(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7645605号
(P7645605)

(45)発行日　令和7年3月14日(2025.3.14)

(24)登録日　令和7年3月6日(2025.3.6)

(51)国際特許分類		FI		
C07C 37/72 (2006.01)		C07C	37/72	
A01N 65/00 (2009.01)		A01N	65/00	A
A01N 65/34 (2009.01)		A01N	65/34	
A01P 3/00 (2006.01)		A01P	3/00	
A23L 33/105 (2016.01)		A23L	33/105	

請求項の数　8　（全16頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-531416(P2019-531416)
(86)(22)出願日　平成29年12月21日(2017.12.21)
(65)公表番号　特表2020-509993(P2020-509993A)
(43)公表日　令和2年4月2日(2020.4.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP2017/084116
(87)国際公開番号　WO2018/115296
(87)国際公開日　平成30年6月28日(2018.6.28)
審査請求日　令和2年12月4日(2020.12.4)
審判番号　不服2022-13418(P2022-13418/J1)
審判請求日　令和4年8月26日(2022.8.26)
(31)優先権主張番号　1663205
(32)優先日　平成28年12月22日(2016.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
最終頁に続く

(73)特許権者　519207103
アントフェノル
ＡＮＴＯＦＥＮＯＬ
フランス国 ３４０９５ モンペリエ セデックス ５、プラス ウジェーヌ バタィヨン、ユニヴェルシテ モンペリエ ２ベテ １５－３ エタージュ
(74)代理人　100094640
弁理士　紺野 昭男
(74)代理人　100103447
弁理士　井波 実
(74)代理人　100111730
弁理士　伊藤 武泰
(74)代理人　100180873
弁理士　田村 慶政
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ポリフェノールに富む乾燥バイオマス抽出物の調製

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ブドウの乾燥部分である木化した枝からポリフェノールに富む抽出物を調製する方法であって、

（ａ）前記ブドウの乾燥部分である木化した枝を水性溶媒と接触させることによって前記ブドウの乾燥部分である木化した枝からポリフェノールを含む成分を抽出する工程と、

（ｂ）ポリフェノールに富む水相を回収する工程と、

（ｃ）前記水性溶媒を部分的または全体的に蒸発させることによって前記ポリフェノールを濃縮する工程とを含み、

前記ブドウの乾燥部分である木化した枝の粉砕物が１ｍｍ～１ｃｍの範囲の粒径を有し、

前記抽出工程（ａ）において、前記ブドウの乾燥部分である木化した枝／水性溶媒混合物が、

（ｉ）９１５ＭＨｚ～２．４５ＧＨｚの範囲の周波数および抽出される材料１ｋｇに対して１～１０ｋＷの出力の電磁波と、

（ｉｉ）前記混合物の回転羽根を用いた３～２０ｒｐｍの範囲の回転速度での撹拌とによって同時に処理され、

前記水性溶媒が、１０～７０体積％のエタノールを含むエタノール／水混合物であり、前記ブドウの乾燥部分である木化した枝の前記水性媒体に対する質量比が１／５～１／３０であり、

前記工程（ａ）における抽出時間が２０分～１２５分であり、

前記ポリフェノールが、レスベラトロール、ビニフェリン、およびビチシンを含むことを特徴とする、方法。
【請求項２】
前記水性溶媒が、３０～５０％のエタノールを含むエタノール／水混合物である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ブドウの乾燥部分である木化した枝の水性溶媒に対する質量比が、１／１０～１／２０である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記ブドウの乾燥部分である木化した枝の粉砕物が１ｍｍ～５ｍｍの範囲の粒径を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記電磁波の出力が、３００Ｗ～１００ｋＷの範囲である、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記電磁波の出力が、１～７５ｋＷの範囲である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記抽出工程（ａ）において、前記ブドウの乾燥部分である木化した枝／水性溶媒混合物が、
（ｉ）９１５ＭＨｚ～２．４５ＧＨｚの範囲の周波数の電磁波と、
（ｉｉ）前記混合物の撹拌と、
（ｉｉｉ）５，０００～５０，０００Ｐａ（５０～５００ｍｂａｒ）の圧力と
によって同時に処理されることを特徴とする、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記濃縮（ｃ）が前記回収された水相を凍結乾燥することによって達成される、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、乾燥植物バイオマスの、特にブドウの一部のポリフェノールに富む抽出物の調製方法、得られる抽出物、ならびに抗真菌用途、特に収穫後の果物および野菜の真菌感染症の予防および治療、並びにその抗菌性および抗酸化性に関連した用途のための使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
植物バイオマスのポリフェノールに富む抽出物は当業者に公知である。多くの研究が、ポリフェノールに富む抽出物を得るためにバイオマスを抽出することに注目してきたが、それらはいずれも、低収率または非常に長い抽出時間等の方法の経済的な実行可能性、抽出後のそれらの使用の制限、特に、有毒性有機溶媒の使用に関していくつかの欠点を有する（Ｇｏｕｐｉｌら，２０１２、Ａｌｅｘａら，２０１２、Ｓａｎｃｈｅｚら，２００８、Ｐｅｚｅｔら，２００４）。
【０００３】
さまざまなポリフェノール抽出技術および使用は、特に、特許および特許出願としてＵＳ２０１２／００２１０８０、ＵＳ５，９８９，５５７、ＵＳ２０１２／０１４２１０５、ＪＰ２０１６／１０２１９２、ＣＮ２０５　７５９　８６１、ＣＮ１０３　８７５　８４２、またはＯｓｏｒｉｏら（２０１０）、Ｌｕｑｕｅ－Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚら（２００６）、またはＦａｖａｒｏｎおよびＬｕｃｃｈｅｔｔａ（２００９）による論文に記載されている。
【０００４】
研究によれば、例えばバイオディーゼルの製造のため（ＣＮ１９　３５　９４７）に、マ

