(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 6 月 19 日(19.06.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/091988 A1

(51) 国際特許分類:
A23L 1/20 (2006.01) *A61K 36/00* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 36/48* (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/082603

(22) 国際出願日: 2013 年 12 月 4 日(04.12.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-269928 2012 年 12 月 11 日(11.12.2012) JP
特願 2013-137901 2013 年 7 月 1 日(01.07.2013) JP
特願 2013-148391 2013 年 7 月 17 日(17.07.2013) JP

(71) 出願人: キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 山▲崎▼ 由貴 (YAMASAKI, Yuki); 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 場家 幹雄 (BAKKE, Mikio); 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木６－１０－１ 六本木ヒルズ森タワー２３階 ＴＭＩ総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2014/091988 A1

(54) **Title**: FERMENTED SOYMILK EXTRACT AND FERMENTED HYPOCOTYL EXTRACT

(54) 発明の名称 : 豆乳発酵エキスおよび胚軸発酵エキス

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to provide fermented extracts that are useful as a starting material for cosmetics, medicines, foods, drinks, etc. A fermented soymilk extract or a fermented hypocotyl extract which contains isoflavone aglycones and polyamines and has one or more anti-aging effects such as epidermal keratinocyte-activating effect, dermal fibroblast-activating effect, antioxidative effect and antidiastatic effect, said fermented extract being obtained by a method which comprises a step for fermenting soymilk or soybean hypocotyl using a lactic acid bacterium, a step for mixing the thus obtained fermentation product with an organic solvent, and a step for removing solid matters therefrom.

(57) 要約: 化粧品、医薬品、飲食品等の原料として有用な発酵エキスを提供することを目的とする。乳酸菌で豆乳または大豆胚軸を発酵する工程、発酵物を有機溶媒と混合する工程、および固形分を除去する工程を含む方法によって、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンを含有し、表皮角化細胞の賦活作用、皮膚線維芽細胞の賦活作用、抗酸化作用および抗糖化作用などの抗老化作用の１以上の作用を有する豆乳発酵エキスまたは胚軸発酵エキスを得る。

明　細　書

発明の名称 ： 豆乳発酵エキスおよび胚軸発酵エキス

技術分野

[0001] 本発明は、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンが高含有である豆乳発酵エキスに関し、特に、糖質含量が少なく、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用ならびに保湿作用などの抗老化作用を有する豆乳発酵エキスに関する。本発明はまた、大豆胚軸を乳酸菌で発酵することによって得られる胚軸発酵エキスに関し、特に、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンが高含有であり、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用ならびに抗糖化作用などの抗老化作用を有する胚軸発酵エキスに関する。

背景技術

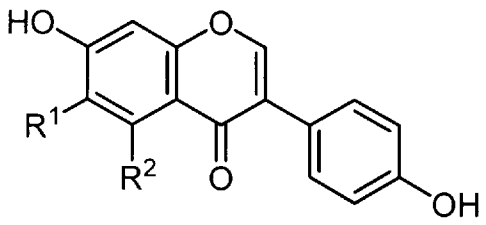
[0002] 近年、化粧品業界においては、顧客の自然派志向が高まる中、ナチュラル・オーガニック化粧品の需要が増えてきている。このような化粧品市場のニーズに応えるべく、様々な植物由来の機能性素材が開発されている。そして、これらの植物性天然素材にさらなる新たな付加価値を付与すべく、微生物発酵技術の活用が注目されている。例えば、豆乳は良質のタンパク質やイソフラボン化合物等を含んでいるが、さらに、発酵によって大豆ペプチドやイソフラボンアグリコン等を生成させることによって、種々の生理効果を示すことが期待されている。大豆や豆乳を微生物発酵させた素材、エキスの美容効果については、例えば、これまでにメラニン生成抑制による美白作用（例えば、特許文献１参照）、ヒアルロン酸産生能の向上による保湿作用（例えば、特許文献２、非特許文献１、２参照）、エストロゲン受容体αアゴニスト活性化による育毛作用（例えば、特許文献３参照）、抗酸化作用（例えば、特許文献４参照）等について報告されている。

