultado de un extenso estudio para obtener un producto natural seguro y económico que tenga la acción inmunopotenciadora, los presentes inventores han completado el método de fermentación y cultivo utilizando *Pantoea agglomerans* para obtener el extracto de trigo fermentado, como se muestra en los Ejemplos. El principal componente proteico contenido en el medio de cultivo se obtuvo de animales de forma convencional, pero la presente invención hizo que éste se obtenga de plantas. Normalmente, se agrega a la solución de cultivo el producto obtenido mediante la descomposición de la proteína, tal como derivados de la caseína de leche de vaca con una enzima digestiva. En este caso, el costo primario por litro de medio es alrededor de 2,19 euros (250 yenes), pero si pudiera reemplazarse por la harina de trigo, el costo primario es de alrededor de 0,14 céntimos de euro (16 yenes). Jamás se ha llevado a cabo fermentación con el fin de concentrar de forma elevada y fusionar de forma sinérgica la acción inmunopotenciadora derivada tanto de la planta como del microbio que vive en una relación simbiótica con ella.

50

55

60

65

Los contenidos de la invención se describirán a continuación como Ejemplos, pero la presente invención no se limita a *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 de forma abundante, por ejemplo, algas pardas, cereales alimentarios (que contienen harina de trigo, polvo de arroz, polvo de salvado de trigo, salvado de arroz o posos de sake, que es un material obtenido de cereales alimentarios), algas marinas (que contienen polvo de algas pardas, polvo de mekabu o polvo de laminarias, que es un material obtenido de las algas marinas), y judías (que contienen el desecho de cuajada de soja, que es un material obtenido de las judías). Se sabe bien que están contenidos en estas plantas proteínas y azúcares. Estas plantas pueden aplicarse a la fermentación y al cultivo que utilizan *Pantoea agglomerans*. Es ampliamente sabido que las bacterias nativas, por ejemplo, bacterias que pertenecen al género *Serratia* o *Enterobacter*, viven en una relación simbiótica con estas plantas (Documento no de patente 4). Los microbios utilizados para la fermentación incluyen bacterias gramnegativas anaerobias facultativas que viven de forma rutinaria en una relación simbiótica con estas plantas.

II: Resumen de puntos importantes de la presente invención

(1) El mismo extracto de trigo fermentado como la sustancia que tiene la acción de inmunopotenciación producida por fusión del trigo, *Pantoea agglomerans* que es la bacteria simbiótica asociada a él y los productos fermentados por una combinación de ellos son nuevos, pero la presente invención no se limita a ello.

(2) Es una novedad producir un extracto vegetal fermentado utilizando *Pantoea agglomerans*, que es la bacteria gramnegativa, pero la presente invención no se limita a ello.

III: Método concreto para producir extracto de trigo fermentado

(1) *Pantoea agglomerans* se aísla de la harina de trigo a través del método convencional (Documento no de patente 1). Una vez aislada e identificada, esta bacteria puede almacenarse en glicerol al 50 %.

(2) Se preparan sal del 0,05 al 5 %, tampón fosfato de 0,005 a 1 mol, o una solución salina mixta (fosfato de sodio (II) del 0,5 al 10 %, fosfato de potasio (I) del 0,05 al 5 %, cloruro de sodio del 0,05 al 5 %, cloruro de amonio del 0,05 al 5 %).

(3) La harina de trigo se suspende en una concentración del 0,05 al 10 % en agua.

(4) Se prepara una solución de cloruro de magnesio 0,2 a 3 mol.

(5) Se prepara una solución de cloruro de calcio de 0,2 a 3 mol.

(6) En algunos casos, se esterilizan las soluciones de (2) a (5) mediante autoclave, etc.

(7) Las soluciones de (2) a (5) se mezclan en cantidades apropiadas, y se añade agua para preparar una suspensión que contiene harina de trigo del 0,1 al 5 %. En algunos casos, el pH se neutraliza añadiendo una solución alcalina o una solución ácida.

(8) En algunos casos, puede digerirse parcialmente almidón de trigo añadiendo 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.

(9) Se añade a (7) u (8) *Pantoea agglomerans* aislada en (1).

(10) (9) se fermenta a 1 a 40 °C. En algunos casos, el recipiente de fermentación puede dejarse quieto o agitarse. Como alternativa puede llevarse a cabo una agitación cada varias horas.

(11) se fermenta (10) 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 añadirse suspensión de harina de trigo o sales inorgánicas.

(13) La fermentación se finaliza, y se recoge mediante centrifugación (1.000 a 5.000 rpm, 10 a 60 minutos) un componente sólido como un precipitado. El precipitado puede utilizarse directamente como un producto de harina de trigo fermentada para el pienso o como la materia prima para mezclar con el pienso.

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

(15) El extracto de trigo fermentado producido en (14) puede simplemente purificarse adicionalmente dependiendo de los usos previstos. Es decir, cuando se añade al extracto (14) sal tal como cloruro de sodio en una concentración final de 0,05 a 1 mol/l y posteriormente se añade el disolvente tal como etanol en una a tres veces la cantidad del extracto, se produce un precipitado. Éste puede recogerse por centrifugación. Este precipitado puede lavarse adicionalmente con un disolvente tal como etanol. Cuando éste se seca, puede prepararse un polvo.

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

[Ejemplo 1]

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

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

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

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

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

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

10 [Ejemplo 2]

Producción de extracto de trigo fermentado

15 (1) Se añadió agua destilada (5 ml) a 0,5 g de harina de trigo a suspender, se añadieron 0,1 ml del sobrenadante al medio caldo de agar L, y se cultivó a 37 °C durante una noche.