イクロ波、超音波または高温処理によってバイオマス抽出方法を改善することが可能であることが示されている（Ｑｕａｎら，２００６、ＣＮ１０４　１７７　４６３、ＣＮ１０４　４３５　１３５、ＣＮ１０２　７５７　５１２、ＣＮ１０４　２５６　４３２、ＣＮ１０４　２５６　６４１、ＣＮ１０３　７８３　５０６、ＣＮ１０２　７５７　５０９、ＣＮ１０１　８１６　３４９）。高圧下での高温処理を推奨する者もいる（Ｃａｓａｚｚａら，２０１０）。

【０００５】

しかしながら、そのような高温処理は、得られる抽出物の特性を変える場合があり、大量の原材料および溶媒に対する工業方法の実施には適さない。

【０００６】

効率的でより経済的であり、かつそのポリフェノールに関するバイオマスの特性に影響を及ぼさない、ポリフェノールに富む抽出物を調製するためのバイオマス抽出のための効率的な方法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明は、乾燥植物バイオマスの抽出物、特にブドウ種のポリフェノールに富む抽出物の調製方法であって、（ａ）乾燥バイオマスを水性溶媒と接触させることによって乾燥バイオマスを抽出する工程と、（ｂ）ポリフェノールに富む水相を回収する工程とを含み、抽出工程（ａ）において、植物バイオマス／水性溶媒混合物が、

（ｉ）９１５ＭＨｚ～２８ＧＨｚの範囲の周波数の電磁波、

（ｉｉ）混合物の撹拌、および／または

（ｉｉｉ）５０～９５０ｍｂａｒ（５，０００～９５，０００Ｐａ）の圧力

の組み合わせによって同時にまたは連続的に処理されることを特徴とする方法に関する。

【０００８】

本発明はまた、この方法により得られる抽出物、ならびに抗真菌用途、特に収穫後の果物および植物の真菌感染症の予防および治療のためのその使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】本発明による方法によって得られる抽出物および従来の方法によって得られる抽出物中に含有されるｔｒａｎｓ－ピセアタンノール、ｔｒａｎｓ－レスベラトロール、ｔｒａｎｓ－ε－ビニフェリンおよびｔｒａｎｓ－ビチシンの相対量の比較を示す。表示された値は、ＨＰＬＣピークの曲線下面積から計算した、４つの分子それぞれの相対濃度（任意の単位）を表す。

【図２】本発明による方法によって得られる抽出物（○）および従来の方法によって得られる抽出物（□）の抗真菌活性の比較を示す。表示された値は、抽出物濃度の関数としての、接種後４日目における３つの同一条件での有効性（０％＝通常の真菌増殖；１００％＝真菌増殖なし）の平均である。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

本発明は、乾燥バイオマスを水性溶媒で抽出することによるポリフェノールに富む抽出物の調製に関する。

【００１１】

本発明によれば、用語「水性溶媒」は、水または脂肪族アルコール／水混合物、特にエタノール／水を意味する。この場合、アルコール／水混合物、特にエタノール／水は、１０～７０体積％のエタノールを含有する。本発明の好ましい実施形態によれば、水性溶媒は、１５～４０％のエタノールを含有するエタノール／水混合物である。

【００１２】

本発明による植物バイオマスは、それ自体がポリフェノール、特にｔｒａｎｓ－レスベラトロール、ｔｒａｎｓ－ε－ビニフェリン、ｔｒａｎｓ－ピセアタンノールおよびｔｒ

ａｎｓ－ビチシンを含有することが知られているバイオマスである。当業者は、単独でまたは混合して使用される、これらのポリフェノールを含有することが知られている植物、一般的にはブドウ、茶およびイタドリのような双子葉植物、特にブドウ由来のこのバイオマスに精通している。本発明によるバイオマスのためには、植物全体または植物の一部、より具体的には果実、花、葉、茎、枝または幹の断片（つる）等の植物の地上部、およびそれらの混合物が使用される。必要ならば、バイオマスは植物の根を含むかまたはこれからなってもよい。

【００１３】

バイオマスは乾燥している、すなわち上記の植物または植物の一部を乾燥することによって得られる。乾燥は、当業者に公知の任意の方法によって実施できる。有利には、乾燥は植物またはその一部を野外で乾燥させることによって達成される。本発明の好ましい実施形態によれば、植物またはそれらの個別の部分は、１ヶ月～４年間、好ましくは１～２年間、野外で乾燥させる。

