

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047226**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.21</p> <p>(21) Номер заявки
202190286</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2019.07.16</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A23L 21/20</i> (2016.01)
<i>A23L 33/135</i> (2016.01)
<i>A23K 10/18</i> (2016.01)
<i>A61Q 5/00</i> (2006.01)
<i>A61Q 19/00</i> (2006.01)
<i>A61Q 19/08</i> (2006.01)
<i>A61K 35/644</i> (2015.01)
<i>A61K 35/747</i> (2015.01)
<i>C12R 1/225</i> (2006.01)
<i>A61K 35/00</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРГИ**

- | | |
|--|---|
| <p>(31) 102018000007229</p> <p>(32) 2018.07.16</p> <p>(33) IT</p> <p>(43) 2021.07.16</p> <p>(86) PCT/IB2019/056055</p> <p>(87) WO 2020/016770 2020.01.23</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖУЛИАНИ С.П.А. (IT)</p> <p>(72) Изобретатель:
Джулиани Джаммария (CH), Гоббетти Марко, Ди Каньо Раффаэлла, Филаннино Паскуале, Кантаторе Винченцо, Масколо Антонио, Марцани Барбара (IT)</p> <p>(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)</p> | <p>(56) CN-A-1488282
CN-A-104286623
CN-A-105495494
CN-A-106072267
CN-A-107468835
WO-A1-2012102668
WO-A1-2008136730
Wafa Masoud Et Al.: "Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of Coffea arabica in East Africa", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, vol. 110, no. 3, August 2006 (2006-08), pages 291-296, XP055568298, NL, ISSN: 0168-1605, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030, abstract; figures 1, 2; table 1</p> |
|--|---|

- (57) Изобретение относится к биотехнологическому способу производства ферментированной пыльцы, включающему инокуляцию пыльцы по меньшей мере одной лактобактерией вида *Lactobacillus kunkeei*, выбранной из *Lactobacillus kunkeei* PF12 (DSM 32843), PF15 (DSM 32845) и/или PL13 (DSM 32844), и ферментацию пыльцы, инокулированной указанной молочной бактерией. Полученная ферментированная пыльца имеет питательные и органолептические свойства, аналогичные свойствам перги, производимой естественным образом в сотах улья, и находит применение в пищевой и нутрицевтической области. Изобретение также включает *Lactobacillus kunkeei* PF12 (DSM 32843), PF15 (DSM 32845) и/или PL13 (DSM 32844) как таковые и композиции, включающие эти штаммы.

B1**047226****047226 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к микробиологическому способу получения перги.

Настоящее изобретение относится к области биотехнологических способов производства пищевых, диетических или пищевых продуктов.

В частности, настоящее изобретение относится к биотехнологическому способу производства ферментированной пыльцы, подобной перге, которая естественным образом образуется в сотах улья.

Предшествующий уровень техники

Пыльца представляет собой мужской зародышевый элемент цветковых растений, который находится в пылеобразной форме в цветочных пыльниках, помещенных на концевую часть тычинок цветов, и состоит из микроскопических структур, которым растения доверяют транспорт своих половых клеток. Пчелы собирают ее и используют для производства маточного молочка и для кормления личинок.

В природе пыльца является основным источником белков, липидов, стероидов, минеральных веществ и витаминов для пчел (*Apis mellifera* L.), а в пищевой и диетической отрасли она вызывает растущий интерес из-за высокого содержания в ней питательных веществ. Пчелы собирают пыльцу соцветий растений или из окружающего среды и помещают ее в соты улья, где она смешивается с нектаром, медом и железистыми выделениями, образуя гранулы, которые составляют основной источник белка для личиночных форм и взрослых насекомых.

Пыльца в сотах улья подвергается ряду биохимических преобразований в основном под действием молочнокислых бактерий и других микроорганизмов. Пыльца, ферментированная внутри сот, называется "пергой" (Vasquez & Olofsson, 2009).

Перга имеет другой состав по сравнению с исходной пылью, поскольку последняя претерпела биохимические модификации, такие как уменьшение сложных полисахаридов, изменение профиля аминокислот, белков и липидов, а также увеличение простых углеводов и титрования кислотности (Lee et al., 2014; Human, Nicolson, 2006; Andelkovic et al., 2012).

Эти вариации делают пергу микробиологически стабильной средой, а ферментация пыльцы в сотах увеличивает ее усвояемость и питательную ценность по сравнению со свежей пылью.

Питательные и функциональные свойства, такие как антиоксидантная, противовоспалительная, гепатопротекторная, антиатеросклеротическая и иммуномодулирующая активность, делают пергу подходящим продуктом для человеческого рациона питания (Markiewicz-Zukowska et al., 2013; Nagai et al., 2004; Denisow and Denisow - Pietrzyk, 2016). Однако количество доступной перги недостаточно по сравнению с рыночным спросом, так как удаление из сот является дорогостоящим, может вызвать повреждение структуры улья, и в любом случае количество, присутствующее в ульях, не может удовлетворить потребности растущего рыночного спроса. Отсутствие этого продукта определяет высокую рыночную цену.

Пытаясь преодолеть эти ограничения и недостатки, пчеловоды собирают пыльцу непосредственно у кормящихся пчел у входа в ульи с помощью "пыльцевых ловушек", состоящих из решеток, удерживающих пыльцу на своей поверхности. Однако, в отличие от перги, которая не требует какого-либо кондиционирования, свежая пыльца не является стабильным субстратом и может стимулировать выработку микотоксинов. Поэтому собранную свежую пыльцу необходимо высушить или заморозить перед хранением. Однако было обнаружено, что сушка, проводимая при температуре выше 35°C, вызывает потерю питательных веществ и летучих соединений. С другой стороны, замораживание требует больших производственных затрат.

Компромисс между двумя технологиями представляет собой низкотемпературное обезвоживание. Однако эта технология оказалась менее эффективной, чем замораживание, в сохранении органолептических и питательных свойств перги. Таким образом, в настоящее время ощущается потребность в получении перги отличного от натурального происхождения, которая имеет такие же органолептические и питательные свойства, что и свежий продукт, в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей рынка.

Ввиду вышеизложенного промышленный способ получения перги, который позволяет получить количество продукта, подходящего для нужд рынка, при сохранении структуры улья, является частью общей задачи настоящего изобретения.

Одна из задач настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить микробиологический способ получения перги с органолептическими свойствами, аналогичными свойствам натурального продукта.

Другой задачей изобретения является создание биотехнологического способа получения перги, имеющей более высокую пищевую и функциональную ценность, чем свежая пыльца.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение исходит из наблюдения того, что при проведении ферментации пыльцы с выбранными фруктофильными лактобактериями воспроизводятся условия среды, аналогичные тем, которые типичны для естественной ферментации, которые приводят к образованию перги.

В частности, было обнаружено, что путем ферментации пыльцы специфическими фруктофильными лактобактериями в сочетании с выбранными дрожжами получается ферментированная пыльца, которая

может стать подобной натуральной перге, увеличивая выход при том же исходном количестве пыльцы.

Таким образом, заявитель идентифицировал выбранные штаммы лактобактерий, которые используют фруктозу в качестве предпочтительного субстрата относительно глюкозы в качестве источника углерода при получении перги, и использовал их в биотехнологическом способе для получения синтетической или полусинтетической перги.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение обеспечивает микробиологический способ получения перги, включающий:

стадию а) приготовления инокулята и инокуляции пыльцы иницирующими лактобактериями с использованием фруктозы в качестве предпочтительного субстрата относительно глюкозы в качестве источника углерода для получения перги и

стадию б) ферментации пыльцы, где указанный способ характеризуется тем, что инокулированные иницирующие молочные бактерии принадлежат к виду *Lactobacillus kunkeei*.

Авторы также обнаружили, что штаммы *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и их смеси особенно подходят в качестве иницирующих лактобактерий способа по настоящему изобретению.

Преимуществом перга, полученный биотехнологическим способом по изобретению, имеет пищевую ценность и более длительный срок хранения, чем пыльца естественного происхождения.

Перга, полученная способом по настоящему изобретению, также имеет более высокую пищевую ценность, чем пыльца, используемая в качестве исходного материала для способа. В частности, перга или ферментированная пыльца, полученные с помощью микробиологического/биотехнологического способа по изобретению, имеют более высокое общее содержание свободных аминокислот и пептидов, чем неферментированная пыльца, используемая в качестве исходного материала, и более высокое содержание усвояемых белков.

Кроме того, полученная перга или ферментированная пыльца имеют более высокие уровни растворимых свободных фенольных соединений, обычно обладающих клеточной антиоксидантной активностью, чем исходная пыльца.

Комбинация питательных и долговечных свойств перги, полученной с помощью настоящего способа, заметна с точки зрения питания и диеты и делает его пригодным для составления нутрицевтиков, диетических или пищевых продуктов. Преимуществом перга, полученная с помощью настоящего способа, имеет химический состав, типичный для перги, полученной путем защиты структуры улья. Согласно второму аспекту настоящее изобретение обеспечивает пергу или ферментированную пыльцу, полученную способом, определенным в соответствии с любым из воплощений, описанных в данном документе.

Согласно третьему аспекту изобретения предложена композиция, содержащая пергу или ферментированную пыльцу, полученную описанным в данном документе способом, и съедобный носитель.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются выбранные лактобактерии, принадлежащие к виду *Lactobacillus kunkeei*, предпочтительно выбранные из PF12, PF15 и PL13 и их смесей.

Согласно одному аспекту изобретение относится к трем бактериальным штаммам, принадлежащим к виду *Lactobacillus kunkeei*, причем указанными штаммами являются:

Lactobacillus kunkeei PF12, депонированный 4 июля 2018 г. под регистрационным номером DSM 32843 в Международном депозитарном центре Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;

Lactobacillus kunkeei PF15, депонированный 4 июля 2018 г. под регистрационным номером DSM 32845 в Международном депозитарном центре Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;

Lactobacillus kunkeei PL13, депонированный 4 июля 2018 г. под регистрационным номером DSM 32844 в Международном депозитарном центре Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

Три ранее идентифицированных штамма, сертификаты которых прилагаются, были депонированы на имя компании Giuliani S.p.A, владеющей настоящими правами.

Краткое описание чертежей

Признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из прилагаемых чертежей, на которых:

на фиг. 1 представлен график, показывающий значения плотности клеток лактобактерии (\log КОЕ/г) (сплошные линии) и титруемой кислотности (мл 0,1 М NaOH 10 г⁻¹) (ТТА) (пунктирные линии) во время инкубации при 30°C в течение 9 дней пыльцы, инокулированной комбинированной закваской (состоящей из *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B) (заштрихованные символы), и неинокулированной пыльцы, подвергнутой спонтанной ферментации (пустые символы);

на фиг. 2 показаны значения концентрации (мг·кг⁻¹) свободных аминокислот в свежей пыльце (черные столбцы) и в пыльце, ферментированной при 30°C в течение 216 ч (светлые столбцы) с использованием комбинированной закваски (состоящей из *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B);

на фиг. 3 показана гистограмма А со значениями усвояемости белков *in vitro* (выраженными в % от общего количества белков) в свежей пыльце (черная полоса) и в пыльце, ферментированной при 30°C в течение 216 ч (светлая полоса) с помощью комбинированной закваски (состоящий из *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B), и гистограмма В, показывающая две кривые, относящиеся к профилю пептидов, определенному методом молекулярной эксклюзионной хроматографии (RP-FPLC, 214 нм) в свежей пыльце (черный столбец) и в пыльце, ферментированной при 30°C в течение 216 ч (светлый столбец) с помощью комбинированной закваски (состоящей из *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B);

на фиг. 4 показаны гистограммы, относящиеся к концентрации (г экв. галловой кислоты кг^{-1} массы сухого вещества) водорастворимых свободных фенольных соединений (белые столбцы) и метанола (серые столбцы) в свежей пыльце и в пыльце, ферментированной при 30°C в течение 216 ч с помощью комбинированной закваски (состоящей из *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B);

на фиг. 5 показаны гистограммы, относящиеся к проценту жизнеспособности клеток кератиноцитов человека NCTC2544 после индукции окислительного стресса, индуцированного 1 мМ H_2O_2 в соответствии с тестом из примера 12. Клетки предварительно инкубировали в течение 16 ч со 100, 250 и 500 мкг/мл образца В, FER867, FER868, FER869, FER870 и FER871. Необработанные клетки (Контроль). Клетки, обработанные 1 мМ H_2O_2 (клетки, подвергшиеся воздействию H_2O_2). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,005$), **** ($p < 0,001$).