(2) Se aisló una colonia amarilla, se identificó una bacteria a través de los métodos convencionales, se aisló *Pantoea agglomerans*, suspendió en solución de glicerol al 50 %, y se almacenó en un congelador. Una parte de esta solución de reserva se aplicó en el medio agar LB, que se dejó quieto a 37 °C para hacer una colonia independiente de *Pantoea agglomerans*.

20 (3) En un frasco de 2 litros, se añadieron 64 g de fosfato de sodio (II) heptahidrato, 15 g de fosfato de potasio (I), 2,5 g de cloruro de sodio y 5 g de cloruro de amonio, y se añadió agua purificada para preparar un volumen total de un litro (solución mixta de sal inorgánica). El agua purificada se añadió a 13,1 g de cloruro de magnesio dihidrato para hacer que el volumen total sea 100 ml (solución de cloruro de magnesio). Se añadió 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 añadió en un matraz 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).

25 (4) Se añadió harina de trigo (24 g) (Nisshin Flour Milling Co., Ltd.) a un matraz cónico de 1 l y se añadió agua purificada para hacer que el volumen total sea 600 ml. Tras autoclararlo de forma similar, se añadieron 3 mg de α -amilasa (SIGMA, *Bacillus*, actividad 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).

30 (5) Las soluciones preparadas y similares se colocaron en un matraz Sakaguchi esterilizado de 3 l en las cantidades mostradas en la Tabla 1 para preparar un medio de harina de trigo.

35 [Tabla 1]

Materiales	Dosis
Solución mixta de sal inorgánica	200 ml
Agua purificada	550 ml
Solución de harina de trigo tratada con amilasa	200 ml
Solución de cloruro de magnesio	2,0 ml
Solución de cloruro de calcio	0,1 ml

(6) Preparación del inóculo: una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de la harina de trigo en (2) se añadió a 10 ml del medio de harina de trigo de (5) preparada previamente en la misma composición, y se fermentó 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.

40 (7) La cantidad total de (6) se añadió a (5), y se fermentó a 37 °C durante 20 a 30 horas con agitación. Se midió el pH de la solución fermentada y se ajustó en pH 7 añadiendo agua amoniacal. Se le añadió en condiciones estériles 150 ml de la solución de harina de trigo tratada con amilasa y 37,5 ml de la solución mixta de sal inorgánica, y se fermentó de forma similar durante 20 a 30 horas. Se repitió la misma manipulación para fermentar durante un total de 65 a 80 horas.

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

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

55 (10) La solución de cloruro de sodio (8,9 ml, 5 mol) se añadió a 80 ml del sobrenadante en (9). Cuando se añadió a ello 178 ml de etanol, se produjo una turbidez blanca. Esto se dejó quieto en un congelador (-90 °C) durante una noche, y luego se centrifugó la solución (Hitachi, centrífuga de enfriamiento de alta velocidad, SCR-20B, 10.000 rpm, 20 minutos, 4 °C). El precipitado se obtuvo retirando el sobrenadante. Tras añadir al precipitado 10 ml de etanol al

70 % enfriado, lo cual luego se suspendió, la solución se centrifugó (Hitachi, centrífuga 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 11 ml de extracto de trigo fermentado.

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

10 (12) El extracto de trigo fermentado se produjo independientemente 8 veces mediante el mismo método, y se midió la cantidad proteína en cada muestra mediante el método Bradford, utilizando la cuantificación de la proteína BSA como proteína estándar. Como objetos comparativos, se utilizaron el glucolípido limulus-positivo purificado (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, se representa un valor numérico para el extracto de trigo fermentado como el contenido en mg por 1 g del peso obtenido secando el extracto de trigo fermentado obtenido en el punto (10) anterior.

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

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

(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.

25 (16) Reacción de yodo-almidón: Un reactivo de yodo 1N (se añadieron 10 ml de agua a 12,7 g de yodo y 25 g de yoduro de potasio, se mezcló cuidadosamente, y luego se añadió agua para llegar a 100 ml) se diluyó 200 veces con agua al uso. Esto (5 µl) se añadió 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 glucolípido de limulus-positivo y el lipopolisacárido de bajo peso molecular, la misma manipulación no indujo a tal desarrollo de color (negativo). Los resultados anteriores se resumen en la Tabla 6.

35 Como es evidente a partir de los resultados anteriores, es obvio que el extracto de trigo fermentado es diferente al glucolípido limulus-positivo y al lipopolisacárido de bajo peso molecular, en cuanto al contenido de proteína, el contenido de azúcar, el contenido de ácido nucleico (salvo el glucolípido limulus-positivo dado que no hay datos), el contenido de sustancia de limulus positiva y la reacción yodo-almidón, y está claro que la presente sustancia es nueva. Los resultados anteriores se resumen de forma simple en la Tabla 7. Es decir, el extracto vegetal fermentado en los presentes Ejemplos es nuevo, ya que es distinto al glucolípido de limulus-positivo y al lipopolisacárido de bajo peso molecular en cuanto que presenta las siguientes propiedades fisicoquímicas. El extracto de trigo fermentado presenta un contenido de proteína del 5 al 15 %, contenido de azúcar del 20 al 45 %, contenido de ácido nucleico del 10 al 35 % y contenido de sustancia limulus-positiva del 10 al 40 %, y es de es positivo para la reacción yodo-almidón, y presenta la capacidad de activación de los macrófagos incluso en presencia de la polimixina B.