【００１４】

優先的には、乾燥バイオマスは、ブドウ種、特にヨーロッパブドウ（Ｖｉｔｉｓ ｖｉｎｉｆｅｒａ）、アメリカブドウ（Ｖｉｔｉｓ ｌａｂｒｕｓｃａ）、リパリア種（Ｖｉｔｉｓ ｒｉｐａｒｉａ）、ルペストリス種（Ｖｉｔｉｓ ｒｕｐｅｓｔｒｉｓ）、ベルランディエリ種（Ｖｉｔｉｓ ｂｅｒｌａｎｄｉｅｒｉ）、マンシュウヤマブドウ（Ｖｉｔｉｓ ａｍｕｒｅｎｓｉｓ）、ヤマブドウ（Ｖｉｔｉｓ ｃｏｉｇｎｅｔｉａｅ）、ブルピナ種（Ｖｉｔｉｓ ｖｕｌｐｉｎａ）、アセリフォリア種（Ｖｉｔｉｓ ａｃｅｒｉｆｏｌｉａ）、エースティバリス種（Ｖｉｔｉｓ ａｅｓｔｉｖａｌｉｓ）およびマスカディンブドウ（Ｖｉｔｉｓ ｒｏｔｕｎｄｉｆｏｌｉａ）、特にヨーロッパブドウの植物の乾燥部分からなる。本発明の有利な実施形態によれば、乾燥バイオマスはブドウの苗条を含むかまたはこれからなる。

【００１５】

有利には、この乾燥バイオマスは、植物の断片、特に粉砕した植物または植物部分から構成される。優先的には、断片は、１ｃｍ未満、より優先的には５ｍｍ以下、さらに優先的には１～５ｍｍの範囲の粒径を有する。この乾燥物質の断片／粉砕された乾燥物質の粒径は、当業者に周知の一般的な方法に従って測定される。

【００１６】

乾燥植物の断片化は、当業者に公知の一般的な方法に従って行われる。本発明の特定の実施形態によれば、これらの断片はまず、乾燥物質を破砕して１～２０ｃｍの断片を得、次いでこれを粉砕して、抽出に好ましい粒径に対応する好ましくは１～５ｍｍの断片を得ることによって得られる。

【００１７】

当業者は、バイオマスの量に関して使用されるべき抽出溶媒の量を決定することができる。有利には、乾燥植物バイオマスの水性溶媒に対する質量比は、１／５～１／３０、優先的には１／１０～１／２０の範囲である。

【００１８】

本発明による方法は、抽出混合物（バイオマス／溶媒）に同時にまたは連続的に加えられる下記の少なくとも２種の応力の組み合わせを特徴とする：

（ｉ）９１５ＭＨｚ～２８ＧＨｚの範囲の周波数の電磁波、

（ｉｉ）撹拌、および／または

（ｉｉｉ）５０～９５０ｍｂａｒの圧力。

【００１９】

本発明によれば、表現「同時または連続的な撹拌」は、マイクロ波処理、少なくとも撹拌および／または９５０ｍｂａｒ以下の圧力が、同時に、または次々に、特に、任意の順序でシーケンス（ｉ）＋（ｉｉ）、または（ｉ）＋（ｉｉｉ）、または（ｉ）＋（ｉｉ）＋（ｉｉｉ）、または［（ｉ）、（ｉｉ）］＋（ｉｉｉ）、または［（ｉｉ）、（ｉｉｉ）］＋（ｉ）に従って行われることを意味する。連続的な処理の場合、当業者は、各シー

ケンスを数回繰り返すこと、または場合によっては１つまたは複数の同時処理シーケンスと組み合わせて、所定のプログラムに従って異なるシーケンスを組み合わせることを選択できる。

【００２０】

本発明の好ましい実施形態によれば、３つの処理は同時に行われる［（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）］。

【００２１】

工程ａ）はさらに超音波処理（ｉｖ）を含んでもよい。この処理は、上記で定義された処理（ｉ）、（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）と連続的に、または同時に適用されてもよい。

【００２２】

９１５ＭＨｚ～２８ＧＨｚの範囲の周波数の電磁波は、マイクロ波領域の波に対応する。当業者は、抽出方法を最適化するために、特にバイオマスに応じて、方法の実施に最も適した周波数を選択できる。電磁波の周波数は９１５ＭＨｚ～２．４５ＧＨｚである。有利には、電磁波の周波数は、工業規模で電磁波を発生させるための公知の産業用デバイス、特に１５００ＭＨｚ未満、より有利には約９１５ＭＨｚの周波数の発生器に従って選択される。

【００２３】

当業者はさらに、バイオマスおよび得られる抽出物に最も適した波出力を選択できる。電磁波の出力は、３００Ｗ～１００ｋＷ、より有利には１～７５ｋＷの範囲である。

【００２４】

この出力は、特に、処理する量および抽出に必要な時間に従って選択される。本発明の好ましい実施形態によれば、電磁波の出力は、抽出される材料１ｋｇに対して、電磁波の出力は１～１０ｋＷ、理想的には２～６ｋＷの比に従って選択される。