Эти результаты указывают на защиту соединений, испытанных на индуцированный окислительный стресс, и подчеркивают заметный антиоксидантный эффект ферментированной перги, полученной способом по настоящему изобретению;

на фиг. 6А и 6В показаны гистограммы, относящиеся к экспрессии гена $\text{TNF}\alpha$ в кератиноцитах человека NCTC2544, оцененной с помощью qRT-PCR согласно примеру 12. Клетки обрабатывали при 37°C в течение 16 ч (А) и 24 ч (В), 5% CO_2 , с помощью RPMI 2,5% FCS (контроль); RPMI 2,5% FCS и 10 мкг/мл LPS (контроль + LPS); 100, 250 и 500 мкг/мл образца А (FRESH), В (CONTROL) и FER867, FER868, FER869, FER870 и FER871. Необработанные клетки (Контроль). Клетки обрабатывали 10 мкг/мл LPS (LPS). Значения представляют собой среднее значение \pm SEM двух экспериментов, проведенных в двух экземплярах. Эти результаты указывают на противовоспалительную активность и подчеркивают заметный противовоспалительный эффект ферментированной перги, полученной способом по изобретению.

Подробное описание изобретения

Клетки обрабатывали при 37°C в течение 16 ч (А) и 24 ч (В), 5% CO_2 , с помощью: RPMI 2,5% FCS (контроль); RPMI 2,5% FCS и 10 мкг/мл LPS (контроль + LPS); 100, 250 и 500 мкг/мл образца А (FRESH), В (CONTROL) и FER867, FER868, FER869, FER870 и FER871.

Согласно общему аспекту изобретение относится к способу ферментации пыльцы по п.1 формулы изобретения.

Дополнительные воплощения способа изобретения определены в пп.2-7 формулы изобретения. Авторы наблюдали, что ферментированная пыльца, полученная способом по настоящему изобретению, имеет лучшие питательные свойства как относительно свежей пыльцы, так и относительно перги, ферментированной естественным путем в ульях, наряду с более длительным сроком хранения. Эта комбинация признаков делает ферментированную пыльцу, полученную способом по изобретению, особенно подходящей в качестве пищевого, диетического или нутрицевтического продукта. В качестве примера общее содержание свободных полифенолов, присутствующих в ферментированной пыльце, полученной способом по настоящему изобретению, равно 84,64 г экв. галловой кислоты на 1 кг массы сухого вещества, что значительно превышает содержание, указанное в литературе для перги, полученной естественным брожением, которое равно 8,9-36,52 г экв. галловой кислоты на 1 кг массы сухого вещества, как описано в литературе Markiewicz- Zukowska et al., 2013; Oltica et al., 2007; Zuluaga et al., 2015. Исходный материал для описанного в данном документе процесса основан на пыльце или состоит из нее. Подходящая пыльца может быть свежей или обезвоженной. Последняя больше подходит для реализации процесса в промышленных масштабах.

Подходящая обезвоженная пыльца представляет собой пыльцу, которая после сбора подвергается сушке в потоке горячего воздуха, например, для получения влажности, равной или меньшей 12%. Низкое содержание воды, например относительная влажность ниже 0,5, делает пыльцу достаточно стабильным сырьем при правильной упаковке и хранении. Как правило, обезвоженная пыльца имеет форму гранул, цвет которых зависит от вида или различных ботанических видов, которые посещают пчелы. Например, подходящая обезвоженная пыльца мультифлоры имеет следующие органолептические характеристики:

Внешний вид: гранулы небольшого размера, разной окраски в зависимости от ботанического вида происхождения.

Запах: овощной, сухой травы.

Вкус: характерный, овощной, сушеных цветов, сена.

Растворимость: плохо растворяется в воде и в органических растворителях.

Вода: от 7 до 15%.

Углеводы: от 25 до 48%.

Белки: от 11 до 28%.

Липиды: от 1 до 14%.

Минеральные соли: от 1 до 5%.

В рамках способа, описанного в данном документе, обезвоженная пыльца, которая обычно встречается в форме гранул или агломерированных частиц, может использоваться как есть, или ее можно предварительно обработать для разрушения или деградации внешней оболочки гранул, чтобы сделать внутреннее содержимое доступным для ферментативной активности инокулированных микроорганизмов.

Чтобы разрушить слой покрытия пыльцевых зерен, обычно содержащий целлюлозу, пектиновые вещества, каротиноиды и полифенолы, можно использовать физическую обработку, например, механическую или биологическую обработку. Чтобы разрушить слой покрытия пыльцевых зерен, обычно содержащий целлюлозу, пектиновые вещества, каротиноиды и полифенолы, можно использовать физическую обработку, например механическую или биологическую обработку. Чтобы разрушить внешнюю стенку гранулы пыльцы, можно выполнить дробление или уменьшение размеров гранул на более мелкие частицы или другие технологии, которые существенно не изменяют питательные свойства исходной матрицы или пыльцы или которые позволяют получать продукты с более высокой пищевой ценностью. Деградация внешнего слоя пыльцевых зерен может включать обработку для уменьшения их размера с использованием оборудования, традиционно используемого в пищевой или фармацевтической промышленности.

В качестве примера можно использовать оборудование, которое включает прохождение пыльцы через металлическую сетку с зазором, соответствующим требованиям, такое как вибрационные грануляторы, или использовать различные типы мельниц, таких как ножевая мельница, шаровая мельница и т.п. или микронайзеры или комбинации этого оборудования.

Уменьшение размера или измельчение пыльцевых зерен можно также проводить с использованием мокрых методов, например с использованием четырехходовых миксеров с измельчителем и ножами, роторно-статорных гомогенизаторов, погруженных в текучую среду, ультразвуковых систем и других имеющихся в продаже устройств.

Также могут быть использованы термическая обработка, необязательно, при более высоком, чем окружающее, давлении, или ультразвуковая обработка, или другие способы, которые позволяют осуществить холодную пастеризацию с помощью высокого давления, такие как обработка под высоким давлением (HPP). Например, в случае термической обработки под давлением пыльцу можно удобно ресуспендировать в 10% воды.

В случае обработки ультразвуком можно использовать пыльцу в чистом виде. Также можно использовать в качестве исходного материала очищенные экстракты пыльцы, полученные из энтомофильной пыльцы, предварительно подвергнутой одной или нескольким стадиям экстракции растворителем, например смесью воды и спирта.

Согласно некоторым воплощениям внешний покровный слой пыльцы разрушается в результате биологического разложения, например, путем обработки пыльцы дрожжами. Соответственно, некоторые воплощения способа по изобретению предусматривают добавление дрожжей, которые разрушают или метаболизируют пектиновый компонент, покрывающий пыльцевые зерна. Обычно добавление дрожжей может происходить до или во время стадии а) способа.

Добавленные дрожжи вступают в контакт с пыльцевыми зернами, запуская процесс распада внешнего покрытия пыльцы, что облегчает контакт между питательными веществами, присутствующими внутри зерна, и лактобактериями, инокулированными на стадии б) способа.

Обычно добавление дрожжей осуществляется, когда исходная пыльца не подвергалась обработке и, в частности, не подвергалась механическому воздействию, например, истиранию или измельчению, направленному на разрушение покровного слоя зерна.

Согласно предпочтительному воплощению дрожжи, которые разлагают или метаболизируют пектиновый компонент, покрывающий пыльцевое зерно, принадлежащее к видам *Wickerhamomyces anomalus* или *Hanseniaspora uvarum*, представляют собой смесь двух видов.

Согласно одному воплощению используемые дрожжи представляют собой штамм *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B.

В одном из воплощений способа по настоящему изобретению инокулят готовят с использованием самой пыльцы в качестве субстрата для роста.

В других воплощениях субстрат для роста инокулированных микроорганизмов представляет собой подходящую культуральную среду, такую как фруктозный дрожжевой пептон (FYP), FYP необязательно содержит дрожжевые или растительные экстракты и пептоны, которые обеспечивают микроорганизмы питательными веществами, необходимыми для быстрого роста.

Альтернативно, можно использовать смесь пыльцы и экстрактов/пептонов.

В предпочтительном воплощении способа изобретения инокулят лактобактерий и дрожжей готовят

отдельно.

Стадия b) ферментации способа осуществляется путем инокуляции лактобактерий, обычно принадлежащих к роду *Lactobacillus*, предпочтительно вида *Lactobacillus kunkeei*.

Согласно предпочтительному воплощению стадия a) способа включает инокуляцию лактобактерий, принадлежащих к виду *Lactobacillus kunkeei*, выбранному из штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и их смесей. У каждого из этих выбранных бактериальных штаммов способность к росту и образованию колоний на субстрате на основе пыльцы неожиданно выше, чем у других лактобацилл, также принадлежащих к виду *Lactobacillus kunkeei*. Кроме того, указанные три штамма обладают удивительной способностью подкислять и продуцировать противомикробные соединения, как показано в экспериментальной части, представленной в примерах ниже. Преимущественно стадию ферментации в способе изобретения проводят внутри биореактора, обычно в аэробных условиях.

Согласно некоторым воплощениям влажность продукта внутри биореактора составляет от 30 до 95% от общей массы.

Обычно смесь, содержащая пыльцу и инокулированный микроорганизм, может быть в полутвердой форме, когда значения влажности низкие, например от 30 до 45%, и в полутвердой или жидкой форме, когда значения влажности высокие, например от 60 до 95%.

Согласно некоторым воплощениям pH среды в биореакторе в начале стадии b) ферментации находится в диапазоне от 4 до 6. В предпочтительном воплощении изобретения pH системы имеет значение в диапазоне $5,25 \pm 0,25$ и, возможно, корректируется в пределах указанного диапазона путем добавления обычного корректора pH.

Как правило, на стадии b) предложения отслеживаются следующие параметры и условия реакции:

- количество сахаров (глюкоза и фруктоза);
- общая титруемая кислотность pH;
- молочная кислота и уксусная кислота;
- плотность клеток.

Способ можно прервать, когда будут получены искомые количества органических кислот/плотность клеток/свободные фенольные кислоты/остаточные сахара/свободные аминокислоты. В воплощении способа по настоящему изобретению полученную ферментированную пыльцу подвергают стадии c) для снижения микробной нагрузки. В соответствии с одним из воплощений, полученную ферментированную пыльцу, необязательно подвергнутую стадии c), подвергают стадии холодной сушки, например криосушке, обычно в лиостате. Альтернативно, ферментированную пыльцу можно удобно хранить замороженной после центрифугирования, например, при температурах порядка -40°C или ниже.

В другом воплощении изобретения ферментированная пыльца лиофилизируется с целью сохранения живых и жизнеспособных микроорганизмов. В качестве альтернативы полученная ферментированная пыльца или биомасса могут храниться в замороженном виде, обычно после центрифугирования, при температурах ниже 0, например порядка -40°C или ниже.

Для целей настоящего изобретения для удаления воды из ферментированной пыльцы могут быть также использованы другие традиционные методы, например, с помощью распылительной сушки.

Согласно одному воплощению способ изобретения включает следующие стадии:

поставка исходного материала на основе свежей необработанной пыльцы, предпочтительно хранящейся при -20°C , или высушенной или осушенной пыльцы, удобно хранящейся при 4°C или при комнатной температуре, и/или необязательно предварительно обработанной путем измельчения, пульверизации, микронизации, термообработки, обработки под высоким давлением и/или ультразвуком, или экстракта пыльцы;

необязательное разбавление обычно дистиллированной водой и корректировки значения pH пыльцы до достижения значения в пределах $5,25 \pm 0,25$;

инокуляция клеточных суспензий, содержащих лактобактерии, выбранные из штаммов *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 или их смесей, и, возможно, инокуляции дрожжей с пектинолитической активностью, принадлежащих к роду *Wickerhamomyces* или к видам *Hanseniaspora uvarum*, например штамму AN8Y27B;

добавление обычно дистиллированной воды до достижения конечной влажности от 30 до 95%. Как правило, конечное значение влажности также включает начальное содержание воды в пыльце, равное, например, примерно 21,56%, и воду, добавленную на стадии инокуляции;

инкубация при 30°C , предпочтительно в течение 24-216 ч в стерильных пробирках или в биореакторе, и выделение полученной ферментированной пыльцы.

Согласно некоторым воплощениям ферментированная пыльца, полученная описанным выше способом, может быть подвергнута криосушке в лиостате или может быть заморожена, предпочтительно после центрифугирования, при температуре около -20°C или ниже.

В некоторых воплощениях ферментированная пыльца может быть подвергнута обработке для снижения микробной нагрузки, удаления воды или другой обработки для стабилизации ферментированной пыльцы.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение обеспечивает пергу или ферментированную пыльцу, полученные с помощью способа, описанного в соответствии с любым из воплощений, описанных в данном документе. Ферментированная пыльца, полученная способом по настоящему изобретению, имеет более высокие уровни свободных растворимых фенольных соединений, чем исходная пыльца. Эти и другие особенности подробно проиллюстрированы в следующих примерах. В других воплощениях изобретения жидкая фракция, возможно, полученная на стадии b) ферментации, отделяется от твердого компонента и используется для пищевых, диетических или нутрицевтических целей.