[Tabla 2]

Contenido de proteína en el 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
Glucolípido limulus-positivo	40
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	3,8 o menos

[Tabla 3]

Contenido de azúcar en el 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
Glucolípido limulus-positivo	133
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	668

[Tabla 4]

Contenido de ácido nucleico en el 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
Glucolípido limulus-positivo	No comunicado
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	2,8

5

[Tabla 5]

Contenido de sustancia limulus-activa en extracto fermentado	
Muestra	Contenido de sustancia limulus-activa (mg/g)
Extracto de trigo fermentado 1	242
Extracto de trigo fermentado 2	118
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
Glucolípido limulus-positivo	970
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	993

[Tabla 6]

Reacción de 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
Glucolípido limulus-positivo	Negativo
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	Negativo

[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 limulus-activa	Reacción yodo-almidón
Extracto de trigo fermentado (Media ± Desviación típica)	86±15 mg/g	327± 57 mg/g	212± 75 mg/g	255± 113 mg/g	Positivo
Glucolípido limulus-positivo	Considerablemente inferior	Considerablemente inferior	No medido	Considerablemente superior	Negativo
Lipopolisacárido de bajo peso molecular	Considerablemente inferior	Considerablemente superior	Considerablemente inferior	Considerablemente superior	Negativo
Considerablemente inferior: valores considerablemente inferiores al intervalo de valores del extracto de trigo fermentado (Media ± Desviación típica) Considerablemente superior: valores considerablemente superiores al intervalo de valores del extracto de trigo fermentado (Media ± Desviación típica)					

[Ejemplo 3]

5

Acción inmunopotenciadora del extracto de trigo fermentado

10

Se colocó una línea celular de leucemia mielógena aguda, THP-1 (1 x 10⁶/250 µl, medio RPMI1640 que contenía suero fetal bovino al 10 %) utilizada como macrófagos humanos, en una placa de 48 pocillos, y se las precultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 250 µl de medio (volumen final 500 µl) de modo tal que la concentración final de cada muestra fue de 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 TNF en los sobrenadantes se midió mediante una prueba de citotoxicidad usando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los macrófagos produjeron TNF 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 TNF mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular y el glucolípido limulus-positivo. A partir de esto, es obvio que el extracto de trigo fermentado tiene una actividad biológica distinta de las del lipopolisacárido de bajo peso molecular y del glucolípido limulus-positivo.

20

[Tabla 8]

Producción de TNF a partir de macrófagos mediante el extracto de trigo fermentado y el efecto inhibitorio de la polimixina B (actividad de inducción de TNF del extracto de trigo fermentado)						
Concentración de la muestra (ng/ml)	Extracto de trigo fermentado con adición de polimixina B	Extracto de trigo fermentado o sin adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin adición de polimixina B	Glucolípido limulus-positivo con adición de polimixina B	Glucolípido limulus-positivo sin adición 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 pienso

[Ejemplo 4]

- 5 Pienso para pollos de granja que contiene extracto de trigo fermentado (efecto inhibidor de la mortalidad en la cría de pollos para asar en un estudio a gran escala)

10 Se preparó un pienso que contenía 430 µg/kg del extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2. Se utilizaron pollos para asar comerciales, con aproximadamente 5.500 a 6.000 pollos por grupo. En el grupo de prueba de control, se proporcionó el pienso que no contenía extracto de trigo fermentado. El pienso que contenía el extracto de trigo fermentado se proporcionó a los pollos a las 3 semanas de vida luego de la incubación, y se administró diariamente hasta las 7 semanas de vida. Se contó de forma diaria la cantidad de gallinas muertas. Las gallinas que no cumplían el estándar al momento del envío se descartaron. Los resultados se muestran en la Tabla 9. La tasa de eliminación fue 1,9 % en el grupo de prueba (pienso que contenía el extracto de trigo fermentado), lo que fue bajo, y del 3,3 % en el grupo de control. La tasa de cría fue del 98,1 % en el grupo de prueba y del 96,7 % en el grupo de control. Por lo tanto, se observó un aumento del 1,4 % en la tasa de cría. Se realizó una prueba de la significación estadística de la cantidad de gallinas realmente enviadas y la cantidad de gallinas eliminados entre el grupo de prueba y el grupo de control, y se observó la diferencia significativa de $p < 0,0001$ en la prueba de X^2 . A partir de lo anterior, se demostró el efecto de protección contra infecciones del pienso que contenía el extracto de trigo fermentado en la cría de pollos para asar.

[Tabla 9]

Efectos del pienso que contiene extracto de trigo fermentado en la cría de pollos para asar		
	Grupo de prueba	Grupo de control
Cantidad de pollos	5906	5525
Cantidad de pollos realmente enviada	5792	5345
Cantidad de pollos eliminados	114	180
Tasa de eliminación	1,9 %	3,3 %
Tasa de cría	98,1 %	96,7 %

[Ejemplo 5]

- 25 Pienso para peces cultivados que contiene extracto de trigo fermentado (efecto preventivo de infecciones en pruebas al aire libre de seriolas)

30 Para examinar el efecto de prevención de infecciones, se cultivaron alrededor de 5.200 seriolas por grupo en una prueba al aire libre en que se las crió mediante el pienso que contenía el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 10. La mortalidad debida a *Streptococcus* en un grupo al que no se administró pienso alcanzó el 4,8 %. En el grupo donde se ingirieron 100 µg/kg/día (por 1 kg de peso corporal y por día) (grupo de ensayo), se observó que la mortalidad se redujo de forma significativa ($p < 0,00001$) en comparación con el grupo al que no se administró pienso (grupo de control).