[0003] 豆乳発酵エキスは、医薬部外品原料規格（以下、「外原規」という場合がある）２００６（平成１８年３月３１日薬食発第０３３１０３０号厚生労働

省医薬食品局長通知）に“豆乳発酵液”（成分コード５３２１０１）として収載されている。外原規では、豆乳発酵液を「大豆の種子から得た豆乳を乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ（Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ）で発酵して得た培養液にエタノールを加え、濾過して得られるエキスである。本品は、定量するとき、窒素０．０１～０．０４％を含む。」と規定しており、これを満たすものであれば使用実績の観点からも安全性が確認されていると言える。また、これに記載されているＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉは、ヨーグルトの製造に古くから用いられている乳酸菌であり、経験的にみて安全性が高いとみなされている。

[0004] 大豆に含まれるイソフラボン化合物は、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、酸化防止作用等の生理活性を有していることが知られており、その有用性が注目されている。大豆をそのまま粉末化してイソフラボン化合物を測定すると、１２種類のイソフラボン化合物の存在が確認される。これらは、３種類のダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン（これらはイソフラボンアグリコンと呼ばれる）を基本骨格としている（化１）。

[0005] [化1]

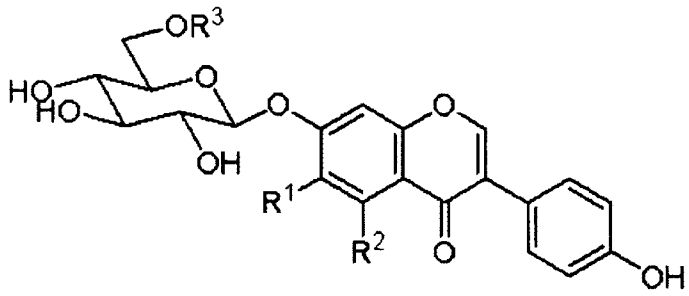


ダイゼイン　：　$R^1=H$,　　$R^2=H$
ゲニステイン：　$R^1=H$,　　$R^2=OH$
グリシテイン：　$R^1=OCH_3$,　$R^2=H$

[0006] 大豆中に含まれているイソフラボン化合物のほとんどは、これらを基本骨格とするイソフラボン配糖体（ダイジン、ゲニスチン、グリシチン）とこれらのイソフラボン配糖体がさらにアセチル化やマロニル化の修飾を受けた化合物として存在する（化２）。

[0007]

[化2]



ダイジン	: $R^1=H$,	$R^2=H$,	$R^3=H$
アセチルダイジン	: $R^1=H$,	$R^2=H$,	$R^3=COCH_3$
マロニルダイジン	: $R^1=H$,	$R^2=H$,	$R^3=COCH_2COOH$
ゲニスチン	: $R^1=H$,	$R^2=OH$,	$R^3=H$
アセチルゲニスチン	: $R^1=H$,	$R^2=OH$,	$R^3=COCH_3$
マロニルゲニスチン	: $R^1=H$,	$R^2=OH$,	$R^3=COCH_2COOH$
グリシチン	: $R^1=OCH_3$,	$R^2=H$,	$R^3=H$
アセチルグリシチン	: $R^1=OCH_3$,	$R^2=H$,	$R^3=COCH_3$
マロニルグリシチン	: $R^1=OCH_3$,	$R^2=H$,	$R^3=COCH_2COOH$

[0008] これらのイソフラボン化合物の中でも、特にイソフラボンアグリコンは、イソフラボン配糖体よりもエストロゲンの構造に近いことから、一般的に薬理作用が高いとされている。また、イソフラボン配糖体と比較して疎水性が高いため、皮膚への浸透性が高いことも期待できる。例えば、ゲニステインについては、塗布によって肌の老化防止に効果がある可能性が示されている（例えば、非特許文献３参照）。

[0009] しかし、イソフラボン化合物自体、天然に存在する量が少なく、とりわけイソフラボンアグリコンの量は極めて少ない。

[0010] また、大豆にはポリアミンも含まれることが知られる。ポリアミンとは、第１級アミノ基を２つ以上もつ脂肪族炭化水素の総称で生体内に普遍的に存在する天然物であり、２０種類以上のポリアミンが見いだされている。代表的なポリアミンとしては、プトレッシン、スペルミジン、スペルミン、カダベリンがある。

[0011] ポリアミンの主な生理作用としては、（１）核酸との相互作用による核酸の安定化と構造変化（２）種々の核酸合成系への促進作用（３）タンパク質合成系の活性化（４）細胞膜の安定化や物質の膜透過性の強化（５）活性酸