【００２５】

有利には、抽出時間は少なくとも２０分、またはさらに少なくとも３０分、好ましくは１２５分未満であり、あまりにも短い時間は、バイオマスを変化させる可能性がある出力過剰状態に関連し得、あまりにも長い時間は抽出生成物の劣化をもたらし得るため、いずれの場合もポリフェノール損失のリスクがあると理解されよう。

【００２６】

本発明による方法は、異なる量のバイオマス／溶媒混合物、特に少なくとも１Ｌ、優先的には少なくとも５Ｌでの使用に適している。本発明による方法は、乾燥バイオマスの工業的抽出に特に適している。有利には、本方法は少なくとも３０Ｌのバイオマス／溶媒混合物量で使用され、これは５０Ｌ超、またはさらには１００Ｌ超の範囲であり得る。当業者が利用可能な抽出反応器に応じて、本発明による方法は２００Ｌ以上の量で使用可能である。

【００２７】

バイオマス／溶媒混合物は、撹拌（ｉｉ）に供され、当該撹拌（ｉｉ）は優先的には、電磁波処理（ｉ）と同時に行われる。この撹拌は電磁波を混合物全体に到達させるのに重要であり、さもなければ混合物の表面のみがこれら電磁波の作用を受けることになる。

【００２８】

当業者は、処理される混合物の量に従って撹拌操作を行うための好適な手段を知っている。特に、一般に混合物内で回転羽根を用いて、または処理される混合物が入った反応器を回転させることによって、処理される混合物を回転させる手段が知られている。当業者は、空気または不活性ガスをバブリングすることによって混合物を動かすような他の撹拌手段を考慮してもよい。優先的には、撹拌は、３～２０ｒｐｍの範囲であり得る回転速度で、より優先的には混合物内の回転羽根によって、混合物を回転させることによって行われる。

【００２９】

当業者は、電気アークを発生させやすい、電磁波処理を受ける環境で実施するための最

も好適な回転手段を選択できる。

【００３０】

この方法はまた、好ましくは電磁波処理（ｉ）および撹拌（ｉｉ）の間に、混合物を真空に供すること（ｉｉｉ）を含む。

【００３１】

当業者は、処理される混合物が入った密閉容器内で真空（または不完全真空）を得るのに必要な手段に精通している。これらの工業的手段により、５０～９５０ｍｂａｒ（５，０００～９５，０００Ｐａ）の範囲の圧力を得ることが可能になる。当業者は処理される量に応じて適した圧力を選択できる。特に、上記の工業規模の量の場合、５０～９５０ｍｂａｒ（５，０００～９５，０００Ｐａ）、優先的には５０～５００ｍｂａｒ（５，０００～５０，０００Ｐａ）の圧力で混合物を処理することが有利である。

【００３２】

この方法は超音波処理も含むため、当業者は超音波の周波数および出力を選択できる。有利には、超音波周波数は２５ｋＨｚ～１ＭＨｚの範囲である。本発明の好ましい実施形態によれば、超音波出力は２００～４０００Ｗの範囲である。

【００３３】

本発明はさらに、水性溶媒を部分的または全体的に蒸発させることによってポリフェノールを濃縮する追加の工程（ｃ）を含む、上記および実施例に規定の方法に関する。

【００３４】

本発明の好ましい実施形態によれば、この濃縮（ｃ）は回収された水相を凍結乾燥することによって行われる。

【００３５】

本発明の特定の実施形態によれば、乾燥バイオマスは、抽出工程（ａ）の前に、好適な溶媒を用いた浸出に供され、糖を除去する。当業者は、乾燥バイオマスおよびその糖含有量に応じてこの浸出の条件を決定できる。

【００３６】

処理されるバイオマスに応じた糖の除去は、抗真菌性を持つポリフェノールに富む抽出物を得るために重要である。実際、糖の存在は、真菌の増殖を促進することによってポリフェノールの抗真菌活性に対して拮抗作用を有する可能性があることが示されている。

【００３７】

本発明はさらに、本発明による方法によって得られるポリフェノールに富むバイオマス抽出物に関する。これらの抽出物は、有利には、スチルベン系のポリフェノールである、目的の４分子を有する。これら４分子は、ｔｒａｎｓ－ピセアタンノール、ｔｒａｎｓ－レスベラトロール、ｔｒａｎｓ－ε－ビニフェリンおよびｔｒａｎｓ－ビチシンである。好ましくは、抽出物は、従来のエタノール抽出物よりも少なくとも２倍多い（または少なくとも２．５倍多い）ｔｒａｎｓ－ε－ビニフェリンと、少なくとも３倍多い（または少なくとも６倍多い）ｔｒａｎｓ－ビチシンとを含有する。

【００３８】

本発明はさらに、ブドウ種、特にヨーロッパブドウ、アメリカブドウ、リパリア種、ルペストリス種、ベルランディエリ種、マンシュウヤマブドウ、ヤマブドウ、ブルピナ種、アセリフォリア種、エースティバリス種、マスカディンブドウ、特にヨーロッパブドウの植物の乾燥部分からなるバイオマスのための、本発明による方法によって得られるポリフェノールに富むバイオマス抽出物に関する。本発明の好ましい実施形態によれば、ポリフェノールに富む抽出物は、ブドウの苗条、より具体的にはヨーロッパブドウの苗条の抽出物である。