Tabla 10

Efecto de prevención de infecciones del pienso que contiene extracto de trigo fermentado en seriolas en una prueba al aire libre				
Tratamiento	Cantidad de peces criados	Cantidad de peces muertos	Mortalidad	Prueba de diferencia significativa (prueba X^2)
Grupo de control	5201	249	4,79	0
Grupo de prueba	5193	101	1,94	($P < 0,00001$)

[Ejemplo 6]

- 40 Pienso para peces cultivados que contiene extracto de trigo fermentado (efecto preventivo de infecciones en herpes koi)

- 45 (1) Carpa: se usaron carpas negras cuyo peso corporal era de 70 g. La prueba se realizó utilizando 20 carpas por grupo.
 (2) Preparación de virus del herpes koi: se añadieron 10 ml de solución salina balanceada de Hank (HBSS) a 1 g de branquias las carpas que murieron de infección de herpes koi, y se homogeneizó, se filtró con un filtro de 0,45 µm, y del filtrado se preparó una solución viral.
 (3) Infección con virus del herpes koi: El filtrado anterior (600 µl/100 g peso corporal) se inyectó por vía

intraperitoneal.

(4) Preparación de pienso 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 pienso disponible de forma comercial.

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

10 (6) Experimento: El pienso que contenía el extracto de trigo fermentado se proporcionó durante una semana, luego se infectaron las carpas con el virus, y posteriormente se proporcionó durante 10 días el pienso que contenía el extracto de trigo fermentado. Tras la infección con el virus se observó durante 10 días la tasa de supervivencia de las carpas. Los resultados se muestran en FIG. 1.

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

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

[Ejemplo 7]

Producción de crema para manos que contiene extracto de trigo fermentado

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

[Tabla 11]

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

30 [Ejemplo 8]

Producción de crema humectante que contiene extracto de trigo fermentado

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

40 Los componentes utilizados se muestran en la Tabla 12. La combinación A se calentó y disolvió a 70 °C, y se añadieron 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 se enfrió hasta 40 °C. Luego se añadió la combinación D, y se ajustó el pH a 6,8. Posteriormente, el agua purificada restante y el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se añadieron a ella en una cantidad apropiada, y se mezcló cuidadosamente para obtener una loción lechosa. El extracto de trigo fermentado se disolvió previamente a 5 mg/ml en agua purificada, y se añadieron 0,1 ml del mismo a 100 g de la loción lechosa.

45

[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 (20 E.O.)	1,8	A
Polisiloxano de metilo	0,3	A
Monoestearato de sorbitán	0,5	B
Monoestearato de glicerina tipo 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 (5 mg/ml)	0,1	
Agua purificada	Cantidad razonable	
Cantidad total	100,00	

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

43 hombres y mujeres utilizaron esta crema, y se realizó una encuesta mediante cuestionario. Como resultado, para el efecto humectante, 18 personas contestaron que sin lugar a dudas hubo 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 sin lugar a dudas fue 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 del estado de la piel, ninguna persona contestó que hubo deterioro. 4 personas utilizaron esta crema, con síntomas atópicos moderados, y se les realizó la encuesta por cuestionario. Para la mejora de la dermatitis atópica, 3 personas contestaron que sin lugar a dudas fue efectiva, y una contestó que fue levemente efectiva (prueba de signos de una muestra: $p < 0,125$). De forma adicional, uno contestó que las cicatrices del acné se recuperaron rápidamente. 9 hombres utilizaron esta crema tras afeitarse, y se les realizó la encuesta por cuestionario. Ocho hombres contestaron que había sido efectiva para la reducción del dolor tras el afeitado, la prevención de sequedad y la cura rápida de cortes de la afeitadora (prueba de signos de una muestra: $p < 0,01$). Además, utilizaron esta crema 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 por quemaduras. En pacientes con lesiones por quemaduras en la piel de ambas manos de igual extensión, se aplicó en una mano la crema que contenía el extracto de trigo fermentado producida en el Ejemplo 2, 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 la utilizaron 10 pacientes con lesiones por quemaduras, incluyendo este caso. En consecuencia, en todos los sitios 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 presentó el efecto terapéutico sobre las lesiones por quemaduras.

[Ejemplo 9]

Producción de la loción para piel que contiene extracto de trigo fermentado

1. Formulación de la 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 se disolvió previamente a 5 mg/ml en agua purificada, y 0,1 ml del mismo se añadieron a 100 g de la loción para piel.

[Tabla 13]

Componentes	%
Citrato de sodio	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

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

[Ejemplo 10]

10 Producción de agente de baño que contiene extracto de trigo fermentado

Se preparó 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.

15

[Tabla 14]

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

20

25

30

El agente de baño que contenía el extracto de trigo fermentado se preparó añadiendo 110 µg del extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 a los componentes anteriores. El agente de baño contenía el extracto y el agente de baño que no contenía extracto se proporcionaron a ciegas 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 quedarse dormido, (5) grado de recuperación del entumecimiento en los hombros, (6) efecto sobre el dolor muscular, (7) efecto sobre el dolor nervioso, (8) efecto sobre el dolor lumbar, (9) efecto sobre la sensibilidad a temperaturas frías, (10) efecto de mejoría de la tiña del pie, (11) efecto de mejora sobre piel seca, (12) efecto sobre la dermatitis atópica]. Como resultado, se observó un 7 % o más de mejora, en comparación con el control, 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) el efecto de mejora sobre la piel seca (7,3 %) (prueba de Mantel-Haenszel: $p < 0,04$). A partir de los resultados anteriores, utilizando el extracto de trigo fermentado como agente de baño se observaron efectos de relajación sobre los dolores y mejora en el calentamiento del cuerpo.