素の消去（６）細胞増殖の促進（７）抗アレルギー作用が知られている（例えば、特許文献５、非特許文献４、５参照）。

[0012] ここで、大豆原料を乳酸菌で発酵する従来技術について説明する。イソフラボン配糖体をイソフラボンアグリコンに分解する手法として、β－グルコシダーゼ活性を有する乳酸菌、ビフィドバクテリウム属細菌等を用いることで、イソフラボンアグリコンの豊富な発酵豆乳が得られることが報告されている（例えば、特許文献６、非特許文献６－１１参照）。しかし、これらの発酵後に得られるポリアミンは確認されていない。とりわけ、外原規で規定されている豆乳発酵菌の製造に用いられる乳酸菌Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉに関しては、豆乳中のイソフラボンアグリコンへの変換に関する報告例は特に少ない（例えば、非特許文献６－１１参照）。例えば、非特許文献６と７においては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉと他の乳酸菌との共培養であるため、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ単独での変換とは言い難い。非特許文献８においては、鳥の腸内細菌であるＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ類縁菌が、合成培地においてゲニスチンからゲニステインに変換することが報告されているが、菌株が完全に同定されていない。

[0013] 非特許文献９においては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ単独によるイソフラボンアグリコンへの変換が報告されているが、発酵に用いた豆乳（大豆分離タンパクによる再構成液）のイソフラボン含量が少なく（総量４２ｍｇ／Ｌ、１０３μＭ）、得られるイソフラボンアグリコンが約２４ｍｇ／Ｌ（約９０μＭ）と少ないものである。非特許文献１０および１１については、糖質を添加することなく、豆乳を発酵させることによって、高イソフラボンアグリコン含有量の発酵液を得ている。非特許文献１２は、豆乳にグルコースを添加し、乳酸菌で発酵させると、特定の菌株を用いた場合にイソフラボン配糖体がそのアグリコンに変換することを報告する。しかし、これらのいずれの発酵についても、ポリアミン量については確認されていない。

[0014] また、大豆原料を微生物で発酵する従来技術として、大豆に麹菌を接種す

ることで、麹菌の酵素活性によってイソフラボン配糖体がイソフラボンアグリコンに分解され、イソフラボンアグリコン高含有な食品が得られることも報告されている（例えば、特許文献７参照）。

[0015] また、大豆の発芽時に幼芽、幼根となる部分である大豆胚軸は、たん白質、オリゴ糖などの他、イソフラボンやサポニンなどの微量栄養成分が豊富に含まれ、これを、エクオール産生能を有する特定のラクトコッカス・ダルビエで発酵させてエクオール含有発酵物を得ることが報告されている（特許文献８）。

[0016] ポリアミンの製造法については、大豆種子、大豆胚芽、豆乳等を原料として、酸を添加することによって得られることが知られている（例えば、特許文献５、９、１０参照）。また、腸内細菌によるポリアミンの生成を促進する成分に関する報告がなされている（例えば、特許文献１１参照）。

さらに、豆乳とおからの混合物を乳酸菌で発酵させることにより、発酵前の混合物と比較してポリアミン量が増加することが報告されている（非特許文献１３）しかし、豆乳のみを乳酸菌発酵することによって、抽出されるポリアミン量が増加することついては報告されていない。また、大豆胚軸を乳酸菌発酵することによって、ポリアミン高含有な胚軸発酵エキスを作製することついても報告されていない。

[0017] 次いで、表皮角化細胞の細胞賦活作用について説明する。皮膚は、表皮と真皮からなる組織であり、外界からの物理的あるいは化学的ストレスから身体を守るバリア機能を果たしている。皮膚の外側に存在する表皮は、基底層、有棘層、顆粒層、角層からなり、主に角化細胞から構成されている。基底膜で分裂した角化細胞は、分化・成熟を経て上層に移行し、外表面の角層まで達した後、脱落し、ターンオーバー（新陳代謝）を繰り返し、表皮を形成している。

[0018] 表皮のターンオーバーは、皮膚バリア能や水分量の保持、メラニン色素の排出等に関与している。そのため、肌荒れ改善効果、保湿効果、肌のくすみ改善効果、美白効果、肌のキメ改善に、表皮角化細胞賦活剤が用いられてい