Как жидкие, так и твердые фракции могут найти применение в питании.

Согласно третьему аспекту изобретения предоставляется пищевая или диетическая композиция, содержащая ферментированную пыльцу, полученную в соответствии с любым из воплощений, описанных в данном документе, и съедобный носитель.

Согласно четвертому аспекту предлагается композиция, содержащая лактобактерии, принадлежащие штаммам *Lactobacillus kunkeei*, штаммам *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и их смесям, и съедобный носитель.

Бактериальные штаммы композиции могут быть живыми и жизнеспособными или в инактивированной форме в соответствии с традиционными методами, например, путем тиндаллизации.

Описанные в данном документе композиции подходят для перорального введения.

Композиции для перорального введения могут быть в твердой или жидкой форме. В случае твердой формы они содержат пергу, полученную описанным в данном документе способом, в качестве биологически активного компонента и одного или нескольких физиологически приемлемых наполнителей.

Типичные композиции в твердой форме включают таблетки, гранулы, капсулы, порошки, лекарственные формы для немедленного приема, конфеты, жевательные резинки, желейные бобы различного состава и формы.

Настоящее изобретение применимо к любой твердой, полутвердой и жидкой лекарственной форме, которая может стать съедобным носителем для осуществления изобретения.

Настоящее изобретение применимо ко всем лекарственным формам, в которых композицию разбавляют перед введением или используют как таковой в твердой, полутвердой или жидкой форме. Таблетки обычно включают подходящий носитель или наполнитель, в котором растительный экстракт диспергирован, обычно в сухой форме.

В этом случае подходящие эксципиенты, содержащиеся в составе, представляют собой производные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиэтилцеллюлоза, этилгидроксипропилцеллюлоза, их смесь ацетат целлюлозы, ацетат целлюлозы и их смесь.

Дополнительные примеры подходящих наполнителей включают полимеры, принадлежащие к семейству лактамов, такие как пирролидон и его производные, например поливинилпирролидон, поливинилполипирролидон и их смеси, неорганические соли, такие как фосфат кальция или дикальция, смазывающие вещества, такие как стеарат магния, триацилглицерины и их смеси.

В случае жидкой формы композиция содержит жидкую фракцию, выделенную в конце стадии b) ферментации, в качестве биологически активного компонента и один или несколько физиологически приемлемых наполнителей.

Типичные композиции в жидкой форме включают растворы, эмульсии, суспензии, сиропы.

Перга или ферментированная пыльца, полученные способом по изобретению, содержащиеся в композиции по изобретению, могут присутствовать в различных количествах, например в диапазоне от 0,0001 до 100% по массе; от 0,001 до 50% по массе, от 0,1 до 20% по массе, обычно от 0,5 до 5% по массе.

Согласно некоторым воплощениям композиция по изобретению дополнительно содержит одно или несколько активных веществ, таких как витамины, минеральные вещества, микроэлементы и другие активные вещества.

Согласно некоторым воплощениям композиция для перорального введения представляет собой функциональный пищевой продукт, нутрицевтическую композицию, диетический продукт, добавку или нутрицевтический продукт.

Композиция может продаваться в обычных лекарственных формах, таких как саше из термосварного алюминия типа саше или стик-упаковка, содержащая твердый компонент или дисперсию твердого компонента в жидкости, контейнеры для немедленного восстановления твердого вещества в жидкости, твердые или мягкие капсулы, содержащие твердое вещество, диспергированное в пищевом масле или другой совместимой жидкости, флаконы или бутылки, содержащие дисперсию твердого вещества в жидкости.

Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к перге, полученной в соответствии с любым из воплощений способа, описанного в данном документе, или к композиции, которая его содержит, для применения при лечении метаболических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, костных заболеваний, заболеваний головного мозга или заболеваний кишечника или в качестве фактора, определяющего функциональность кишечной микробиомы.

Согласно другим аспектам настоящее изобретение обеспечивает применение перги, полученной в соответствии с любым из воплощений способа, описанного в настоящем документе, или композиции, которая ее содержит, для лечения пероральным приемом или косметического применения кожи, в частности, в качестве лечения, предотвращающего старение, или для уменьшения старения кожи, для лечения волос.

Перга, полученная способом по настоящему изобретению, обладает клеточной антиоксидантной активностью и используется для предотвращения или лечения заболеваний, которые вызывают нефизиологическое продуцирование свободных радикалов, обычно кожных заболеваний, таких как опухоли, предраковые или актинические заболевания или состояния покраснения, например, как следствие солнечных ожогов, высыпаний на коже, шероховатости или старения кожи. Кроме того, перга по настоящему изобретению находит применение для поддержания организма человека в физиологических условиях здоровья.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к выбранным лактобактериям, принадлежащим к виду *Lactobacillus kunkeei*, выбранным из PF12, PF15 и PL13 и их смесей.

Авторы изобретения выбрали штаммы *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 для неожиданно улучшенной способности к росту, подкислению, показанной в табл. 1, для производства противомикробных соединений, показанных в табл. 2 и 3, по сравнению с другими штаммами, принадлежащими к одному виду. В качестве примера ниже описан протокол, используемый для отбора бактериальных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13. Протокол, который более подробно описан в следующем примере 1, включает тестирование штаммов бактерий, выделенных из цветов, пыльцы, перги и из желудочно-кишечного тракта пчел.

Была протестирована способность идентифицированных штаммов к росту, подкислению и выработке антимикробных соединений.

Водный экстракт пыльцы использовали в качестве модельной системы для роста бактерий. Экстракт пыльцы получали в соответствии с процедурой, представленной ниже. 100 г пыльцы добавляли со стеклянными шариками, смешивали с 1 л дистиллированной воды и перемешивали при 500 об/мин в течение 2 ч. Смесь центрифугировали при 10000×g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость собирали и остаток последовательно экстрагировали 1 л подкисленного метанола (0,1% HCl, об./об.), смесью гексан/ацетон/этанол 50:25:25 (об./об./об.) и кипящей воды соответственно, как описано выше. Все экстракты сушили и растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (DMSO), смешивали вместе и дополнительно добавляли дистиллированной водой до конечного объема 1 л. Экстракт пыльцы стерилизовали стерильной фильтрацией на мембране с пористостью 0,22 мкм. Штаммы инокулировали индивидуально при конечной плотности клеток примерно 7,0 log КОЕ/мл и экстракт пыльцы инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Отслеживали рост и подкисление, а кинетику роста и подкисления у штаммов математически моделировали с использованием уравнения Гомперца. Антимикробная активность штаммов была протестирована против 8 плесневых или патогенных бактерий-индикаторов и 8 грибов-индикаторов. Для проверки антимикробной активности штаммов лактобактерии выращивали в экстракте пыльцы при 30°C в течение 24 ч, надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 10000 мкг в течение 10 мин при 4°C и стерилизовали стерильной фильтрацией на мембране с пористостью 0,22 мкм. Антибактериальную активность определяли с помощью диффузионных лунок с агаром, а фунгицидную активность определяли с помощью анализа с разведением в агаровой среде.

В табл. 1 приведены данные о плотности клеток, выраженной как оптическая плотность, DO_{620} и подкисление, выраженное как изменение pH (Δ pH) в экстракте пыльцы, ферментированном в течение 24 ч при 30°C штаммами лактобактерий, принадлежащих к разным видам и выделенных из цветов, пыльцы, перги и из желудочно-кишечного тракта пчел.

Таблица 1

Штаммы	DO ₆₂₀	ΔрН
Lactobacillus kunkeei PF12	2,102	1,05
L. kunkeei PF18	2,030	0,83
L. kunkeei PF16	1,993	0,94
L. kunkeei PLA21	1,890	0,71
L. kunkeei PL13	1,882	1,03
L. kunkeei PL9	1,863	0,66
L. kunkeei PL28	1,763	0,97
L. kunkeei PF15	1,762	0,69
L. kunkeei BIII60	1,758	0,78
L. kunkeei B17	1,758	0,79
L. kunkeei BV61	1,734	0,95
L. kunkeei PL24	1,682	0,61
L. kunkeei PLA14	1,636	0,63
L. kunkeei PL15	1,621	0,80
L. kunkeei PFA7	1,601	0,77
L. kunkeei PL33	1,597	0,81
L. kunkeei PF6	1,551	0,63
L. kunkeei PFA3	1,517	0,70
L. kunkeei PL3	1,475	0,75
L. kunkeei PLA6	1,473	0,79
F. fructosus B4	1,426	0,88
L. kunkeei PL31	1,419	0,62
L. kunkeei PFA2	1,412	0,70
L. kunkeei PLA13	1,402	0,58
L. kunkeei PFB7	1,340	0,83
L. kunkeei PL27	1,327	0,71
Lactobacillus plantarum PLB16	1,228	0,55
L. kunkeei PF7	1,222	0,69
L. plantarum PLB15	1,123	0,55
L. kunkeei B4I	1,105	0,68
L. kunkeei PLA16	0,921	0,48
L. kunkeei PFA15	0,918	0,63
L. kunkeei PLB30	0,892	0,59
L. plantarum PLB1	0,822	0,43
L. kunkeei PFA5	0,801	0,57
L. kunkeei PFA35	0,781	0,42
Fructobacillus fructosus MBIII5	0,686	0,22
L. kunkeei B7	0,678	0,40
L. kunkeei BVI14	0,672	0,28
L. kunkeei PLA8	0,640	0,42
L. kunkeei PFB13	0,581	0,47
L. kunkeei B231	0,538	0,28
L. kunkeei BVI52	0,426	0,24
L. kunkeei PFA4	0,421	0,43
L. kunkeei BV20	0,349	0,13
F. fructosus PFB34	0,342	0,34
F. fructosus PFA34	0,324	0,22
L. kunkeei PFA12	0,308	0,28
F. fructosus PFB29	0,305	0,27
L. kunkeei PLA9	0,303	0,12
F. fructosus B5	0,300	0,26
L. kunkeei BIII59	0,296	0,27

F. fructosus PL22	0,285	0,10
F. fructosus B1	0,243	0,06
F. fructosus PFA25	0,231	0,17
F. fructosus PFA18	0,228	0,19
L. kunkeei PFA9	0,224	0,18
L. kunkeei PLB20	0,223	0,14
L. kunkeei PLB18	0,223	0,14
L. kunkeei PL20	0,182	0,14
L. kunkeei PLB12	0,174	0,19
L. kunkeei PLA24	0,169	0,13
F. fructosus PFA23	0,135	0,15
F. fructosus PL17	0,133	0,04
L. kunkeei PFB3	0,123	0,11
F. fructosus PLA1	0,121	0,09
L. kunkeei PF10	0,112	0,06
Lactobacillus curvatus PFB10	0,112	0,16
L. kunkeei PLB17	0,112	0,12
L. kunkeei PF29	0,110	0,14
Lactococcus lactis PFB12	0,110	0,16
L. curvatus PFB19	0,109	0,10
L. kunkeei PF5	0,108	0,03
F. fructosus MBIII2	0,108	0,27
L. kunkeei PLB29	0,104	0,06
L. kunkeei PL12	0,099	0,16
F. fructosus PL10	0,097	0,11
F. fructosus PLB6	0,096	0,11
F. fructosus PL25	0,086	0,02
L. curvatus PL34	0,085	0,10
Leuconostoc citreum PFB11	0,084	0,08
L. curvatus PL32	0,082	0,08
F. fructosus PFB26	0,082	0,13
L. curvatus PLB7	0,080	0,03
L. kunkeei BV117	0,080	0,03
F. fructosus PL21	0,078	0,09
L. lactis EF70	0,075	0,06
L. curvatus PFB30	0,073	0,05
L. curvatus PFB8	0,073	0,04
L. lactis EF67	0,069	0,04
L. lactis PFB15	0,052	0,04
L. kunkeei PLB34	0,046	0,07
L. kunkeei PF1	0,044	0,09

Как видно из экспериментальных данных, выбранные штаммы *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 обладают неожиданно более высокой способностью к росту и подкислению, чем те, которые были обнаружены для других испытанных штаммов, принадлежащих к тем же видам бактерий.

В табл. 2 представлены спектры ингибирования* экстракта пыльцы, ферментированного штаммами лактобактерий при 30°C в течение 24 ч. Антибактериальная активность была протестирована против 8 плесневых или патогенных бактерий-индикаторов[†]. Экстракт неферментированной пыльцы использовали в качестве контроля.