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

35

[Ejemplo 11]

Producción de caramelo que contiene extracto de trigo fermentado

40

(1) Como materias primas, se mezclaron azúcar granulada, jarabe de almidón, mezcla de agua con 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 hasta 160 °C.

(2) Se obtuvieron los caramelos enfriando lo obtenido en (1) sobre una placa de acero para enfriamiento, extendiendo en forma de palo, y moldeando en forma de granos de alrededor de 1 g.

45

Una cantidad adecuada de estos caramelos se colocó en 20 ml de agua, y se disolvieron por calentamiento. Se midió en esta solución la cantidad de lipopolisacárido como el componente activo del extracto de trigo fermentado, y en consecuencia fue de 4,6 µg/g. Ingirieron este caramelo 6 hombres y mujeres que estaban resfriados y con dolor de garganta. Posteriormente, se realizó la encuesta por cuestionario para el dolor de garganta. Las 6 personas sintieron reducción del dolor de garganta (prueba de signos de una muestra: $p < 0,03$).

50

[Ejemplo 12]

Producción de alimentos funcionales con descomposición alcohólica que contienen 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 observaba o no un alivio de la faringoalgia como una nueva acción.

5 Producto disponible en el comercio: marca "Nonde oiki"

Los componentes se muestran en la Tabla 15.

[Tabla 15]

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

10 El "Nonde oiki" actual contiene el extracto de amachazuru (*Gynostemma pentaphylla*) y el extracto de té verde, pero contiene solo aproximadamente 0,002 µg por envase de lipopolisacárido, que es uno de los componentes activos del extracto vegetal. Por lo tanto, se prevé que añadiendo la cantidad apropiada de extracto de trigo fermentado que contiene lipopolisacárido de forma abundante se adquiriera una nueva función. Es conveniente combinar 1 a 30 µg por 2 g de envase del 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, en primer lugar se produjo el producto en el que se habían combinado 50 µg del extracto de trigo fermentado en un envase. En el proceso de producción de Nonde oiki, se añadieron 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.

20 A 20 hombres y mujeres adultas que se quejaban de faringoalgia luego de tomar bebidas y de divertirse en un karaoke, se les proporcionó "Nonde oiki" convencional 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, y un efecto de alivio de la faringoalgia. Inmediatamente después, se realizó la encuesta por cuestionario en cuanto al efecto de alivio de la faringoalgia. Como resultado, se observó una reducción de la faringoalgia 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". Por lo tanto, se observó una diferencia estadísticamente significativa (probabilidad exacta de Fisher: $p < 0,012$) en comparación con el control.

30 E. Ejemplo en referencia a los beneficios medicinales del extracto de trigo fermentado

[Ejemplo 13]

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

40 Se proporcionó 2 o 3 veces al día una solución de glicerol al 50 % que contenía 50 µg/ml del extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2, con una dosificación de 2 a 3 ml por administración, a 9 pacientes hombres y mujeres con dermatitis atópica refractaria (25 a 34 años de edad), en donde se observaban erupciones en la cara, manos y piernas, tronco, cuello, brazos y espalda, y los síntomas subjetivos eran moderados a graves. Los síntomas subjetivos (prurito) se clasificaron en niveles leve, moderado y grave, según las quejas de los pacientes. Dos semanas a dos meses después del inicio del uso, los pacientes volvieron a la consulta, y se evaluaron los efectos. En los resultados, los casos de respuesta total (mejora notable de erupciones y casi desaparición del síntoma subjetivo) fueron 4 (44 %), los casos de respuesta parcial (ligera mejoría de erupciones y reducción del síntoma subjetivo) fueron 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 de ensayo: $p < 0,03$). A partir de los resultados anteriores, se determinó que la tasa eficaz era del 89 %.

[Ejemplo 14]

50 Efecto analgésico del extracto de trigo fermentado

El extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se disolvió en agua destilada, y se administró a ratones por vía oral 0,2 mol del mismo por ratón, utilizando una sonda. Tras 90 minutos, se administró por vía intraperitoneal

a los ratones 0.7 % de ácido acético. 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 necesaria para inhibir el 30 % de la cantidad de retorcimientos en el control de agua destilada. Cuando la actividad eficaz del lipopolisacárido de bajo peso molecular obtenido de *Escherichia coli* fue de 1, la actividad eficaz del extracto de trigo fermentado fue de 7, demostrando que el extracto de trigo fermentado presentó un excelente efecto analgésico.

[Tabla 16]

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

10 [Ejemplo 15]

Efecto inhibidor del extracto de trigo fermentado sobre la dermatitis atópica

Para examinar el efecto del extracto de trigo fermentado sobre la dermatitis atópica, se introdujo un modelo de alergia tipo I. Se administró por vía intravenosa un anticuerpo monoclonal anti dinitrofenilo (1 µg/ratón) a ratones BALB/c machos (3 a 4 por grupo). Tras una hora, el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 se administró por vía intracutánea (sitio abdominal) (4 µg /ratón) u por vía oral (100 µg/ratón). Tras otra hora adicional, se aplicaron 20 µl de una solución mixta (4:1) de aceite de oliva-acetona que contenía dinitrofluorobenceno al 25 % como un alérgeno, sobre la superficie y la cara posterior del pabellón de una oreja de un ratón. 1, 2, 24 y 48 horas tras la aplicación se midió el grosor del pabellón de la oreja usando un calibrador del grosor. El valor (Δ) obtenido sustrayendo el grosor justo antes de la aplicación fue el nivel de edema. El efecto de la administración del fármaco se evaluó mediante la tasa de inhibición obtenida por la siguiente fórmula, en la inhibición en una reacción de fase temprana observada una hora tras la administración del alérgeno y una reacción retardada inducida tras 24 horas. Tasa de inhibición = $(1 - \Delta \text{ Edema del pabellón de oreja tras la administración del fármaco} / \Delta \text{ Edema del pabellón de oreja en el control}) \times 100$. Los resultados se muestran en la Tabla 17. Como es evidente a partir de la tabla, el extracto de trigo fermentado inhibió una reacción alérgica tanto mediante la administración intracutánea como oral.