る。豆乳発酵エキスについては、エストロゲン受容体αアゴニスト活性化による育毛作用が報告されているが（例えば、特許文献３参照）、イソフラボンアグリコンおよびポリアミン高含有豆乳発酵エキスによる表皮角化細胞に対する顕著な細胞賦活作用については、これまでに報告されていない。

[0019] 次いで、皮膚線維芽細胞の細胞賦活作用について説明する。皮膚線維芽細胞は、真皮内に存在し、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸等を産生する細胞であり、コラーゲンを線維束にして、真皮構造を形成するのに寄与することが知られている。この線維芽細胞が、加齢や紫外線曝露によって損傷を受ける、減少する等すると、規則性をもった線維を生成できなくなり、しわおよびたるみといった肌老化が生じる。従って、皮膚線維芽細胞に対して賦活作用のある剤は、皮膚外用剤、特に老化防止用の皮膚外用剤の有効成分として有用である。しかし、イソフラボンアグリコンおよびポリアミン高含有豆乳発酵エキスによる皮膚線維芽細胞に対する顕著な細胞賦活作用については、これまでに報告されていない。

[0020] 次いで、抗酸化作用について説明する。皮膚は生体の最外層に位置する器官であり、外環境からの影響を大きく受ける器官である。この中で最も重要視されるのが紫外線の存在である。紫外線存在下においては活性酸素種が発生し生体内で種々のラジカル種に変換され、殺菌、体内への侵入物質の排除等を行う正の効果を持つ反面、その反応性の高さから、表皮細胞および組織の劣化や真皮の構成成分であるヒアルロン酸、コラーゲン、エラスチン、線維芽細胞を攻撃し、これらの劣化や減少あるいは変性により負の効果をももたらす。具体的には、保湿力低下による乾燥、弾力性や柔軟性低下によるしわ、たるみの形成、炎症反応による肌荒れ、凹凸や血流量低下等によるくすみ等が挙げられる。従って、活性酸素種を消去する作用のある剤は、皮膚外用剤、特に老化防止用の皮膚外用剤の有効成分として有用である。しかし、イソフラボンアグリコンおよびポリアミン高含有豆乳発酵エキスによる抗酸化作用については、これまでに報告されていない。

[0021] 次いで、抗糖化作用について説明する。糖質は、ヒトを初めとする生物に

おいてエネルギー源として非常に重要である。しかし一方で、糖質はタンパク質と糖化反応（グリケーション）を起こすことが知られている。糖化反応は、糖質のカルボニル基とタンパク質等のアミノ基との非酵素的な反応を第一段階とし、シッフ塩基からアマドリ化合物を経て最終的に最終糖化生成物（以下、「ＡＧＥｓ」ということがある。）を形成する一連の反応である。糖化反応により、タンパク質が非酵素的に糖により修飾されるため、これにより当該タンパク質の変性やタンパク質間の架橋等が起こり、その結果タンパク質の機能を低下させる。糖化反応は、コラーゲン等の細胞外マトリックス構成タンパク質を修飾・構造変化させることにより直接的な障害を引き起こすほか、糖化タンパク質をリガンドとする受容体により認識されることで細胞応答を引き起こす等の影響をもたらす。

[0022] コラーゲンを初めとする細胞外マトリックス成分は、骨や皮膚等の組織における乾燥重量の過半を占めている。そのため、例えば、コラーゲンが糖化され異常に架橋された状態となると、骨や軟骨組織においては骨粗鬆症や変形性関節症等を発症し、皮膚においては弾力性の低下、黄色化等によるくすみ等を生じる。さらに、異常に架橋したコラーゲン等はコラゲナーゼ等による分解を受けにくくなるため、コラゲナーゼ等の発現が誘導され、正常なコラーゲンまで分解されてしまう等の問題が生じてしまう。

[0023] このため、糖化反応を何らかの形で抑制する、すなわちＡＧＥｓの形成を抑制したり、またＡＧＥｓの分解を促進したりすることができれば、皮膚の弾力性低下やくすみ等の予防または改善にも効果があると期待される。