Таблица 2

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

<i>plantarum</i>								
PLB16								
<i>L. plantarum</i>								
PLB15	-	+	++	+++	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i>								
B41	+	+	+	++++	+	-	+	-
<i>L. kunkeei</i>								
PF7	-	++	+++	++++	++++	+++	++	++
<i>L. kunkeei</i>								
PFA15	-	+	++	++++	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i>								
PLB30	+	+++	+	++++	++	++	+	-
<i>L. kunkeei</i>								
PFA5	-	++	++	++++	++	++	++	++
<i>L. kunkeei</i>								
PLA16	+	+	+	++++	+	-	+	-
<i>L. plantarum</i>								
PLB1	-	+	+	++++	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i>								
PFA35	+	+++	+++	++++	++	+	++	-
<i>L. kunkeei</i>								
B7	-	++	++	++++	++++	++	++	++
<i>L. kunkeei</i>								
PLA8	-	+	++	++++	+	++++	++	-
<i>L. kunkeei</i>								
PFB13	-	++	++	++++	++++	++	++	++
<i>L. kunkeei</i>								
PFA4	-	++	++	+++	+++	++	++	++

* Антибактериальная активность оценивалась следующим образом:

-: нет ингибирования;

+: ореол ингибирования диаметром <1 мм;

++: ореол ингибирования диаметром 1-2,5 мм;

+++ : ореол ингибирования диаметром 2,5-4,0 мм;

++++: ореол ингибирования диаметром 4,0-6 мм;

+++++: ореол ингибирования диаметром >6 мм.

‡ Условия роста: *Staphylococcus aureus* DSM 20231, среда с соево-дрожжевым экстрактом Trypticase при 37°C; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, инфузионная среда для мозга и сердца при 37°C; *Escherichia coli* DSM 30083, бульон Лурия-Бертани при 37°C; *Bacillus megaterium* F6, бульон Лурия-Бертани при 30°C; *Pantoea agglomerans* DTB8, Питательный бульон при 30°C; *Escherichia hermannii* PS2, питательный бульон при 30°C; *Serratia marcescens* DR8, питательный бульон при 30°C; *Serratia marcescens* DR10, питательный бульон при 30°C.

В табл. 3 показан спектр ингибирования* экстракта пыльцы, ферментированного лактобактериями при 30°C в течение 24 ч. Противогрибковая активность проверена на 8 штаммах грибов-индикаторов‡. Процент ингибирования роста мицелия рассчитывали относительно роста индикаторного штамма на картофельном агаре с декстрозой (PDA) с добавлением неферментированного экстракта пыльцы.

Таблица 3

	<i>Aspergillus versicolor</i> CBS 117286	<i>Aspergillus niger</i> DPPMAF3	<i>Penicillium roqueforti</i> DPPMA1	<i>Penicillium polonicum</i> CBS 112490	<i>Penicillium albocoremium</i> CBS 109582	<i>Aspergillus parasiticus</i> CBS 971.97	<i>Penicillium paneum</i> CBS 101032	<i>Penicillium bialowiezen se</i> CBS 110102
<i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12	+++	++	++	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF16	+++	-	-	-	++	+	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL13	+++	-	-	+	++	++	++	-
<i>L. kunkeei</i> PL28	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> BV61	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF18	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> B17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> BIII60	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA21	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. fructosus</i> B4	-	-	++	-	-	++	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFB7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL27	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA2	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA3	-	-	++	-	-	-	-	+
<i>L. kunkeei</i> PL3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL33	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PFA7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL24	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA14	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF6	-	++	+	-	-	++	-	-
<i>L. kunkeei</i> PL31	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PLA13	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> PLB16	-	-	+	-	++	-	-	-
<i>L. plantarum</i> PLB15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> B4I	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> PF7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

PFA15									
<i>L. kunkeei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLB30									
<i>L. kunkeei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFA5									
<i>L. kunkeei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLA16									
<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLB1									
<i>L. kunkeei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFA35									
<i>L. kunkeei</i> B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i>	-	-	+	-	++	-	-	-	-
PLA8									
<i>L. kunkeei</i>	++	-	+	-	-	-	-	-	-
PFB13									
<i>L. kunkeei</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PFA4									

*Фунгицидная активность оценивалась следующим образом:

-: нет ингибирования;

+: ингибирование радиального роста мицелия на <25%;

++: ингибирование радиального роста мицелия на 25-50%;

+++ : подавление радиального роста мицелия на 50-75%;

++++: ингибирование радиального роста мицелия >75%.

‡Условия выращивания: картофельный агар с декстрозой при 25°C в течение 8 дней.

Экспериментальные данные табл. 2 и 3 дополнительно подчеркивают, что выбранные штаммы *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 обладают удивительно более высокой антимикробной активностью, чем обнаруженная для других испытанных штаммов, принадлежащих к тому же или другому виду бактерий.

Терминология.

В данном контексте термин "пыльца" означает энтомофильную пыльцу, собранную пчелами-сборщицами и обработанную ими; указанная пыльца может происходить от одного из ботанических видов (монофлора) или от нескольких ботанических видов (мультифлора). Функциональная пища означает любой модифицированный пищевой продукт или пищевой ингредиент, который может обеспечить пользу или защиту от проблемы или физиологического состояния в дополнение к традиционным питательным веществам, которые содержатся в них.

Нутрицевтический продукт означает продукт, выделенный или очищенный от съедобных веществ.

Нутрицевтики считаются таковыми, если показано, что они обладают физиологическими преимуществами или обеспечивают защиту от проблемы или физиологического расстройства. Диетическая или пищевая добавка означает продукт, содержащий витамин, минеральное вещество, растительный экстракт, аминокислоту, метаболит, экстракт, концентрат или смеси этих ингредиентов.

Термин "съедобный носитель" означает любой съедобный носитель, который можно использовать в составе пищевого продукта, нутрицевтика или диетической/пищевой добавки.

В рамках настоящего описания термины "перга" и "ферментированная пыльца", полученные способом по настоящему изобретению, обозначают один и тот же продукт и являются взаимозаменяемыми.

Органолептические и/или питательные свойства традиционной перги, описанной в предыдущей главе, посвященной предшествующему уровню техники, по существу аналогичны свойствам ферментированной пыльцы, полученной способом по настоящему изобретению.

Представленные ниже примеры приведены только для иллюстративных целей некоторых воплощений изобретения.

Пример 1.

Протокол отбора бактериальных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13.

Чтобы выбрать три штамма заквасочных лактобактерий, 93 штамма, принадлежащих к разным видам и выделенных из цветов, пыльцы, перги и желудочно-кишечного тракта пчел, были протестированы на их способность расти, подкислять и продуцировать антимикробные соединения.

Экстракт пыльцы использовали в качестве модельной системы для роста бактерий. Экстракт пыльцы получали следующим образом.

100 г пыльцы добавляли к стеклянным шарикам, смешивали с 1 л дистиллированной воды и перемешивали при 500 об/мин в течение 2 ч. Смесь центрифугировали при 10000×g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость собирали и остаток последовательно экстрагировали 1 л подкисленного метанола (0,1% HCl, об./об.), смесью гексан/ацетон/этанол 50:25:25 (об./об./об.) и кипящей воды соответственно, как описано выше. Все экстракты сушили и растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (DMSO), смешива-

ли вместе и дополнительно разбавляли дистиллированной водой до конечного объема 1 л. Экстракт пыльцы стерилизовали стерильной фильтрацией на мембране с пористостью 0,22 мкм. Штаммы инокулировали индивидуально до конечной плотности клеток около $7,0 \log$ КОЕ/мл, и экстракт пыльцы инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Отслеживали рост и подкисление, а кинетику роста и подкисления у штаммов математически моделировали с использованием уравнения Гомперца. Антимикробная активность штаммов была протестирована против 8 плесневых или патогенных бактерий-индикаторов и 8 грибов-индикаторов. Для проверки антимикробной активности штаммов лактобактерии выращивали в экстракте пыльцы при 30°C в течение 24 ч, надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 10000 мкг в течение 10 мин при 4°C и стерилизовали стерильной фильтрацией на мембране с пористостью 0,22 мкм. Антибактериальную активность определяли с помощью диффузионных лунок с агаром, а фунгицидную активность определяли с помощью анализа с разведением в агаровой среде.

Штаммы *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 были отобраны, потому что они обладали лучшей способностью к росту, подкислению (табл. 1 выше) и выработке противомикробных соединений (табл. 2 и 3 выше).

Пример 2.

Ферментация экстракта пыльцы с использованием лактобактерий.

Экстракт пыльцы, полученный в соответствии с протоколом, описанным в примере 1, использовали в качестве модельной системы для роста 93 лактобактерий, чтобы проверить их способность к росту и подкислению. Штаммы выращивали в бульоне FYP (10 г D-фруктозы, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г полипептона*, 2 г ацетата натрия, 0,5 г Tween 80, 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г NaCl на 1 л дистиллированной воды [рН 6,8]) при 30°C в течение 24 ч. Клетки извлекали центрифугированием (10000×g в течение 10 мин при 4°C), дважды промывали 50 мМ фосфатным буфером, рН 7,0, и суспендировали в экстракте пыльцы до конечной плотности около $7 \log$ КОЕ/мл. Затем экстракт пыльцы инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Во время инкубации отслеживали рост (оптическая плотность, DO_{620}) и подкисление (изменение рН, ΔpH).

Результаты.

Девяносто три штамма лактобактерий, принадлежащих к разным видам, были протестированы на их способность к росту и подкислению в экстракте пыльцы (табл. 1). Наибольшие значения плотности клеток (DO_{620} 1,473-2,102) и наибольшая подкисляющая способность были обнаружены в экстрактах пыльцы, ферментированных штаммами, принадлежащими к виду *Lactobacillus kunkeei* (табл. 1).

Пример 3.

Антимикробная активность экстракта пыльцы, ферментированного выбранными штаммами лактобактерий.

Антимикробная активность экстракта пыльцы, ферментированного выбранными штаммами лактобактерий. Антибактериальную активность экстракта оценивали методом диффузии из лунок с агаром. Анализы проводили на двойном слое, состоящем из 15 мл агар-вода (2% агар, мас./об.) и 5 мл специфической агаровой среды для роста штамма-индикатора (табл. 2), и инокулировали до плотности клеток примерно $4 \log$ КОЕ/мл с клетками, выделенными из культуры штамма-индикатора, инкубированного в течение 24 ч при оптимальной температуре роста. Лунки (диаметром 5 мм) делали в двойном слое и в каждую лунку добавляли 100 мкл ферментированного бесклеточного экстракта пыльцы. Экстракт неферментированной пыльцы использовали в качестве контроля. Чашки хранили в течение 1 ч при 4°C , чтобы обеспечить радиальную диффузию экстракта пыльцы, и инкубировали при 30 или 37°C в течение 24 ч. Противогрибковую активность экстракта оценивали методом разведения в агаре, оценивая скорость радиального роста грибного мицелия, используемого в качестве индикатора (табл. 3). Ферментированный бесклеточный экстракт пыльцы добавляли в концентрации 30% (об./об.) в среду для выращивания (картофельный агар с декстрозой, PDA) и 15 мл среды выливали в чашки Петри (диаметром 90 мм). Контрольные чашки содержали только PDA без добавления экстракта пыльцы. Анализ проводился путем помещения шляпок мицелия диаметром 3 мм в центр чашек Петри, содержащих культуральную среду. Радиальный рост мицелия (диаметр в мм) определяли через 8 суток инкубации при 25°C в аэробных условиях. Процент ингибирования роста рассчитывается следующим образом: [(рост мицелия в контроле - рост мицелия в присутствии экстракта пыльцы)/рост мицелия в контроле] × 100. Результаты выражаются как среднее значение по меньшей мере 4 измерений роста мицелия.

Результаты.

Экстракты ферментированной пыльцы обладали высокой антибактериальной и фунгицидной активностью, значительно ($P < 0,05$) выше, чем у экстракта неферментированной пыльцы (табл. 2 и 3). Использование штаммов *L. Kunkeei* PF12, PF15 и PL13 в виде смешанных заквасок обеспечивает самый широкий спектр ингибирования.

Пример 4.

Протокол приготовления и инокуляции культур *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13.

1) Выращивание штаммов *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 в бульоне FYP (10 г D-фруктозы, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г полипептона*, 2 г ацетата натрия, 0,5 г Tween 80, 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г

MnSO₄·4H₂O, 0,01 г FeSO₄·7H₂O, 0,01 г NaCl на 1 л дистиллированной воды [pH 6,8]) при 30°C в течение 24 ч.