[Tabla 17]

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

30 [Ejemplo 16]

Efecto de prevención de infecciones del extracto de trigo fermentado

Para examinar el efecto de prevención de infecciones del extracto de trigo fermentado, se introdujo un modelo de infección de *Staphylococcus aureus* (SARM) resistente a la metilina. Se administró ciclofosfamida (CY, 200mg/kg) por vía intraperitoneal a ratones BALB/c machos (6 a 8 semanas de vida) (10 por grupo), y tras 5 días, se administró el extracto de trigo fermentado producido en el Ejemplo 2 por vía intracutánea. Tras 3 horas, se administró SARM (3×10^7 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 es evidente a partir de la tabla, el extracto de trigo fermentado exhibió el efecto de prevención de infecciones en SARM con una diferencia estadísticamente significativa (prueba X^2 : $p < 0,001$) en comparación con el grupo de solución salina (control).

[Tabla 18]

Efecto de prevención del extracto de trigo fermentado sobre la infección de SARM		
Medicamento administrado	Tasa de supervivencia	Tasa de riesgo
Solución 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 sobre cáncer metastásico

5 Para examinar el efecto terapéutico del extracto de trigo fermentado sobre cáncer metastásico, se introdujo un modelo de metástasis de pulmón de células Meth A. Las células cancerosas Meth A (1×10^5 células) se administraron por vía intravenosa 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 por vía intracutánea durante 4 días consecutivos. Veinte días después de trasplantar las células, se realizó una autopsia, se extrajeron los pulmones y se los fijó con formalina. Se observó el pulmón a simple vista y se contó la cantidad de nódulos. Los resultados se muestran en la Tabla 19. Como es evidente a partir de la tabla, el extracto de trigo fermentado presentó efecto terapéutico sobre cáncer metastásico de pulmón de Meth A, con una diferencia estadísticamente significativa (prueba-t: $p < 0,001$), en comparación con el grupo de solución salina (control).

15 [Tabla 19]

Efecto terapéutico del extracto de trigo fermentado sobre cáncer metastásico de Meth A		
Medicamento administrado	Cantidad de nódulos (Media \pm Desviación típica)	Tasa de riesgo
Solución salina	60 \pm 11	
Extracto de trigo fermentado (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	33 \pm 8	$P < 0,001$
Extracto de trigo fermentado (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	19 \pm 6	$P < 0,001$

F. Ejemplos en referencia al extracto de desecho de cuajada de soja fermentado

[Ejemplo 18]

20

Producción de extracto de desecho de cuajada de soja fermentado

- (1) Se añadieron a un matraz cónico de 2 litros, 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.
- (2) Se añadió a (1) un desecho de cuajada de soja seco (20g).
- (3) (2) se esterilizó mediante autoclave.
- (4) Preparación de inóculo: Para preparar el inóculo para la fermentación del desecho de cuajada de soja se añadió una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de la harina de trigo a 5 ml de medio de desecho de cuajada de soja al 2 % preparado previamente en la misma composición, y se fermentó a 37 °C durante una noche (15 horas) agitando suavemente.
- (5) La cantidad total de (4) se añadió a (3), y se fermentó a 37 °C durante 48 horas 2 agitando suavemente.
- (6) La solución de desecho de cuajada de soja 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 preparar un extracto de desecho de cuajada de soja fermentado.
- (7) Medición del peso seco: se transfirieron 0,3 ml a un tubo plástico de 1,5 ml previamente pesado, y luego de congelarse, se realizó la liofilización mediante el liofilizador, y en consecuencia el peso fue 5,97 mg. Por lo tanto, el peso seco del extracto de desecho de cuajada de soja fermentado de (6) fue 19,9 mg por de la solución y 19,9 g por cantidad total de 1.000 ml.
- (8) La cantidad de proteína se midió en la muestra diluida 10 veces mediante el método Bradford, usando BSA para cuantificación proteínas como la proteína estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 15.
- (9) Medición del contenido de ácido nucleico: Se midió la absorbancia a 210 hasta 340 nm de la muestra diluida 100 veces. El contenido máximo se calculó utilizando un valor obtenido sustrayendo la absorbancia a 320 nm de la absorbancia a 260 nm, y 50 μg por 10D de absorbancia como ADN.
- (10) Medición de contenido de azúcar: El contenido de azúcar se midió mediante el método de sulfato fenólico, utilizando la glucosa como el azúcar estándar.
- (11) Medición del contenido 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.