[0024] 従来、抗糖化作用を有する化合物として、Ｎ－フェナシルチアゾリウムブロミドが知られている（例えば、非特許文献１４参照）。しかし、この化合物は安全性に問題があり、医薬品や皮膚外用剤として適していない。また、抗糖化作用を有する天然物由来の成分として、例えば、オリーブからの抽出物が知られている（例えば、特許文献１２参照）。しかし、抗糖化作用を有する物質の提供は十分とは言い難く、さらなる新しい抗糖化作用物質の開発および提供が強く求められている。さらに、大豆熱水抽出物およびイソフラ

ボンも抗糖化作用を有すると報告されているが（例えば、特許文献１３参照）、これらを用いてもＡＧＥｓの生成を完全に抑制することはできず、その効果は十分ではない。一方で、イソフラボンアグリコンおよびポリアミン高含有豆乳発酵エキスによる抗糖化作用については、これまでに報告されていない。

[0025] 次いで、保湿作用について説明する。角層の水分量は肌の状態と密接に関連し、健康な素肌を保つためには、角層に適度な水分が保持されていることが必要である。また、皮膚角層には、皮膚への異物侵入と生体に必要な水分の蒸散を防止するバリア機能が存在する。角層バリア機能が低下すると、経皮水分蒸散量の増加に伴って角層水分量が低下し、荒れ肌や種々の老化症状が惹起される。従って、角層水分量増加作用のある剤、もしくは角層バリア機能増強作用のある剤は、皮膚外用剤、特に老化防止用の皮膚外用剤の有効成分として有用である。しかし、イソフラボンアグリコンおよびポリアミン高含有豆乳発酵エキスによる保湿作用については、これまでに報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0026] 特許文献1：特許２８０４３１２号公報

特許文献2：特許３１８４１１４号公報

特許文献3：特開２０１２－１７６９３１号公報

特許文献4：特開２００６－０７０１４６号公報

特許文献5：特開２００９－２３４９３９号公報

特許文献6：特開２００１－３４００５９号公報

特許文献7：特許３０１４１４５号公報

特許文献8：特許５０３０７９０号公報

特許文献9：特開２０１２－００６９５４号公報

特許文献10：特開２０１２－４６５４４号公報

特許文献11：特開２０１２－１０２０５４号公報

特許文献12：特開２００１－１２２７５８号公報

特許文献13：特開２０１２－２１９０１４号公報

非特許文献

[0027] 非特許文献1：「Ｓｋｉｎ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ ａｐｐｌｉｅｄ ｓｋｉｎ ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ」，（瑞国），２００３年，１６巻，ｐ．１０８－１１６

非特許文献2：「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｃｏｓｍｅｔｉｃ ｓｃｉｅｎｃｅ」，（米国），２００４年，５５巻，ｐ．４７３－４７９

非特許文献3：「Ｂｒｉｔｉｓｈ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ」，（英国），２０１２年，１６５巻，ｐ．９９４－１００５

非特許文献4：「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」，（米国），２００５年，１７５巻，ｐ．２３７－２４５

非特許文献5：「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐ． Ｍｅｄ．」，（米国），１９９７年，１８５巻，ｐ．１７５９－１７６８

非特許文献6：「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｆｏｏｄ ｓｃｉｅｎｃｅ」，（米国），２００９年，７４巻，ｐ．Ｍ１９０－１９５

非特許文献7：「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ ａｎｄ ｆｏｏｄ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」，（米国），２００９年，５７巻，ｐ．１７０－１７５

非特許文献8：「ＦＥＭＳ ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ｌｅｔｔｅｒｓ」，（英国），２００９年，２９１巻，ｐ．１８０－１８７

非特許文献9：「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｆｏｏｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ」，（米国），２０１０年，７５巻，ｐ．Ｍ１４０－１４９

非特許文献10：「Ｍａｌａｙｓｉａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ」，（馬国），２０１０年，６巻，ｐ．３０－４０

非特許文献11：「Ｆｏｏｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ」，（加国），２００５年，３８巻，ｐ．５５１－５５９

非特許文献12：「Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｌｅｔｔ」（蘭国）２００２，Ｖ

ｏｌ．２４，　Ｎｏ．２４，ｐ．２１１３－２１１６
非特許文献13：「Ｆｏｏｄ　Ｓｃｉ　Ｔｅｃｈｎｏｌ　Ｒｅｓ」（日本），２０１０，Ｖｏｌ．１６，Ｎｏ．５，ｐ．４１７－４２０
非特許文献14：「Ｎａｔｕｒｅ」，（英国），１９９６年，３８２巻，ｐ．２７５－２７８