- 2) Центрифугирование каждого культурального бульона при 10000×g в течение 10 мин при 4°C.
 - 3) Удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в физиологическом растворе (9 г/л NaCl).
 - 4) Центрифугирование каждой клеточной суспензии при 10000×g в течение 10 мин при 4°C.
 - 5) Удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в физиологическом растворе (9 г/л NaCl).
 - 6) Центрифугирование каждой клеточной суспензии при 10000×g в течение 10 мин при 4°C.
 - 7) Удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в физиологическом растворе (9 г/л NaCl).
 - 8) Доведение каждой клеточной суспензии до плотности клеток 9 log КОЕ/мл, соответствующей оптической плотности 0,25, считывание на спектрофотометре при длине волны 620 нм в кювете, содержащей 100 мкл клеточной суспензии и 900 мкл воды.
 - 9) Добавление клеточных суспензий каждого штамма к пыльце (предварительно размороженной и доведенной до комнатной температуры) в соотношении 1:10 для получения конечного посевного материала, соответствующего 8 log КОЕ/г.
- *Полипептон можно заменить другими гидролизатами белка (например, пептоном, мясным экстрактом, триптоном).

Пример 5.

Протокол приготовления и инокуляции культуры *Wickerhamomyces anomalus* или *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B или других дрожжей, принадлежащих к родам *Wickerhamomyces* или *Hanseniaspora*.

- 1) Выращивание *Wickerhamomyces anomalus* или *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B или других дрожжей, принадлежащих к родам *Wickerhamomyces* или *Hanseniaspora*, в дрожжевом экстракте и пептонно-декстрозном бульоне (YPD, Oxoid) при 30°C в течение 48-72 ч.
- 2) Центрифугирование культурального бульона при 10000×g в течение 10 мин при 4°C.
- 3) Удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в физиологическом растворе (9 г/л NaCl).
- 4) Центрифугирование суспензии клеток при 10000×g в течение 10 мин при 4°C.
- 5) Удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в физиологическом растворе (9 г/л NaCl).
- 6) Центрифугирование суспензии клеток при 10000×g в течение 10 мин при 4°C.
- 7) Удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в физиологическом растворе (9 г/л NaCl).
- 8) Доведение суспензии клеток до плотности клеток 7 log КОЕ/мл, соответствующей оптической плотности 0,1, считывают на спектрофотометре при длине волны 600 нм в кювете, содержащей 100 мкл суспензии клеток и 900 мкл воды.
- 9) Центрифугирование суспензии клеток при 10000×g в течение 10 мин при 4°C, удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование клеток в объеме, в 100 раз меньшем, чем исходный объем.
- 10) Добавление клеточной суспензии штамма к пыльце (предварительно размороженной и доведенной до комнатной температуры) в соотношении 1:10 для получения конечного инокулята, соответствующего 8 log КОЕ/г.

Пример 6.

Протокол приготовления и инокуляции культур *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13.

- 1) Выращивание *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 в бульоне FYP (10 г D-фруктозы, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г полипептона*, 2 г ацетата натрия, 0,5 г Tween 80, 0,2 г MgSO₄·7H₂O, 0,01 г MnSO₄·4H₂O, 0,01 г FeSO₄·7H₂O, 0,01 г NaCl на 1 л дистиллированной воды [pH 6,8]) при 30°C в течение 24 ч для приготовления преинокулята.
- 2) Перенос культуры преинокулята каждого штамма на 10% в питательную среду, приготовленную из высушенной пыльцы в гранулах и хранящуюся при 4°C, предварительно обработанную мельницей или гранулятором, чтобы хотя бы частично разрушить внешний слой покрытия гранул, ресуспендированных в стерильной деминерализованной воде в концентрации от 10 до 20% (мас./мас.) и доведение pH до значения в диапазоне 5,25±0,25; инкубирование при 30°C в течение 24 ч.
- 3) Посев культур каждого штамма в биореактор в соответствии с соотношением 1:10, чтобы получить окончательный инокулят, соответствующий 7-8 log КОЕ/г. Среда для выращивания готовится из пыльцы, высушенной в гранулах и хранящейся при 4°C, предварительно обработанной для ослабления внешней стенки гранул, как описано в пункте 1, ресуспендированной в стерильной деминерализованной воде до концентрации от 10 до 20%.

*Полипептон можно заменить другими гидролизатами белка (например, бактериологическим пептоном, мясным экстрактом, триптоном).

Пример 7.

Ферментация свежей пыльцы с использованием комбинированной закваски, состоящей из отобранных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и дрожжей *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B.

1) Сырье: свежая пыльца без предварительной обработки и хранящаяся при -20°C .

2) Инокулят комбинированной закваски, состоящей из *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и *H. uvarum* AN8Y27B, инокулированный при плотности клеток 10^8 КОЕ/г. Протоколы приготовления и инокуляции культур *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и *H. uvarum* AN8Y27B описаны в примерах 4 и 5.

3) Добавление дистиллированной воды до достижения конечной влажности 40% (конечное значение влажности должно также включать начальное содержание воды в пыльце [около 21,56%] и воды, добавленной на стадии инокуляции).

4) Инкубирование при 30°C в течение 216 ч в стерильных пробирках на 50 мл.

Результаты.

Был определен протокол ферментации свежей пыльцы, который включает инокуляцию до плотности $8 \log$ КОЕ/г комбинированной закваски, состоящей из выбранных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B, и инкубацию при 30°C в течение 216 ч при конечной влажности пыльцы 40%. Рост лактобактерий и подкисление во время инкубации контролировали во время ферментации с помощью подсчета на чашках с агаром FYP и определения титруемой кислотности (ТТА) (фиг. 1). Плотность клеток лактобактерий ТТА контролировали во время спонтанной ферментации неинокулированной пыльцы (контроль), обработанной в тех же условиях, за исключением инокуляции комбинированной закваски (фиг. 1). При добавлении выбранной комбинированной закваски плотность клеток лактобактерий в пыльце достигла около $9 \log$ КОЕ/г через 96 ч и оставалась постоянной до 144 ч и снижалась до около $7 \log$ КОЕ/г в течение оставшегося времени инкубации. В противном случае во время спонтанной ферментации пыльцы лактобактерий достигли плотности примерно $9 \log$ КОЕ/г только через 120 ч и быстро упали до $4 \log$ КОЕ/г в течение оставшегося времени инкубации. Увеличение ТТА во время ферментации соответствовало росту лактобактерий. Во время спонтанной ферментации пыльцы подкисление было более медленным и менее интенсивным ($P < 0,05$) по сравнению с ферментацией, проводимой с выбранной комбинированной закваской.

Пример 8.

Протокол ферментации пыльцы.

1) Сырье: свежая пыльца, не прошедшая предварительную обработку и хранящаяся при -20°C , или высушенная или обезвоженная пыльца, хранящаяся при 4°C или при комнатной температуре, и предварительно обработанная путем измельчения и корректировки значения pH пыльцы до достижения значения в диапазоне $5,25 \pm 0,25$.

2) Инокуляция при плотности клеток 10^7 КОЕ/г комбинированной закваски, состоящей из выбранных лактобактерий *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и дрожжей *Wickerhamomyces anomalus*.

3) Добавление дистиллированной воды до конечной влажности 70%.

4) Инкубация при 30°C в течение 60 ч в стерильных пробирках или биореакторе. Ферментированная пыльца подвергается криосушке в лиостате.

Пример 9.

Протокол ферментации пыльцы в биореакторе с использованием выбранных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжей с предварительной механической обработкой.

1) Сырье: пыльца, высушенная в гранулах и хранящаяся при 4°C , предварительно механически обработанная в мельнице или грануляторе, чтобы разрушить внешнюю стенку гранул, ресуспендированных в биореакторе в стерильной деминерализованной воде до концентрации от 10 до 20% (мас./мас.), что дает конечный объем 5 л.

2) Корректировка значения pH до достижения значения в диапазоне $5,25 \pm 0,25$.

3) Инокуляция закваски, состоящей из *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13, при плотности клеток от 10^7 до 10^8 КОЕ/г. Протокол приготовления и инокуляции культур *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13 описан в примере 6.

4) Инкубация при 30°C в течение 2-4 дней при перемешивании со скоростью 70-100 об/мин для сохранения однородности ферментационной среды.

5) Ферментированная пыльца подвергается криосушке в лиостате (9A) или сушится распылением (9B).

Пример 10.

Протокол ферментации пыльцы в биореакторе с использованием выбранных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжей с предварительной термической обработкой.

1) Сырье: пыльца осушенная в гранулах, прошедшая предварительную термическую обработку (121°C в течение 15 мин) ресуспендировали в биореакторе в стерильной деминерализованной воде при концентрации от 10 до 20% (мас./мас.), что приводило к конечному объему 5 л.

2) Корректировка значения pH до достижения значения в диапазоне $5,25 \pm 0,25$.

3) Инокуляция закваски, состоящей из *L. kunkeei* PF12, PF15 и PL13, при плотности клеток от 10^7 до

10^8 КОЕ/г. Протокол приготовления и инокуляции культур *L. Kunkeei* PF12, PF15 и PL13 описан в примере 6.

4) Инкубирование при 30°C в течение 2-4 суток при перемешивании со скоростью 70-100 об/мин для сохранения однородности ферментационной среды.

5) Ферментированная пыльца подвергается криосушке в лиостате (10A) или сушке распылением (10B).

Пример 11.

Улучшение питания ферментированной пыльцы с использованием комбинированной закваски, состоящей из выбранных штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и дрожжей *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B.

Ферментированная пыльца, полученная в соответствии с протоколом, описанным в примере 7, была охарактеризована с химической и пищевой точки зрения. Содержание одиночных, общих и свободных аминокислот в пыльце определяли с помощью анализатора аминокислот Biochrom 30 (Biochrom Ltd., Cambridge Science Park, Англия), оборудованного катионообменной колонкой (фиг. 2). Для оценки усвояемости белков пыльцы был использован многофазный протокол, имитирующий пищеварение *in vitro* (фиг. 3). Кроме того, пептидный профиль пыльцы анализировали с помощью системы АКТА FPLC, оснащенной колонкой Superose 12 10/300 GL и УФ-детектором 214 нм (фиг. 3). Содержание свободных фенольных соединений, растворимых в воде и метаноле, определяли методом Фолина-Чокальтеу (фиг. 4).

Результаты.

Значительное увеличение ($P < 0,05$) общего количества свободных аминокислот наблюдалось в ферментированной пыльце с использованием комбинированной закваски, состоящей из *Lactobacillus kunkeei* PF12, PL13 и PF15 и *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B (фиг. 2) и пептидов (фиг. 3) около 14 и 12 г/кг (масса сухого вещества) соответственно по сравнению со свежей пыльцой. Кроме того, ферментированная пыльца показала большее ($P < 0,05$) содержание перевариваемых белков ($75,14 \pm 0,7\%$) по сравнению со свежей пыльцой ($62,11 \pm 0,8\%$) (фиг. 3). Кроме того, более высокие уровни ($P < 0,05$) водорастворимых ($15,98 \pm 0,64$ г галловой кислоты экв. кг^{-1} массы сухого вещества) и растворимых в метаноле ($69,53 \pm 4,52$ г галловой кислоты экв. кг^{-1} массы сухого вещества) свободных фенольных соединений были обнаружены в ферментированной пыльце по сравнению со свежей пыльцой ($8,43 \pm 0,85$ и $45,73 \pm 4,81$ г галловой кислоты экв. кг^{-1} массы сухого вещества).

Пример 12.

1. Экспериментальные тесты.

2. Цель экспериментальной работы.

Описанная ниже экспериментальная процедура направлена на изучение активности *in vitro* различных тестов ферментированной пыльцы (перги), чтобы охарактеризовать ее антиоксидантную активность и противовоспалительную активность (TNF- α) на линии кератиноцитов человека.

3. Материалы.

3.1. Протестированные образцы.

ВНУТРЕННЕЕ НАЗВАНИЕ	В	FER 867	FER 868	FER869	FER 870	FER871
УНИКАЛЬНОЕ ИДЕНТИФИЦИРУЮЩЕЕ НАЗВАНИЕ	КОНТРОЛЬ	ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ	ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ	ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ	ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ	ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ
ЛОТ	Лот 06/03/18B					
ОПИСАНИЕ	Пыльца, инкубированная при 30°C в течение 9 дней без инокуляции	Инокулированные штаммы <i>L. kunkeei</i> PF12, <i>L. kunkeei</i> PF15 <i>L. kunkeei</i> PL13. 121°C в течение 5'	Инокулированные штаммы <i>L. kunkeei</i> PF12, <i>L. kunkeei</i> PF15 <i>L. kunkeei</i> PL13 121°C в течение 5'	Инокулированные штаммы <i>L. kunkeei</i> PF12, <i>L. kunkeei</i> PF15 <i>L. kunkeei</i> PL13	Инокулированные штаммы <i>L. kunkeei</i> PF12, <i>L. kunkeei</i> PF15 <i>L. kunkeei</i> PL13 <i>H. uvarum</i> AN8Y27B	Инокулированные штаммы <i>L. kunkeei</i> PF12, <i>L. kunkeei</i> PF15 <i>L. kunkeei</i> PL13 121°C в течение 5'
ХРАНЕНИЕ	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
КОНЦЕНТРАЦИИ	100-250-500-мкг/мл	100-250-500-мкг/мл	100-250-500-мкг/мл	100-250-500-мкг/мл	100-250-500-мкг/мл	100-250-500-мкг/мл

* Выбранная закваска состоит из *L. kunkeei* PF12, PF15 и PF3 и *Wickerhamomyces anomalus* LCF1695.