50 [Tabla 20]

Contenidos de componentes en extracto de desecho de cuajada de soja fermentado	
Componentes	(mg/g)
Proteína	112
Azúcar	537
Ácido nucleico	No detectable

Sustancia limulus-activa	10
--------------------------	----

[Ejemplo 19]

Acción inmunopotenciadora del extracto de desecho de cuajada de soja fermentado

- 5 Se colocó una línea celular de leucemia mielógena aguda, THP-1 ($1 \times 10^6/250 \mu\text{l}$, medio RPMI1640 que contenía suero fetal bovino al 10 %) utilizada como macrófagos humanos en una placa de 48 pocillos, y se precultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron $250 \mu\text{l}$ del medio (volumen final $500 \mu\text{l}$) de modo que la concentración final de cada muestra fue de 100 a 10.000 ng/ml. Las muestras se proporcionaron a un grupo que contenía polimixina B ($12,5 \mu\text{g/ml}$) (ningún grupo contenía polimixina B solo a 100 ng/ml). Tras el cultivo durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes y las células del cultivo. Se midió la actividad TNF en el sobrenadante mediante una prueba de citotoxicidad utilizando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Los macrófagos produjeron TNF incluso en presencia de polimixina B, por medio del extracto de desecho de cuajada de soja fermentado pero, en presencia de la polimixina B, los macrófagos no pudieron producir TNF mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular. A partir de esto, es obvio que el extracto de desecho de cuajada de soja fermentado tiene una actividad biológica distinta de la del lipopolisacárido de bajo peso molecular.

[Tabla 21]

Producción de TNF a partir de macrófagos mediante extracto de desecho de cuajada de soja fermentado y efecto inhibitor de la polimixina B (actividad inductora de TNF del extracto de desecho de cuajada de soja fermentado)						
Actividad inductora de TNF del extracto de desecho de cuajada de soja fermentado y efecto inhibitor de la polimixina B (actividad de TNF)						
Concentración de la muestra (ng/ml)	Extracto de desecho de cuajada de soja fermentado con adición de polimixina B	Extracto de desecho de cuajada de soja fermentado sin adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin adición de polimixina B	Extracto de trigo fermentado con adición de polimixina B	Extracto de trigo fermentado sin adición de polimixina B
0	0	0	0	0	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						

- 20 G. Ejemplos con referencia a extracto de polvo de arroz fermentado

[Ejemplo 20]

Producción de extracto de polvo de arroz fermentado

- 25 (1) Se añadieron a un matraz cónico de 2 litros, 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.
 (2) Se añadió a (1) un polvo de arroz seco (20 g).
 (3) (2) se esterilizó por autoclave.
 30 (4) Preparación de inóculo: Para preparar el inóculo para la fermentación del polvo de arroz se añadió una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de harina de trigo 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 una noche (15 horas) agitando suavemente.
 (5) La cantidad total de (4) se añadió a (3), y se fermentó a 37°C durante 72 horas agitando suavemente.
 35 (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 preparar un extracto de polvo de arroz fermentado.
 (7) Medición del contenido 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 limulus-activa estándar. El contenido de la sustancia limulus-activa en el extracto de polvo de arroz fermentado se midió en $1,7 \mu\text{g/ml}$.

[Ejemplo 21]

Acción de inmunopotenciación del extracto de polvo de arroz fermentado

- 5 Se colocó una línea celular de leucemia mielógena aguda, THP-1 ($1 \times 10^6/250 \mu\text{l}$, medio RPMI1640 que contenía suero fetal bovino al 10 %) utilizada como macrófagos humanos, en una placa de 48 pocillos, y se precultivó previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron $250 \mu\text{l}$ de medio (volumen final $500 \mu\text{l}$) de modo tal que la concentración final de cada muestra fue 1 a 10.000 ng/ml . Las muestras se proporcionaron a un grupo que contenía polimixina B ($12,5 \mu\text{g/ml}$). Tras el cultivo durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes y las células del cultivo. Se midió la actividad de TNF en los sobrenadantes mediante un ensayo de citotoxicidad usando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 22. Los macrófagos produjeron TNF incluso en presencia de polimixina B mediante el extracto de polvo de arroz fermentado pero, en presencia de la polimixina B, los macrófagos no podían producir TNF mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular. A partir de esto, es obvio que el extracto de polvo de arroz fermentado tiene una actividad biológica distinta de las del lipopolisacárido de bajo peso molecular y el glucolípido limulus-positivo.

[Tabla 22]

Producción de TNF a partir de macrófagos mediante extracto de polvo de arroz fermentado y efecto inhibitor de la polimixina B (actividad inductora de TNF del extracto de polvo de arroz fermentado)				
Concentración de la muestra (ng/ml)	Extracto de polvo de arroz fermentado con adición de polimixina B	Extracto de polvo de arroz fermentado sin adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin adición 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

H. Ejemplos en referencia al extracto de algas pardas fermentadas

20

[Ejemplo 22]

Producción de extracto de algas pardas mekabu fermentadas

- 25 (1) Se añadieron a un matraz cónico de 2 litros, $1,0 \text{ l}$ de agua, $0,2 \text{ g}$ de fosfato de potasio (I), $1,15 \text{ g}$ de fosfato de sodio II, 8 g de sal común y $0,2 \text{ g}$ de cloruro de potasio.
 (2) Se añadieron a (1) algas pardas mekabu secas (20 g).
 (3) (2) se esterilizó mediante autoclave.
 (4) Preparación del inóculo: Para preparar el inóculo para la fermentación de las algas pardas mekabu se añadió una colonia de *Pantoea agglomerans* aislada de harina de trigo a 5 ml de medio de algas pardas mekabu al 2 % preparado previamente en la misma composición, y se fermentó a 37°C durante una noche (15 horas) agitando suavemente.
 (5) La cantidad total de (4) se añadió 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 recogieron los sobrenadantes para preparar un extracto de algas pardas mekabu fermentadas.
 (7) Medición del contenido 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 de limulus activa estándar. El contenido de sustancia limulus-activa en el extracto de algas pardas mekabu fermentadas se midió en $132 \mu\text{g/ml}$.