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0028] 現在市販されている豆乳発酵エキスには、３つの課題がある。

第一の課題は、大豆に含まれる生理活性物質として特に期待される成分であるイソフラボン化合物の含量が極めて少ないことである。実際に市販されている豆乳発酵エキスのイソフラボン化合物含量は少なく（０～１２０μＭ）、イソフラボンアグリコンの含量はさらに少ない（０～６０μＭ、イソフラボンアグリコンへの変換率０～５０％）。このような背景から、イソフラボンアグリコン高含有である豆乳発酵エキスが強く求められている。

[0029] 第二の課題として、もうひとつの生理活性物質として期待される成分であるポリアミンの含有量が少ないことが挙げられる。実際に市販されている豆乳発酵エキス中のポリアミンの総量は１０～１５μＭであり、従って、ポリアミン高含有である豆乳発酵エキスが強く求められている。市販されている豆乳発酵エキスのポリアミン含量が極めて少ない理由として、製造で用いられるエタノールに対してポリアミンの溶解性が低いことが挙げられる。従って、ポリアミン含有量が高い豆乳発酵エキスを製造するためには、発酵液中のポリアミンの濃度を向上させるとともに、抽出に用いる有機溶媒の濃度を最適化させる必要がある。

[0030] 第三の課題として、グルコース等の糖質が残存していることが挙げられる。大豆に含まれるオリゴ糖はショ糖（スクロース、５％）、スタキオース（４％）、ラフィノース（１．１％）、ベルバスコース（ｔｒａｃｅ）であるという報告がなされており（例えば、山内文男ら編，「大豆の科学」，朝倉書店，１９９３年，ｐ．４９参照）、豆乳等の大豆原料を用いる乳酸菌発酵

において、乳酸菌の種類によっては糖質が不足する。これを補うためにグルコース等の糖質を添加すると、発酵液に未消化の糖質が残存すると考えられる。しかし、これらの糖質は、化粧品原料として配合したときに、べたつきの原因になるとともに、還元糖の場合はメイラード反応の原料となって皮膚の老化を促進する恐れがある（例えば、特開２０１１－１０２２７０号公報参照）。従って、グルコース無添加でも生育が良好な乳酸菌を利用する等の工夫によって、グルコース等の糖質が残存していない豆乳発酵エキスが求められている。

[0031] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、上記課題の１以上を解決する、化粧品、医薬品、飲食品等への利用に有用な発酵エキスを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0032] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、豆乳の乳酸菌発酵を、糖質を補うことなく行い、これを抽出することによって、イソフラボンアグリコンやポリアミンが高含有であり、グルコースの含有量が少ない豆乳発酵エキスを得て、さらにこれが顕著な表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用ならびに保湿作用などの抗老化作用を有することを見出した。また、大豆胚軸を乳酸菌によって発酵させ、これを抽出することによって、イソフラボンアグリコンやポリアミンが高含有の胚軸発酵エキスを得て、さらにこれが顕著な表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用ならびに抗糖化作用などの抗老化作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のものに関する。

[0033] ［１］

次の（Ａ）、（Ｂ）および（Ｃ）の工程：

（Ａ）豆乳を乳酸菌で発酵する工程；

（Ｂ）工程（Ａ）で得られた発酵物と有機溶媒を混合する工程；および

（Ｃ）工程（Ｂ）で生成する固形分を除去する工程；

を含む方法によって得られる豆乳発酵エキスであって、

次の（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）：

（ｉ）イソフラボン化合物の含有量が１５０μＭ以上；

（ｉｉ）工程（Ａ）におけるイソフラボン配糖体からイソフラボンアグリコンへの変換率が５０％以上；および

（ｉｉｉ）ポリアミンの含有量が２０μＭ以上；

を満たす、豆乳発酵エキス。

［２］

（ｉｖ）グルコースおよびスクロースの含有量の和が３．０ｍｇ／ｍＬ以下である、［１］に記載の豆乳発酵エキス。

［３］

次の（ｖ）および（ｖｉ）：

（ｖ）グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：イソフラボン化合物の含有量（μＭ）が０．１以下；および

（ｖｉ）グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：ポリアミンの含有量（μＭ）が０．３以下；

の１以上を満たす、［１］または［２］に記載の豆乳発酵エキス。

［４］

工程（Ａ）における乳酸菌がＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉである、［１］～［３］のいずれかに記載の豆乳発酵エキス。