【００３９】

本発明による抽出物は、ヨーロッパブドウの苗条の抽出物の実施例により示されるように、殺真菌性、殺菌性および抗酸化性を有する。

【００４０】

本発明による抽出物、特にブドウの苗条抽出物は、缶詰の果物中の汚染物質（Ｂｙｓｓ

ｏｃｈｌａｍｙｓ ｎｉｖｅａ）、または果樹、野菜および植物の病気、例えば、リンゴかいよう病（Ｎｅｃｔｒｉａ ｇａｌｌｉｇｅｎａ）、果樹の褐色腐敗病（Ｍｏｎｉｌｉｎｉａ ｆｒｕｃｔｉｃｏｌａ、Ｍｏｎｉｌｉｎｉａ ｆｒｕｃｔｉｇｅｎａおよびＭｏｎｉｌｌｉｎｉａ ｌａｘａ）、ニンジン胴枯病（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ｄａｕｃｉｌ）、ジャガイモ銀か病（Ｈｅｌｍｉｎｔｈｏｓｐｏｒｉｕｍ ｓｏｌａｎｉ）、赤かび病（Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ ｚｅａｅ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｃｕｌｍｏｒｕｍ）、コムギのセプトリア葉枯病（Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｇｒａｍｉｎｉｃｏｌａ）、またはさまざまな腐敗病（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｄｉｇｉｔａｔｕｍ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｉｔａｌｉｃｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ ｓｙｒｉｎｇａｅまたはＲｈｉｚｏｐｕｓ ｓｔｏｌｏｎｉｆｅｒを含む）等の食品および農業における有害な真菌の発生を抑制（防止）するための殺真菌剤として有効である。

【００４１】

本発明はさらに、当該植物における病原性真菌の発生を予防または抑制するための植物の殺菌処理方法に関し、当該方法は、当該植物に本発明による抽出物、特に上記および実施例に規定のブドウ苗条抽出物を有効量適用することを含む。

【００４２】

本発明による抽出物で処理可能な植物は、有利には、人間が消費するために栽培される植物、例えば、市場向け菜園、ジャガイモ作物、農作物、例えば、禾穀類、特にオオムギ、コムギおよびトウモロコシ、ダイズまたは脂肪種子作物、例えば、セイヨウアブラナ、ヒマワリ、アマ、タイマまたはワタである。処理は、果樹、特にリンゴ、セイヨウナシ、アプリコット、モモおよびブドウの木にも適用できる。

【００４３】

植物への適用は、気候条件が真菌の発生にとって好ましい場合には予防対策として、または病気の出現後の治療手段としてのいずれかで、必要に応じて行われる。適用は一般に、標準的な噴霧方法を用いて行われる。当業者は、単独で、または硫酸銅、ボルドー液、もしくは農薬産業による他の植物保護製品等、それらの殺菌性が公知の他の製品と混合して使用される、本発明による抽出物を用いて植物をいつ、どのように処理するかを決定できる。有利には、処理は、有機農業またはバイオダイナミック農業のために、農薬産業による植物保護製品を使用せずに行われる。

【００４４】

本発明はさらに、収穫後の果物および植物の劣化、特に真菌による腐敗の発生を予防および／または治療する方法に関し、当該方法は、当該果物および植物に、上記および実施例に規定の本発明による方法により得られる抽出物を適切な量適用することを含む。

【００４５】

これらの抗酸化性により、本発明による抽出物、特にブドウ苗条抽出物は、食品組成物または化粧用組成物を保存するためにも使用可能である。

【００４６】

収穫後に果物の酸化を遅らせるその能力により、本発明による抽出物、特にブドウ抽出物を使用して、これらの植物または植物の一部、特に、その自然な環境で見出されるよりも低い低温で保存された場合に酸化ストレスを受けやすいバナナ等の酸化に敏感な果物、またはマンゴー、パッションフルーツ等のエキゾチック果物もしくは熱帯果実への適用によって、植物における酸化ストレスを予防および／または治療できる。本発明はさらに、植物における酸化ストレスの予防および／または治療のための、本発明による抽出物、特にブドウ苗条抽出物、またはこれを含有する組成物の使用に関する。

【００４７】

本発明による抽出物、特にブドウ苗条抽出物は、ヒトおよび動物における酸化ストレスの予防および治療のために、その抗酸化性のため使用可能である。

【００４８】

それらはまた、ヒトにおける共生細菌を保ちながらも、特に病原性のグラム陽性細菌に対して抗菌活性も有する。それらは、ブドウ球菌属、リステリア属、連鎖球菌属およびプ

ロピオニバクテリウム属の細菌、特にざ瘡の原因となる病原体であるプロピオニバクテリウムアクネスに対して特に有効である。本発明による抽出物、特にブドウ苗条抽出物は、広スペクトルの抗菌活性を有し、皮膚病原体に対してより高い有効性を有する。

【００４９】

したがって、本発明は、治療における使用のため、特に細菌感染症の治療および予防のため、より詳細には細菌性皮膚感染症の治療および予防のため、さらにより詳細にはざ瘡の治療および予防のための本発明による抽出物、特にブドウ苗条抽出物に関する。