Ферментированные продукты выдерживали при 30°C в течение 12 ч.

Все экстракты разбавляли до 50 мг/мл в культуральной среде (исходная растворимость в растворе 100%) и стерилизовали фильтрованием (5 мг/мл). Стоки хранили при -20°C.

3.2. Используемые реагенты и приборы.

Реагенты	Поставщик
30% пероксида водорода	SIGMA, 216763
Агароза (для рутинного применения)	SIGMA, A9539-100G
Среда RPMI-1640	SIGMA, R0883
Фетальная бычья сыворотка	SIGMA, F7524
Диметилсульфоксид	SIGMA, D2438-50ML
Раствор гентамицина	SIGMA, G1272
L-глутамин	SIGMA, G7513
Фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко	SIGMA, D8537
Раствор бромистого этидия (10 мг/мл, для молекулярной биологии, водный раствор)	SIGMA, E1510
Буфер для загрузки в гель Без РНКаз	SIGMA, G2526
МТТ	SIGMA- Aldrich, M2128
Пенициллин-стрептомицин	SIGMA, P0781
Набор реагентов PRIME SCRIPT RT (Perfect Real time)	Takara
PreMix Ex Taq	TAKARA, RR039A
Тесты TaqMan® для определения генной экспрессии GAPDH Hs99999905_m1	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
Тесты TaqMan® для определения генной экспрессии TNF- α Hs00174128_m1	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
Раствор Трипсин-EDTA	SIGMA, T3924
α -токоферол	SIGMA, T3251
Техническое оборудование	Поставщик
QiaExpert	Qiagen
Цифровая водяная баня 15 л от + 5°C до + 100°C (Mod: Swbd1, BS-SWB2D)	Stuart
Весы (Mod. XS204)	Mettler Toledo
Ламинарный шкаф (Mod: Gemini) + УФ-лампа с антибликовым покрытием	SterilManufacturingDivision
CO ₂ -инкубатор HeraCell (Mod: 150 ADV)	ThermoScientific
85°C горизонтальный холодильник ULT130, 120 л (Mod: Labfrost, MME-TE21140)	Elcold
Счетная камера с зажимами Bürker (DI-DA-443/3)	Carlo Erba
Микропланшетный считыватель (EL 808)	Biotek
Вортекс	Arhos160-PBI International
Прибор MX3000p RT	Stratagenc

3.3. Используемые биологические модели.

3.3.1. Культуры кератиноцитов человека.

Используется иммортализованная линия кератиноцитов человека NCTC2544 (Perry V.P. et al, 1957), культивированная в стерильных колбах (25 см³), инкубированная при 37°C во влажной атмосфере при 5% CO₂ в культуральной среде RPMI с добавлением бычьей эмбриональной сыворотки (FBS), глутамина 2 мМ в присутствии 1% пенициллина и стрептомицина и 0,1% гентамицина. Рассевание 1:3 выполняли каждые 2 дня при достижении монослоя путем промывки 1X PBS (фосфатный буфер без Ca₂₊ и Mg₂₊) и отслоения клеток раствором трипсин-EDTA при 37°C в течение 2 мин. Клетки культивировали в стерильных колбах объемом 25 см³ и инкубировали при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO₂.

ICLC код каталога	HL97002
Депозитор	Prof. M. Ferro, DIMES, General Pathology, University of Genoa, Italy
Библиографические ссылки	<ul style="list-style-type: none"> Arch Dermatol Res 1976; 256 (3): 255-260- PMID: 990102 Arch Dermatol Res 1976; 261 (1): 27-31

3.3.2. Контроли.

3.3.2.1. Индуцированный окислительный стресс - МТТ-ТЕСТ.

Отрицательный контроль: Клетки, не обработанные RPMI, с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ глутамина, в присутствии 1% пенициллина и стрептомицина и 0,1% гентамицина, и хранили в (96-луночных) культуральных планшетах при 37°C и 5% CO₂ (в темноте).

Положительный контроль: Клетки, обработанные в течение 2 ч 1 мМ пероксидом водорода в среде RPMI с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ глутамина, в присутствии 1% пени-

циллина и стрептомицина и 0,1% гентамицина и хранили в (96-луночных) планшетах для культивирования при 37°C и 5% CO₂ (в темноте).

3.3.2.2. Исследование противовоспалительной активности.

Отрицательный контроль: Клетки, не обработанные в RPMI, с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM глутамин, в присутствии 1% пенициллина и стрептомицина и 0,1% гентамицина, хранили в (12-луночных) 25 см² культуральных планшетах при 37°C и 5% CO₂.

Положительный контроль: Клетки, не обработанные в RPMI, с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM глутамин, в присутствии 1% пенициллина и стрептомицина и 0,1% гентамицина мкг/мл LPS, хранили в (12-луночных) планшетах для культивирования 25 см² при 37°C и 5% CO₂.

4. Способы.

4.1. Исследование защиты от окислительного стресса, индуцированного в кератиноцитах человека линии NCTC2544.

4.1.1. Принцип способа.

Исследования, проведенные в 2005 году Rajapakse и соавторами (2005), продемонстрировали возможность применения широко используемого и универсального способа, такого как метод МТТ-анализа, для изучения антиоксидантной активности активных соединений *in vitro*. В частности, с помощью этого способа можно изучить защитное действие таких соединений на клетки, которые впоследствии подвергнут окислительному стрессу. Индукция окислительного стресса осуществляется путем инкубации с пероксидом водорода, агентом, вызывающим окислительное повреждение в клетках за счет образования ROS. Любые защитные эффекты могут быть определены посредством оценки жизнеспособности клеток после окислительного стресса клеток, предварительно обработанных/подвергнутых действию тестируемых активных соединений, по сравнению с клетками, подвергнутыми такому же окислительному стрессу. Более высокая жизнеспособность клеток будет соответствовать защитному эффекту тестируемых соединений.

4.1.2. Порядок проведения эксперимента.

Анализ проводили в соответствии со способом, описанным Coda и соавторами (Coda et al., 2012), с некоторыми изменениями.

Кератиноциты человека NCTC2544 высевали в 96-луночный планшет при плотности 5×10^4 клеток/луноку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ до достижения примерно 80% конfluenceности.

Затем клетки инкубировали в течение 16 ч с исследуемыми активными соединениями и соответствующими контролями при следующих концентрациях: 100-250 и 500 мкг/мл соответственно для образцов B, FER867, FER868, FER869, FER870 и FER871. Разведения готовили, исходя из стока 50 мг/мл в DMSO, стерилизованного фильтрованием и с использованием среды RPMI с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM глутамин в присутствии 1% пенициллина и стрептомицина и 0,1% гентамицина. Клетки, обработанные 1 mM H₂O₂, использовали в качестве положительного контроля; клетки, содержащиеся только в культуральной среде (RPMI 2,5% FBS), использовали, наоборот, в качестве отрицательного контроля. Альфа-токоферол был протестирован как эталонный антиоксидант в концентрациях 100, 250 и 500 мкг/мл соответственно.

После 16 ч предварительной обработки клетки промывали PBS 1X и инкубировали в течение 90 мин с 1 mM раствором H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в бессывороточной среде, в темноте, при 37°C и 5% CO₂. После завершения стадии индукции окислительного стресса жизнеспособность клеток различных образцов оценивали в соответствии со способом, описанным в пункте 4.1.2 (анализ МТТ).

Данные были выражены в виде процента жизнеспособности клеток по сравнению с контрольными клетками (ctr), не подвергшимися стрессу, согласно следующей формуле:

$$\% \text{ жизнеспособности клеток/ctr} = (\text{Abs образца}/\text{Abs контроля}) * 100.$$

Все анализы проводили по меньшей мере два раза в повторях.

4.2. Исследование противовоспалительной активности (TNF- α).

4.2.1. Экспериментальная процедура.

Экспрессию гена маркера воспаления TNF- α в клетках NCTC2544 оценивали с помощью относительной количественной RT-PCR (количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией-qRT-PCR). Для этого анализа потребовалось три последовательные стадии:

- выделение общей РНК;
- ретротранскрипция в кДНК;
- qRT-PCR.

Кератиноциты человека NCTC2544 высевали в 12-луночные планшеты при плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/луноку и инкубировали до достижения примерно 80% конfluenceности. Затем клетки инкубировали в течение 16 и 24 ч соответственно с образцами B, FER867, FER868, FER869, FER870 и FER871 в следующих концентрациях: 100, 250 и 500 мкг/мл.

Разведения готовили, исходя из исходного раствора 50 мг/мл в культуральной среде (RPMI), с добавлением 2,5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM глутамин в присутствии 1% пенициллина и

стрептомицина и 0,1% гентамицина.

LPS (липополисахарид) использовали в количестве 10 мкг/мл в качестве индуктора воспаления и инкубировали совместно с растворами для обработки в течение 16 и 24 часов.

Клетки, содержащиеся только в культуральной среде (RPMI 2,5% FBS), использовали в качестве отрицательного контроля.

Альтернативно, в качестве отрицательного контроля использовали клетки, содержащиеся только в культуральной среде (RPMI 2,5% FBS) и 10 мкг/мл LPS.

После инкубации РНК экстрагировали.

Общую РНК экстрагировали из клеток NCTC2544 в соответствии с описанием Chomczynski and Mackey (1995).

После инкубации с интересующими активными соединениями клетки промывали PBS (1X) и, наконец, подвергали процедуре экстракции РНК. После экстракции экстрагированную РНК количественно определяли с помощью прибора QiaExpert (Qiagen) и рассчитывали концентрации в мкг/мл общей РНК, экстрагированной при длине волны 260 нм.

Наконец, целостность РНК (2 мкг/мл) оценивали с помощью электрофореза на 1% агарозном геле.

Общая РНК была преобразована в кДНК (комплементарную ДНК) с использованием фермента, способного синтезировать молекулу ДНК с использованием цепи РНК в качестве матрицы; этот ДНК-полимеразный РНК-зависимый фермент называется обратной транскриптазой. Он связывается с 3'-концом одиночной цепи РНК и с помощью случайных праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов (DNTP) синтезирует цепь к ДНК. Для этого использовался коммерческий набор "PrimeScript™ RT Reagent Kit (perfect Real Time)" (TakaraBioInc, Япония), содержащий 5X буфер PrimeScript (для реального времени); смесь ферментов PrimeScript RT Enzyme Mix1; праймер OligodTPrimer; Случайные олигонуклеотиды длиной 6 мономеров; не содержащую РНКаз 2 dH₂O.

Выделенную и количественно определенную РНК разводили до концентрации 2 мкг/мл и обратно транскрибировали в кДНК. Готовили мастер-микс из 10 мкл (содержащий 5X буфер PrimeScript (для реального времени); смесь ферментов PrimeScript RT Enzyme Mix1; 50 мкМ праймер OligodTPrimer; 100 мкМ случайные олигонуклеотиды длиной 6 мономеров), к которому добавляли 10 мкл РНК (2 мкг/мл).

Образцы помещали в термический амплификатор (Stratagene Mx3000P Real Time PCR System, Agilent Technologies Italy S.p.A., Милан, Италия) и подвергали ретротранскрипции при следующих условиях: 37°C в течение 15 мин; 85°C в течение 5 с; удержание при 4°C.

После ретротранскрипции к образцам добавляли 30 мкл воды DEPC для получения конечной концентрации кДНК 40 нг/мкл.

qRT-PCR - это способ амплификации и количественного определения продуктов амплификации в реальном времени путем мониторинга флуоресценции, испускаемой во время реакции. Для амплификации RT-PCR использовали систему зондов TaqMan® (AppliedBiosystems). Были использованы следующие зонды TaqMan: Hs00174128_m1 (TNF-α) и Hs99999905_m1 (GAPDH). GAPDH. Hs99999905_m1 использовали в качестве контрольного гена (гена домашнего хозяйства).