［５］

工程（Ａ）に先立って、（Ｐ）前培養を豆乳で行う工程を含む方法によって得られる、［１］～［４］のいずれかに記載の豆乳発酵エキス。

［６］

次の（Ａ’）、（Ｂ’）および（Ｃ’）の工程：

（Ａ’）大豆胚軸を乳酸菌で発酵する工程；

（Ｂ’）工程（Ａ’）で得られた発酵物と有機溶媒を混合する工程；および

（Ｃ’）工程（Ｂ’）で生成する固形分を除去する工程；

を含む方法によって得られる胚軸発酵エキス。

［７］

グリシテインを１００μＭ以上含有する、［６］に記載の胚軸発酵エキス。

［８］

［１］～［７］のいずれかに記載の発酵エキスを含む、抗老化剤。

［９］

表皮角化細胞賦活作用、皮膚線維芽細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用および保湿作用のいずれか１以上の作用を有する、［８］に記載の抗老化剤。

［１０］

請求項［１］～［７］のいずれかに記載の発酵エキスを含む、化粧品、皮膚外用剤、医薬品または飲食品。

［１１］

豆乳を乳酸菌で発酵し、次いでポリアミンを抽出することを特徴とする、ポリアミンの製造方法。

［１２］

大豆胚軸を乳酸菌で発酵し、次いでポリアミンを抽出することを特徴とする、ポリアミンの製造方法。

［１３］

大豆胚軸を乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉで発酵する工程を含む、イソフラボンアグリコンまたはポリアミンの製造方法。

［１４］

豆乳を、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ ＪＣＭ １００１、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ

．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １０１０およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ＪＣＭ １０１２から選択される乳酸菌で発酵して得られる豆乳発酵物。

［１５］

大豆胚軸を乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉで発酵して得られる、胚軸発酵物。

発明の効果

[0034] 本発明によれば、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンが高含有である豆乳発酵エキスを提供することができ、特に、糖質含量が少なく、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用ならびに保湿作用などの抗老化作用を示す豆乳発酵エキスを提供することができる。また、本発明によれば、大豆胚軸を乳酸菌で発酵することによって得られる胚軸発酵エキスを提供することができ、特に、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンが高含有であり、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用ならびに抗糖化作用などの抗老化作用を有する胚軸発酵エキスを提供することができる。本発明の豆乳発酵エキスおよび胚軸発酵エキスは、化粧品、医薬品、飲食品への利用に有用であり、特に化粧品への利用に有用である。

図面の簡単な説明

[0035] [図1]発酵エキスの表皮角化細胞における細胞賦活作用を示す図である。

[図2]発酵エキスの皮膚線維芽細胞における細胞賦活作用を示す図である。

[図3]発酵エキスの抗酸化作用（ＤＰＰＨラジカル消去活性）を示す図である。

[図4]イソフラボン標品の抗酸化作用（ＤＰＰＨラジカル消去活性）を示す図である。

[図5]発酵エキスの抗糖化作用を示す図である。

[図6]イソフラボン標品の抗糖化作用を示す図である。

[図7]豆乳発酵エキスの抗酸化作用（細胞保護作用）を示す図である。

[図8]豆乳発酵エキスの保湿作用（角層水分量増加作用）を示す図である。

[図9]豆乳発酵エキスの保湿作用（角層バリア機能増強作用）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0036] 以下、本発明を詳細に説明する。以下の説明は、本発明の代表的な実施態様に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施態様に限定されるものではない。