【００５０】

本発明はさらに、上記および実施例に規定の本発明による方法によって得られる抽出物と使用に適した担体とを含む組成物に関する。

【００５１】

これは、収穫前または収穫後に植物に適用するための抗真菌性組成物または医薬組成物であってよい。そのような組成物は公知であり、当業者はこの使用のために好適な担体を決定できる。

【００５２】

本発明は特に、少なくとも上記の抽出物と少なくとも１種の相溶性配合剤とを含む植物健康用組成物に関する。この植物健康用組成物は、乾燥形態、例えば粉末形態もしくは粒状形態、または液体形態、例えば懸濁液、濃縮分散液もしくは未濃縮分散液、ゲル、エマルジョン等の形態であってよい。

【００５３】

配合剤は、天然剤または合成化学から誘導され、植物健康用組成物において通常使用されているものである。

【００５４】

配合剤は、分散剤、安定剤、界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、接着剤、緩衝剤、ｐＨ調節剤、光保護剤等であってよい。これらは単独で、または混合して用いられてよい。

【００５５】

本発明による方法によって得られる抽出物ならびにそれを含有する組成物は、収穫後の果物および植物の真菌感染症の予防および治療における使用に特に適している。

【００５６】

本発明による方法は、同じ抽出媒体にていくつか組み合わせた技術の実施を含む。各技術（電磁波、超音波、真空）およびそれらを実施するための手段は周知である（国際公開第２０１２／０４５９２３号、欧州特許第２　５３０　０５９号、仏国特許第２　９７６　０６２号）。当業者は、これらの関連する処理を適用するために、乾燥バイオマスに既存のヒドロアルコール性抽出系を適合させることができる。

【実施例】

【００５７】

<u>実施例１　ヨーロッパブドウ苗条エコ抽出物（ｅｃｏ－ｅｘｔｒａｃｔ）の調製：</u>

出発植物材料はヨーロッパブドウ苗条（８月の苗条）である。苗条を（野外またはオーブン内で）乾燥させる。乾燥したら、苗条をまず２～１０ｃｍの断片に細断し、次に１～５ｍｍの範囲の粒径に細かく粉砕する。このようにして得られたヨーロッパブドウ苗条粉末を３０％水溶液またはエタノール溶液中で抽出する。抽出時間は３０分～１時間３０分、優先的には４５分～６０分の範囲である。抽出に用いられる技術は、マイクロ波、超音波、真空および同時撹拌である。このようにして得られた抽出物を、２０ミクロンフィルタを通して真空濾過する。次いで、抽出物を真空下で蒸発させ、噴霧乾燥または凍結乾燥する。その後、このようにして得られた乾燥抽出物を遮光して室温で貯蔵する。

【００５８】

<u>実施例２　実施例１に従って調製されたヨーロッパブドウ苗条抽出物の化学的特性評価</u>

実施例１に従って得られた、凍結乾燥された乾燥ヨーロッパブドウ苗条エコ抽出物５ｍｇを１ｍｌの５０％エタノールに溶解した。溶液を可溶化した後、１２０００ＲＣＦで１０分間遠心分離し、以下の条件下で高速液体クロマトグラフィー／質量分析（ＨＰＬＣ－

ＭＳ）システムに投入する。投入された抽出物の量は２５μｌである。移動溶媒は、超純水（０．１％ギ酸）およびアセトニトリル（０．１％ギ酸）である。以下の溶媒勾配に従って、１ｍｌ／分で５５分間分離を行う。

【００５９】

【表１】

時間（分）	アセトニトリル（%）	水（%）
0	5	95
0.1	5	95.00
45	50	50.00
46	100	0.00
51	100	0.00
52	5	95.00
55	5	95.00

【００６０】

使用されるカラムは、Ｃ１８官能基でグラフトされた固定相を含む。ＵＶ検出は２００～８００ｎｍの間で行う。質量検出はネガティブモードＥＳＩによって行う。４つの主な化合物が得られ、それらの保持時間、吸光度および分子量を下表に示す。

【００６１】

【表２】

化合物	保持時間（分）	最大吸光度（nm）	分子量（g/mol）
trans-ピセアタンノール	19	306 – **323**	244
trans-レスベラトロール	23	**306** – 323	228
trans-ε-ビニフェリン	30	306 – **323**	454
trans-ビチシン	36	306 – **327**	906

【００６２】

これら４つの化合物の含有量と従来のエタノール抽出物との比較を図１に示す。

【００６３】

実施例３ ボトリチスシネレア（Ｂｏｔｒｙｔｉｓ ｃｉｎｅｒｅａ）に対する抗真菌作用：

ボトリチスシネレア胞子を、寒天栄養培地があらかじめ注がれている透明な９６ウェルプレートのウェルの底に沈殿させる。

【００６４】

次いで、８％エタノール中に異なる濃度（０ｇ／ｌ、２．５ｇ／ｌ、５ｇ／ｌ、１０ｇ／ｌ、２０ｇ／ｌおよび３０ｇ／ｌ）で溶解した、実施例１に従って得られた、凍結乾燥された乾燥ヨーロッパブドウ苗条エコ抽出物をウェルに沈殿させる。