Зонд Taqman - это тип зонда, который позволяет развивать флуоресценцию по мере продвижения амплификации. Репортер (флуорофор FAM™) связан с его 5' концом, а гаситель связан с 3' концом. Близость репортера к гасителю нейтрализует испускание сигнала флуоресценции. Только при 5'-эзонуклеазной активности термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) выявляется флуоресценция, и накопление продуктов амплификации можно оценивать по увеличению флуоресценции репортера, которое увеличивается во время каждого цикла.

Мастер-микс был настроен для qRT-PCR следующим образом:

10 мкл "2X PremixExTaq";

1 мкл "20X TaqMan Gene Expression Assays" (содержащего 2 праймера и меченный флуорофором флуоресцентный зонд FAM™);

0,4 мкл пассивного эталона Rox II;

5 мкл воды DEPC.

4 мкл кДНК добавляли к основной смеси для гена-мишени и 1 мкл кДНК для гена домашнего хозяйства.

Амплификацию проводили в течение 40 прогонов при следующих условиях:

95°C, 30 с (активация амплификации);

95°C, 5 с (денатурация)

60°C, 20 с (отжиг - удлинение).

Каждый анализ проводился в двух повторах.

Полученные данные были проанализированы в соответствии с методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$, и поэтому было возможно вычислить относительные значения экспрессии интересующего гена, нормализованные по сравнению с геном домашнего хозяйства и калиброванные относительно контрольного образца (необработанные клетки):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{мишень-домашнего хозяйства (контроль)}} - \Delta Ct_{\text{мишень-домашнего хозяйства (обработанные клетки)}}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ были рассчитаны исходя из эффективности амплификации 100%.

5. Результаты.

5.1. Анализ защиты от индуцированного окислительного стресса.

На фиг. 5 показаны данные, относящиеся к активности защиты от индуцированного окислительного стресса исследуемых образцов в сравнении с антиоксидантом известного действия, α -токоферолом.

Результаты показывают значительную защитную активность против индуцированного окислительного стресса для всех соединений, проанализированных при концентрациях 250 и 500 мкг/мл, и эта активность сравнима с активностью α -токоферола.

5.2. Исследование противовоспалительной активности (TNF- α).

На прилагаемых фиг. 6A и 6B показаны данные экспрессии гена TNF- α соответственно после 16-часовой (фиг. 6A) и 24-часовой (фиг. 6B) обработки образцами: образец В (CONTROL), FER867, FER868, FER869, FER870 и FER871 соответственно при концентрациях 100-250 и 500 мкг/мл.

После 16 ч обработки образцы В и FER867, протестированные при концентрациях 100, 250 и 500 мкг/мл, показали наиболее значительную противовоспалительную активность (фиг. 6A).

Противовоспалительная активность более очевидна после 24 ч обработки (фиг. 6B), в частности, для образца FER867.

6. Выводы.

В заключение необходимо отметить, что проведенные тесты показали значительную защитную активность против индуцированного окислительного стресса для всех образцов, протестированных при концентрациях 250 и 500 мкг/мл (фиг. 5).

Кроме того, исследование противовоспалительной активности показало, что после 16 ч обработки образцы В, FER867, протестированные при концентрациях 100 и 250 мкг/мл, проявляют значительную противовоспалительную активность (фиг. 6A).

Для соединения FER869 концентрация 500 мкг/мл значительно снижала экспрессию TNF-альфа-ассоциированной мРНК. FER871 в концентрациях 100 и 500 мкг/мл показывает снижение продукции мРНК. Противовоспалительная активность тестируемых соединений более очевидна после 24 ч обработки (фиг. 6B), в частности, для соединения FER867.

Список используемой литературы

- Arch. Dermatol. Res. 1976; 256(3):255-260, PMID: 990102.
 Arch. Dermatol. Res. 1976; 261(1):27-31.
 Mosmann T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods, 65(1-2), 55-63.
 Rajapakse N., Mendis E., Byun H.G., Kim S.K., 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. J. NutrBiochem. 16(9), 562-569.
 Coda R., Rizzello C.G., Pinto D., Gobbetti M., 2012. Selected Lactic Acid Bacteria Synthesize Antioxidant Peptides during Sourdough Fermentation of Cereal Flours. Appl. Environ Microbiol. 78(4), 1087-1096.
 Chomczynski P., Mackey K. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. Biotechniques 1995; 19:942-5.

Пример 13.

Мягкая желатиновая капсула.

Каждая мягкая желатиновая капсула (жемчужина) содержит	кол-во. ед. измерения
Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i>	
PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжами, см. Пример 5	100 мг
Соевое масло	250 мг
Соевый лецитин	5 мг
Моно и диглицериды жирных кислот	30 мг
Составляющие оболочки:	
Желатин	145 мг
Глицерин	67 мг

Пример 14.

Таблетка.

Каждая доза содержит	кол-во. ед.измерения
Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжами, см. Пример 5	200 мг
Микрокристаллическая целлюлоза	100 мг
БиоГАВА [гамма-аминомасляная кислота из ферментации виноградного сула (Плоды <i>Vitis vinifera</i> L.), <i>Lactobacillus plantarum</i> C48]	100 мг
Поливинилпропироллидон	35 мг
Рис (сухой экстракт семян <i>Oryza sativa</i> L.)	50 мг
Люцерна (сухой экстракт цветов <i>Medicago sativa</i> L.)	40 мг
Сухой экстракт таллома хлореллы (<i>Chlorella pyrenoidosa</i> H. Chick)	30 мг
Фосфатидилсерин	40 мг
Сухой экстракт листьев и цветков мяты (<i>Melissa officinalis</i> L.)	100 мг
Сухой экстракт семян гриффонии [<i>Griffonia simplicifolia</i> (DC.) Bail]	51 мг
L-теанин	12,6 мг
Диоксид кремния	10 мг
Стеарат магния	10 мг

Пример 15.

Жевательные таблетки.

Каждая доза содержит	кол-во. ед.измерения
Мальтодекстрин	50-300 мг
Декстроза	50-300 мг
Фруктоза	50-300 мг
Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжами, см. Пример 5	100 мг
Ароматизатор	10-30 мг
Кукурузный крахмал	10-30 мг
Микрокристаллическая целлюлоза	10-30 мг
Диоксид кремния	5-15 мг
Лейцин	5-15 мг

Пример 16.

Таблетки.

Каждая доза содержит	кол-во ед.измерения
Фосфат кальция	150 мг
Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжами, см. Пример 5	50 мг
Сухой экстракт смолы Босвеллии (<i>Boswellia serrata</i> Roxb.)	150 мг
Пальмитолэтаноламид (PEA)	150 мг
БиоГАВА [гамма-аминомасляная кислота из ферментации виноградного сула (Плоды <i>Vitis vinifera</i> L.) <i>Lactobacillus plantarum</i> C48]	100 мг
Гамма-аминомасляная кислота	49 мг
Сухой экстракт корневища куркумы (<i>Curcuma longa</i> L.)	100 мг

Микрокристаллическая целлюлоза	50 мг
Витамин D (колекальциферол)	0,005 мг
Витамин B3 (никотинамид)	16 мг
Гидроксипропилцеллюлоза	30 мг
Диоксид кремния	6 мг
Моно и диглицериды жирных кислот	10 мг
Витамин B1 (мононитрат тиамина)	1,36 мг
Витамин B2 (рибофлавин)	1,4 мг
Витамин B5 (пантотенат кальция)	6.5 мг
Витамин B6 (гидрохлорид пиридоксина)	1,7 мг
Витамин K2 (менахинон-7)	0,075 мг
Вит. B12 (цианокобаламин)	0,026 мг

Пример 17.

Таблетки.

Каждая доза содержит	кол-во. ед. измерения
Сухой экстракт корня ашвагандхи (<i>Withania somnifera</i> L. Dunal)	150 мг
Пыльца ферментирована с использованием комбинированной закваски, состоящей из выбранных штаммов <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 и дрожжей.	
<i>Hanseniaspora uvarum</i> AN8Y27B, см. Пример 4	50 мг
Микрокристаллическая целлюлоза	100 мг
Окись магния	100 мг
Сухой экстракт верха Бакопы (<i>Bacopa monnieri</i> L. Pennel)	100 мг
БиоGABA [гамма-аминомасляная кислота из ферментации виноградного сусла (Плоды <i>Vitis vinifera</i> L.), <i>Lactobacillus plantarum</i> C48]	100 мг
Фосфат кальция	100 мг
Гамма-аминомасляная кислота	49 мг
Экстракт цветов шафрана (<i>Crocus sativus</i> L.)	30 мг
Гидроксипропилметилцеллюлоза	30 мг
Бисглицинат цинка	10 мг
Диоксид кремния	7 мг
(6S)-5-метилтетрагидрофолиевая кислота, соль глюкозамина	0,2 мг
Стеарат магния	11 мг

Пример 18.

Иммуностимулирующий батончик 30 г.

Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжами, см. Пример 5	2 г
Сироп глюкозы и фруктозы	10-14 г
Рисовые хлопья	10-12 г
Лецитин подсолнечника	0,5-3 г
Пальмовое масло (<i>Elaeis guinensis</i>)	0,5-3%
Кукурузный мальтодекстрин	1-2 г
Асаи (<i>Euterpe oleracea</i>) обезвоженные плоды	3-4 г
Изюм (<i>Vitis aryana</i> L.) обезвоженные плоды	1-2 г
Лимонная кислота	q.b
Аромат	q.b

Пример 19.

Твердые желатиновые капсулы.

Каждая твердая желатиновая капсула содержит	кол-во ед. измерения
Пыльца ферментирована с использованием комбинированной закваски, состоящей из выбранных штаммов <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 и дрожжей.	
<i>Hanseniaspora uvarum</i> AN8Y27B, см. Пример 4	200 мг
Мальтодекстрин	5-50 мг
Нерастворимая натуральная клетчатка	5-100 мг
Стеарат магния	1-10 мг
Диоксид кремния	3-6 мг
Внешняя оболочка из натуральной желатинообразной массы	

Пример 20.

Пероральный растворимый гранулят.

Каждое саше содержит	кол-во ед. измерения
Пыльца ферментирована с использованием комбинированной закваски, состоящей из выбранных штаммов <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 и дрожжей.	
<i>Hanseniaspora uvarum</i> AN8Y27B, см. Пример 4	1000 мг
Инулин	200-600 мг
Мальтодекстрин	0,5 - 3,0 г
Яблочная кислота	1-10 мг
Аромат	10,0-50,0 мг
Сукралоза	0,005 мг

Пример 21.

Гранулярная смесь в стик-пакете.

Каждое саше содержит	кол-во ед. измерения
Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжей см. Пример	5 500 мг
Сухой экстракт надземных частей эхинацеи (<i>Echinacea purpurea</i>)	300 мг
Медовый аромат	10 мг
Инулин	1-2 г
Гуммиарабик	0,5-2 г
Яблочная кислота	0-100 мг
Сукралоза	0,005 мг
Аромат	0,25 мг

Пример 22.
Таблетка.

Каждая таблетка содержит:	кол-во ед.измерения
Пыльца, ферментированная выбранными штаммами <i>Lactobacillus kunkeei</i> PF12, PF15 и PL13 без инокуляции дрожжами, см. Пример	550 мг
Микрокристаллическая целлюлоза	50 мг
Сухой экстракт соцветий брокколи (<i>Brassica oleracea italica</i> var.)	125 мг
БиоГАВА [гамма-аминомасляная кислота из ферментации виноградного сусла (Плоды <i>Vitis vinifera</i> L.)	100 мг
Ферментированная пыльца	100 мг
Сухой экстракт семян горчицы (<i>Brassica juncea</i> L. Czern.)	75 мг
Сухой экстракт листьев артишока (<i>Cynara scolymus</i> L.)	60 мг
Сухой экстракт плодов ацеролы (<i>Malpighia glabra</i> L.)	100 мг
Сухой экстракт плодов апельсина (<i>Citrus sinensis</i> L.)	50 мг
Фосфат кальция	50 мг
Сухой экстракт цельного растения свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.)	50 мг
Гидроксипропилцеллюлоза	20 мг
Сухой экстракт коры байберри (<i>Myrica cerifera</i> L.)	30 мг
Сухой экстракт корня астрагала (<i>Astragalus membranaceus</i>)	30 мг
Кверцетин	30 мг
Витамин Е (токотриенол, токоферол)	6 мг
Бета-ситостерин	20 мг
Ликопен	10 мг
Никотинамид	16 мг
Диоксид кремния	10 мг
Моно и диглицериды жирных кислот	10 мг
Галеопсис (<i>Galeopsis segetum</i> Necker) сухой экстракт надземных частей	5 мг
Спермидин трихлоргидрат	0,5 мг
Биотин	0,05 мг

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микробиологический способ получения ферментированной пыльцы, подобной перге, включающий стадию а) инокуляции пыльцы в зернах с помощью заквасочной лактобактерии и стадию б) ферментации пыльцы, при этом указанный способ характеризуется тем, что инокулированная заквасочная лактобактерия представляет собой лактобактерию вида *Lactobacillus kunkeei*, выбранную из штаммов *Lactobacillus kunkeei* PF12, PF15 и PL13 и их смесей.