35

40

[Ejemplo 23]

Acción de inmunopotenciación del extracto de algas pardas mekabu fermentadas

45

- 50 Se colocó un línea celular de leucemia mielógena aguda, THP-1 ($1 \times 10^6/250 \mu\text{l}$, medio RPMI1640 que contenía suero fetal bovino al 10%), utilizadas como macrófagos humanos en una placa de 48 pocillos, y precultivada previamente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron $250 \mu\text{l}$ del medio (volumen final $500 \mu\text{l}$) de modo tal que la concentración final de cada muestra fue 1 a 10.000 ng/ml . Las muestras se proporcionaron a un grupo que contenía polimixina B ($12,5 \mu\text{g/ml}$). Tras el cultivo durante 4 horas, se recogieron los sobrenadantes y las células del

5 cultivo. La actividad de TNF en los sobrenadantes se midió mediante una prueba de citotoxicidad usando L-929. Los resultados se muestran en la Tabla 23. Los macrófagos produjeron TNF incluso en presencia de polimixina B mediante el de algas pardas mekabu fermentadas pero, en presencia de polimixina B, los macrófagos no podían producir TNF mediante el lipopolisacárido de bajo peso molecular. A partir de esto, es obvio que el extracto de algas pardas mekabu fermentadas tiene una actividad biológica distinta a las del lipopolisacárido de bajo peso molecular y el glucolípido limulus-positivo.

[Tabla 23]

Producción de TNF a partir de macrófagos mediante extracto de algas pardas mekabu fermentadas y efecto inhibidor de la polimixina B (actividad inductora de TNF del extracto de algas pardas mekabu fermentadas)				
Concentración de muestra (ng/ml)	Extracto de algas pardas mekabu fermentadas con adición de polimixina B	Extracto de algas pardas mekabu fermentadas sin adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular con adición de polimixina B	Lipopolisacárido de bajo peso molecular sin adición 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

10 **Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con la presente invención, se hace posible producir de forma económica el extracto vegetal fermentado que es un inmunopotenciador seguro. El extracto vegetal fermentado obtenido de este modo puede utilizarse en productos farmacéuticos, productos farmacéuticos para animales, cuasi fármacos, productos cosméticos, alimentos, alimentos funcionales, pienso y agentes de baño para mamíferos incluyendo seres humanos (en concreto, animales domésticos, mascotas, etc.), aves (en concreto, pollos de granja, aves domésticas, etc.), animales anfibios, reptiles, peces (en concreto, peces de acuicultura, peces ornamentales, etc.) e invertebrados.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método de fermentación y cultivo que comprende fermentar un material derivado de una planta comestible y que contiene hidratos de carbono, cuyo componente principal es un polisacárido, con una bacteria gramnegativa anaerobia facultativa que vive en una relación simbiótica de forma exclusiva con una planta, y cultivar de forma simultánea dicha bacteria gramnegativa anaerobia facultativa, en el que como fuente de carbono se fermenta el almidón contenido en dicho material derivado de una planta comestible, en el que dicha bacteria gramnegativa anaerobia facultativa es *Pantoea agglomerans*.
- 5
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la planta comestible es trigo y en donde el método comprende las etapas de:
- mezclar un solución de
- 15 -sal del 0,05 al 5 % y tampón fosfato de 0,005 a 1 mol, o
-fosfato de sodio (II) del 0,5 al 10 %, fosfato de potasio (I) del 0,05 al 5 %, cloruro de sodio del 0,05 al 5 % y cloruro de amonio del 0,05 al 5 %
- 20 con una suspensión de harina de trigo en agua del 0,05 al 10 %, y una solución de $MgCl_2$ de 0,2 a 3 molar y una solución de $CaCl_2$ de 0,2 a 3 molar, para proporcionar una suspensión de harina de trigo del 0,1 al 5 %,
-añadir *Pantoea agglomerans* aislada
-fermentar a 1 a 40 °C durante 6 horas hasta 1 semana
-finalizar la fermentación y recoger un componente sólido como precipitado mediante centrifugación a 1000 hasta 5000 RPM durante 10 hasta 60 min.
- 25
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método comprende adicionalmente las etapas de:
- suspender el componente sólido recogido como precipitado en agua o en tampón salino, calentar la suspensión a 80 hasta 140 °C durante 10 min hasta 6 horas, retirar el sólido por centrifugación o filtración, de forma opcional repetir varias veces las etapas de suspensión/calentamiento/retirada.
- 30
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el método comprende adicionalmente una etapa de purificación, dependiendo de los usos previstos del extracto.
- 35
5. Un extracto vegetal fermentado obtenido mediante el método de fermentación y cultivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el extracto vegetal presenta una capacidad de activación de macrófagos incluso en presencia de 12,5 µg/ml de polimixina B y a una concentración del extracto vegetal fermentado de 1000 hasta 10000 ng/ml.
- 40
6. El extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 5, el cual tiene una actividad inmunopotenciadora.
7. Polvo de extracto vegetal fermentado obtenido a partir del extracto vegetal fermentado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6.
- 45
8. Una composición de extracto vegetal fermentado que contiene el extracto vegetal fermentado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6 o el polvo de extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 7.
9. La composición de extracto vegetal fermentado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha composición de extracto vegetal fermentado se selecciona de un producto farmacéutico, un producto farmacéutico para animales, un cuasi fármaco, un producto cosmético, un alimento, un alimento funcional, un pienso y un agente de baño.
- 50

FIG. 1

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