【００６５】

遮光し、２１℃における種々のインキュベーション時間の後、各ウェル中の菌糸体の相対密度を８００ｎｍの吸光度により測定する。次いで、抗真菌効果をこれらの吸光度値から計算する。

【００６６】

本発明による方法で得られた抽出物および従来の方法で得られた抽出物の４日間のインキュベーションで観察された抗真菌効果を図２に示す。結果は、少なくとも１５日間までのインキュベーションでは図２に示したものと少なくとも同様である。

【００６７】

実施例４　抗真菌作用

２４０時間までの１００％効率での最小阻害濃度（ＭＩＣ）を、異なる真菌株に対して実施例２による抽出物を用いて測定した。結果は下表に詳細に記載されている。

【００６８】

【表３】

真菌	MIC g/L
Byssochlamys nivea	28
Nectria galligena	13
Monillinia laxa	8
Alternaria daucil	7
Helminthosporium solani	2
Gibberella zeae	9
Fusarium culmorum	9
Mycosphaerella graminicola	1

【００６９】

実施例５　抗菌作用

実施例２の抽出物のＭＩＣを、異なる細菌種に対して決定した。試験は、下表に列挙されている２７の菌株に対して行う。試験は、試験コロニーの濃度が５・１０^{5}～１０^{6}ＣＦＵ／ｍＬに校正した高栄養培地中で行う。

【表４】

細菌	ＭＩＣ ｍｇ／ＭＬ
バシラス目	
セレウス菌（*Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ*）	０．２３４
枯草菌（*Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ*）	０．９３８
黄色ブドウ球菌（*Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ*）	０．４６９
黄色ブドウ球菌ＭＲ（*Ｓ．ａｕｒｅｕｓ ＭＲ*）（ＭＲＳＡ）	０．４６９
表皮ブドウ球菌（*Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ*）	０．２３４
リステリア菌（*Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ*）	０．４６９
乳酸桿菌	
エンテロコッカスヒラエ（*Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｈｉｒａｅ*）	０．４６９
アシドフィルス菌（*Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｓ*）	７．５
カセイ菌（*Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃａｓｅｉ*）	７．５
プランタラム菌（*Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｌａｎｔａｒｕｍ*）	＞７．５
ミュータンス連鎖球菌（*Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ*）	３．７５
化膿連鎖球菌（*Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ*）	０．２３４
ブタレンサ球菌（*Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ*）	０．４６９
セレノモナス目	
ベイヨネラディスパー（*Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ ｄｉｓｐａｒ*）	０．９３８

クロストリジア目
クロストリジウムデフィシレ（*Clostridium difficile*） ０．９３８
エンテロバクター目
サルモネラエンテリカチフィムリウム（*Salmonella enterica typhimurium*） １．８７５
大腸菌（*Escherichia coli*） ７．５
腸炎エルシニア（*Yersinia enterocolitica*） ３．７５
ビブリオ目
コレラ菌（*Vibrio cholerae*） ０．９３８
ビブリオアングイラルム（*Vibrio anguillarum*） ＞７．５
カンピロバクター目
カンピロバクタージェジュニ（*Campylobacter jejuni*） １．８７５
バクテロイデス目
バクテロイデスフラジリス（*Bacteroides fragilis*） ３．７５
ビフィドバクテリウム目
ビフィドバクテリウムブレーベ（*Bifidobacterium breve*） １．８７５
ビフィドバクテリウムラクティス（*Bifidobacterium lactis*） １．８７５
ビフィドバクテリウムロンガムロンガム（*Bifidobacterium longum longum*） ０．９３８
放線菌目
ネスルンド放線菌（*Actinomyces naeslundii*） ３．７５
プロピオニバクテリウムアクネス（*Propionibacterium acnes*） ０．１１７

【００７０】
実施例２の抽出物は、プランタラム菌およびビブリオアングイラルム以外のすべての試験株に対して阻害活性を示す。試験された最も感受性の高い菌株は、ざ瘡の原因となる病原体であるＰ．アクネスである。最後に、バシラス目、腸球菌種、特定の連鎖球菌種の順で真菌が実施例２による抽出物に対して感受性が高い。一方、試験した他の菌株、特に有益細菌であるビフィズス菌種および乳酸菌種はグラム陰性菌と同様に、感受性がそれほど高くない。
【００７１】
実施例２の抽出物は、広スペクトルの抗菌薬であり、皮膚病原体に対してより高い有効

性を有する。

【００７２】

実施例６　抗酸化活性

実施例２の抽出物の抗酸化活性は、適用後７日目および９日目に実施例２の抽出物を適用したまたは適用していない、野外に置いたバナナの皮の状態を比較することによって調べた。

【００７３】

実施例２の抽出物を適用されていない場合、それらの酸化に特徴的な褐色斑点で覆われたバナナの皮が７日目に観察され、一方、処理済みのバナナの皮はわずかにしか影響を受けていない（１つの特徴的な斑点）。

【００７４】

９日目には、未処理のバナナの皮の酸化は、７日目に観察された斑点で覆われた状態から全体が黒くなり続け、一方、処理済みのバナナの皮は７日目の観察からほとんど変化していない。