2. Способ по п.1, включающий предварительную обработку пыльцевых зерен для разрушения внешнего слоя покрытия и обеспечения доступности зерна для ферментативной активности лактобацилл, инокулированных на стадии а).

3. Способ по любому из пп.1 или 2, включающий инокуляцию дрожжей, которые разрушают или метаболизируют пектиновый компонент оболочки пыльцевого зерна, на предварительной стадии или на стадии а).

4. Способ по п.3, в котором указанные дрожжи, которые разрушают или метаболизируют пектиновый компонент оболочки пыльцевого зерна, принадлежат к виду *Wickerhamomyces anomalus* или представляют собой штамм *Hanseniaspora uvarum* AN8Y27B.

5. Способ по любому из пп.1-4, включающий дополнительную стадию с) уменьшения микробной нагрузки после стадии ферментации.

6. Способ по любому из пп.1-5, включающий дополнительную стадию сушки, предпочтительно сублимационной сушки или сушки распылением.

7. Ферментированная пыльца, подобная перге, полученная способом по любому из пп.1-6.

8. Пищевая или диетическая композиция, отличающаяся тем, что содержит ферментированную пыльцу, подобную перге, по п.7 и съедобный носитель.

9. Применение ферментированной пыльцы, подобной перге, по п.7 или композиции по п.8 для лечения старения кожи.

10. Применение ферментированной пыльцы, подобной перге, по п.7 или композиции по п.8 для лечения кожных заболеваний, характеризующихся нефизиологическим образованием свободных радикалов.

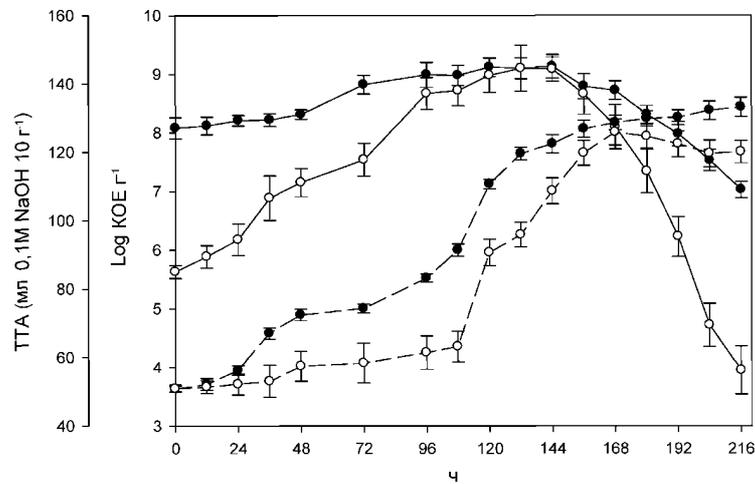
11. Применение ферментированной пыльцы, подобной перге, по п.7 или композиции по п.8 для лечения воспалительных заболеваний.

12. Штамм *Lactobacillus kunkeei* PF12, имеющий регистрационный номер DSM 32843 в Международном депозитарном центре Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), для получения ферментированной пыльцы, подобной перге.

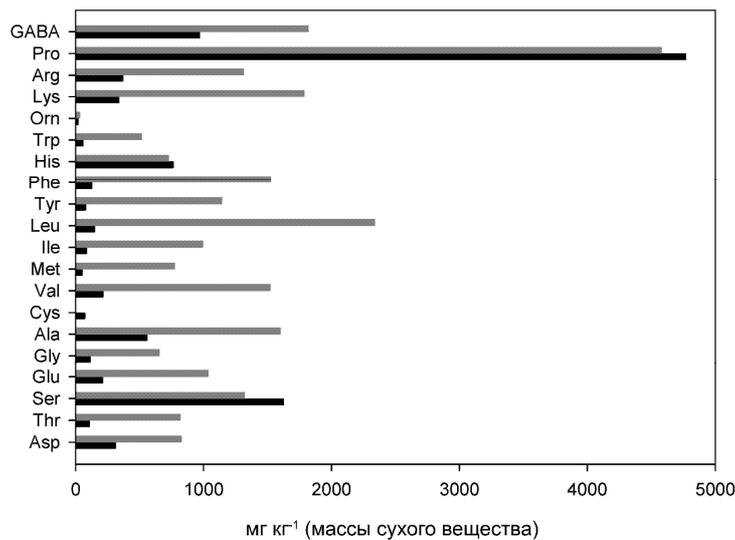
13. Штамм *Lactobacillus kunkeei* PF15, имеющий регистрационный номер DSM 32845 в Международном депозитарном центре Leibniz-Institut DSMZ, для получения ферментированной пыльцы, подобной перге.

14. Штамм *Lactobacillus kunkeei* PL13, имеющий регистрационный номер DSM32844 в Международном депозитарном центре Leibniz-Institut DSMZ, для получения ферментированной пыльцы, подобной перге.

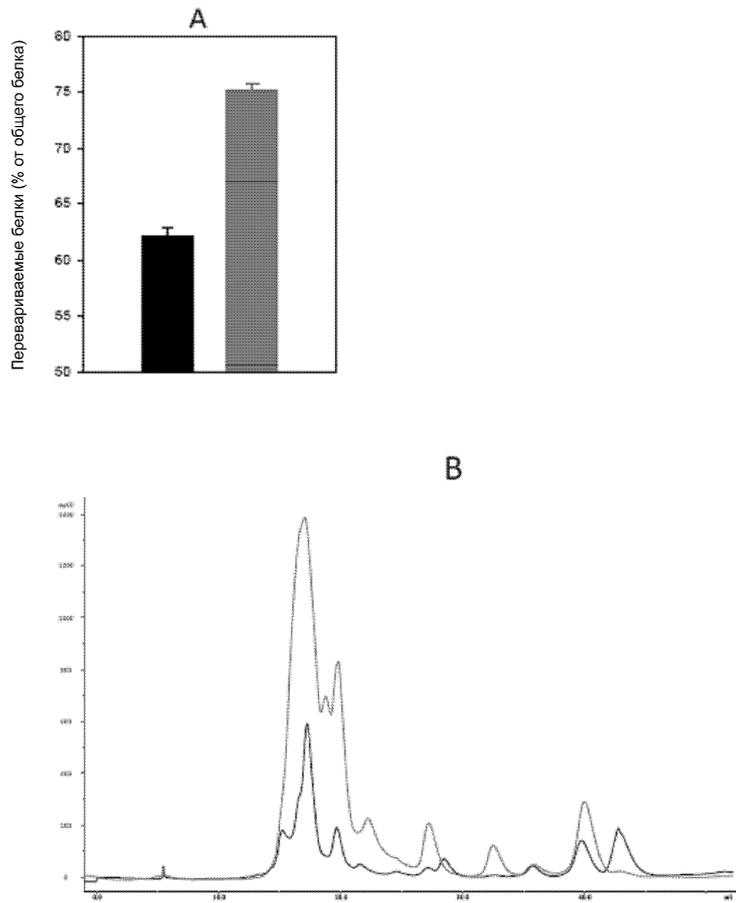
15. Штамм по любому из пп.12-14, в котором бактерии являются живыми и жизнеспособными или инактивированными.



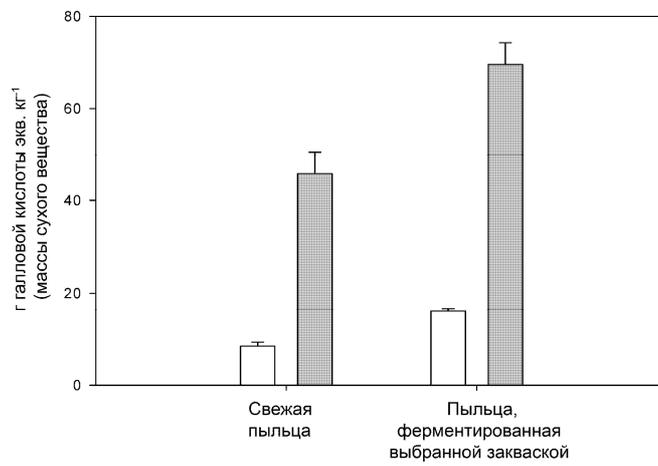
Фиг. 1



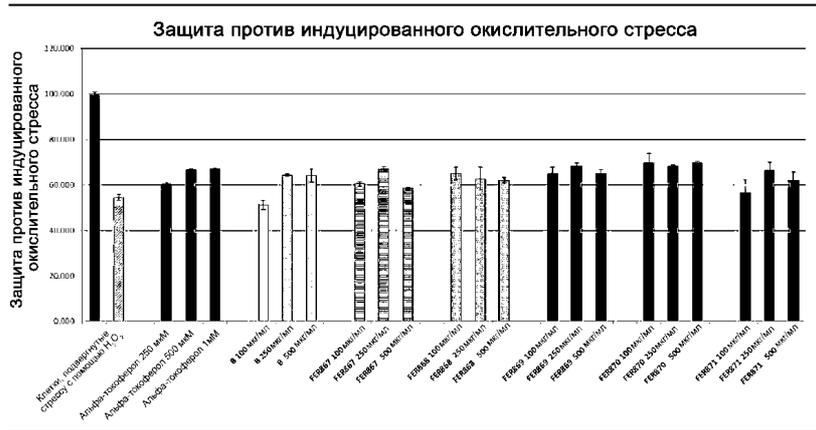
Фиг. 2



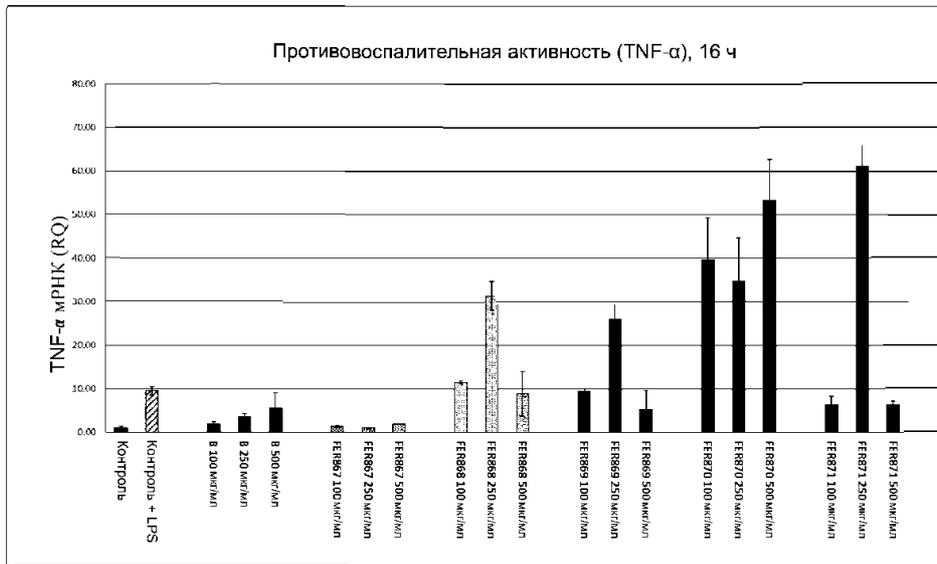
Фиг. 3



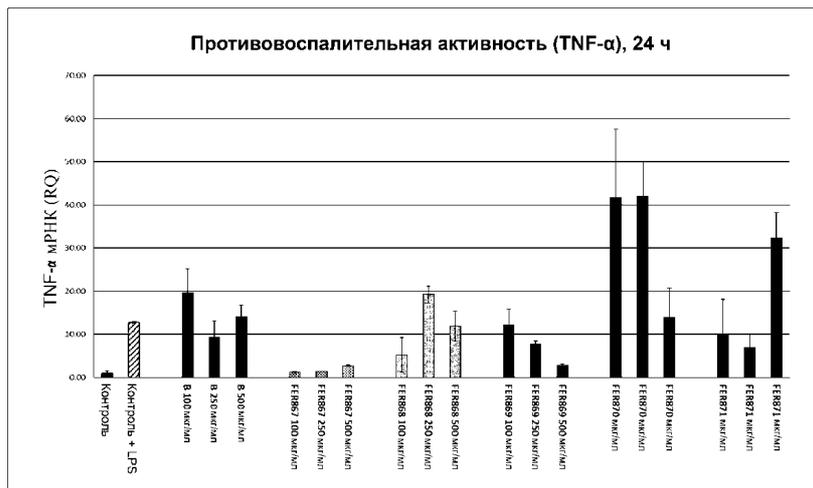
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В