【００７５】

バナナで観察されたこの抗酸化活性は、植物、特にエキゾチック果物または熱帯果実の酸化ストレスを処理するための本発明による抽出物の利益を示している。

【００７６】

【表５】

REFERENCES

- Alexa, E., Poiana, M. A. & Sumalan, R. M. Mycoflora and ochratoxin a control in wheat grain using natural extracts obtained from wine industry by–products. *Int. J. Mol. Sci.* **13,** 4949–4967 (2012).
- Casazza, A. a., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. & Perego, P. Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non–conventional techniques. *J. Food Eng.* **100,** 50–55 (2010).
- Favaron & Lucchetta, Role of grape polyphenols on trans–resveratrol activity against Botrytis Cinerea and of fungal Lacasse on the solubility of putatibe grapepr proteins *J. of Plant Pathology* vol 91, n° 3, 579–588 (2009)
- Goupil, P. *et al.* Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* **21,** 1541–1549 (2012).
- Luque–Rodriguez & al. Extraction of polyphenols from Vine shoots of Vitis vinifera by Superheated Ethanol–Water Mixtures *J. of Agriculture and Food Chemistry* vol 54, n° 23, 8775–8781 (2006)
- Osorio & al Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (Carya Illinoensis), pomegranate husk (Punica granatum) and creosote bush leaves (Larrea tridentate Cov.) against plant pathogen fungi Industrial Crops and Products, col 31, n° 1, 153–157 (2010),
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Spring, J. L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65,** 297–303 (2004).
- Quan, P. T., Hang, T. Van, Ha, N. H., De, N. X. & Tuyen, T. N. Microwave–assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. *Sci. Technol. Dev.* **9,** 69–75 (2006).
- Sanchez, J. B. J., Orea, J. M., Gonzalvez, A. G. & Urena, A. G. On the Use of the Own Plant's Defence Compounds to Maintain the Post–Harvest Fruit Quality. *Open Agric. J.* 43–48 (2008).
- CN 104 177 463, CN 104 435 135, CN 102 757 512, CN 104 256 432, CN 104 256 641, CN 103 783 506, CN 102 757 509, CN 101 816 349, CN 19 35 947, CN 205 759 861, CN 103 875 842
- EP 2 530 059
- FR 2 976 062
- JP 2016 102192
- WO 2012/045923,
- US 5,989,557, US 2012/0142105

-

【図面】

【図１】

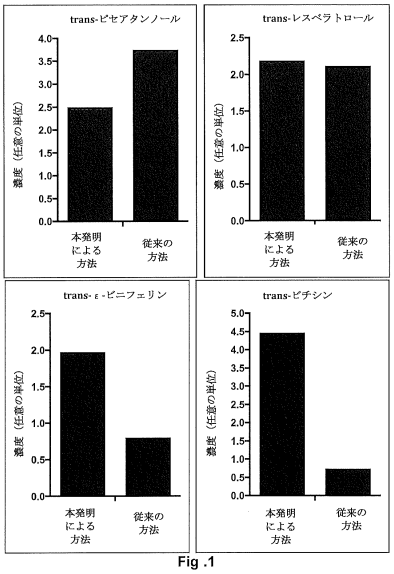

Fig .1

【図２】

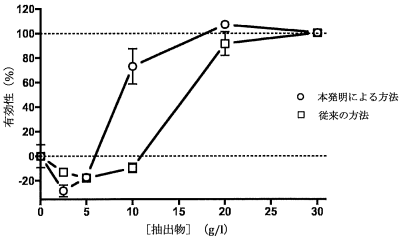

Fig. 2

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61K 8/00 (2006.01)		A61K	8/00	
A61K 8/9789(2017.01)		A61K	8/9789	
A61K 36/87 (2006.01)		A61K	36/87	
A61P 17/00 (2006.01)		A61P	17/00	101
A61P 17/10 (2006.01)		A61P	17/10	
A61P 31/00 (2006.01)		A61P	31/00	
A61P 31/10 (2006.01)		A61P	31/10	
A61P 39/06 (2006.01)		A61P	39/06	
B01D 11/02 (2006.01)		B01D	11/02	103
C07C 39/21 (2006.01)		C07C	39/21	
C07D 307/80 (2006.01)		C07D	307/80	
C07D 493/06 (2006.01)		C07D	493/06	

フランス(FR)
(72)発明者 ロレ、ファニー
フランス国 ０３４２３０ サン パルゴワール、リュ デ ゼコール １２ ビス
(72)発明者 ファーブル、リュドヴィク
フランス国 ３４０００ モンペリエ、レジダンス パルク ア バロン ３－アパルトマン １４８、リュ ドゥ ラ クロワ デュ スッド ９４

合議体
審判長 木村 敏康
審判官 松元 麻紀子
審判官 関 美祝

(56)参考文献
特開２０１４－０３３９９５（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－０６３５０７（ＪＰ，Ａ）
特開２００４－０８９７８６（ＪＰ，Ａ）
特開２００１－０６４１１２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５０５６８７号公報（ＪＰ，Ａ）
国際公開第１５／１３８１３５号（WO，Ａ１）
特開２００８－２０８０６４号公報（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
C07C