[0037] 本明細書において「豆乳発酵エキス」は、次の（Ａ）、（Ｂ）および（Ｃ）の工程：

（Ａ）豆乳を乳酸菌で発酵する工程；

（Ｂ）工程（Ａ）で得られた発酵物と有機溶媒を混合する工程；および

（Ｃ）工程（Ｂ）で生成する固形分を除去する工程

を含む方法によって得られるエキスをさし、例えば、工程（Ｃ）で固形分を除去して得られる液、これを濃縮した濃縮液、またはこれを乾燥した固形物であってもよい。

[0038] 本明細書において「豆乳」とは、各種の公知の豆乳をさし、例えば、無調製豆乳、調製豆乳、豆乳飲料等を含む。大豆の種子の胚乳、胚軸（胚芽ともいう）および皮のいずれか１以上の部位（以下、大豆原料という）から調製することができるし、それぞれ１以上の部位から抽出して、適宜混合することもできる。大豆原料を適宜粉砕して浸漬した懸濁液や、大豆原料を浸漬した後、湿式粉砕して得られたスラリーも本発明の豆乳として、発酵原料とすることもできる。さらに、脱皮大豆や全粒大豆の粉末を水に溶解、懸濁、または均質化させて調製した、いわゆる大豆液や、それらを原料とする大豆飲料も本発明の豆乳に含む。また、大豆タンパク質を主成分とし、豆乳様の風味を呈する、いわゆるプロテイン飲料類も本発明の豆乳に含む。

[0039] 大豆の品種、ブランド、色は、特に限定されず、例えば、国産大豆、ＩＯＭ等の米国産大豆、遺伝子組換え大豆、または遺伝子非組換え大豆のいずれも用いることができる。大豆の未熟種子である枝豆を用いることもできる。

イソフラボンアグリコン高含有の豆乳発酵エキスを得る場合、イソフラボンアグリコン、イソフラボン配糖体（アセチル配糖体、マロニル配糖体を含む）のイソフラボン化合物の含有量が合計で１５０μM以上である豆乳が好ましく用いられる。

[0040] 本明細書において、乳酸菌は、発酵によって糖類から乳酸を産生する菌であれば特に限定されない。特にＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ属の菌が好ましく用いられ、豆乳発酵液の外原規に記載されているＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉが特に好ましく用いられる。Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉについては、亜種について特に制限はなく、例えば、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ等が挙げられる。

[0041] グルコースおよびスクロースの含有量が少ない豆乳発酵エキスやポリアミン含有量が多い豆乳発酵エキスを得るという観点からは、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ ＪＣＭ １００１、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １０１０およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ＪＣＭ １０１２から選択される菌が好ましく用いられる。イソフラボンアグリコン含有量が多い豆乳発酵エキスを得るという観点からは、後述のイソフラボン配糖体からイソフラボンアグリコンへの変換率の高い乳酸菌が好ましく用いられ、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５または１１４８株が特に好ましく用いられる。

[0042] 工程（Ａ）における乳酸菌の発酵条件については、乳酸菌が増殖し、豆乳が発酵する条件であれば特に限定されず、用いる乳酸菌の種類に応じて適宜選択することができる。豆乳の発酵は、発酵物中の乳酸量の増加により確認することができる。

[0043] イソフラボンアグリコン含有量の高い豆乳発酵エキスを得るという観点からは、豆乳中のイソフラボン配糖体のイソフラボンアグリコンへの変換率が５０％以上、特に５５％以上となる発酵条件が好ましい。ここで、イソフラボンアグリコンの変換率とは、発酵前後の各種イソフラボン化合物のモル濃度を算出し、［（発酵前のイソフラボン配糖体）－（発酵後のイソフラボン配糖体）］／（発酵前のイソフラボン配糖体）×１００（％）として算出することができる。

[0044] 発酵に用いる豆乳は、必要に応じて糖類や窒素源等を添加したり、ｐＨを調整することもでき、加熱等で殺菌処理することもできる。一態様において、糖質（特にメイラード反応の原料となる還元糖）の含有量が少ない豆乳発酵エキスを得るという観点から、糖類、特に還元糖を添加しない豆乳を発酵に用いることが好ましい。そのような、糖類としては：例えばグルコース、フルクトースおよびグリセルアルデヒドを含む全ての単糖、ラクトース、アラビノースおよびマルトースを含むマルトース型二糖またはオリゴ糖等の還元糖；および例えばスクロース等、加水分解により還元糖となる非還元糖が例示される。一態様において、特にグルコースを添加しない豆乳を発酵に用いることが好ましい。

[0045] 接種する乳酸菌は任意の培地で前培養してもよく、例えば、植物由来の原料の培地（豆乳、植物由来ペプトン等）、酵母エキス、各種合成培地（ＭＲＳ培地等）等で培養することができる。一態様において、製造工程の簡略化、動物由来原料を含む培地の使用を避ける、等の観点から、前培養を、豆乳を用いて行うこともできる。前培養の培養条件は、乳酸菌が増加する条件であれば特に限定されない。

[0046] 発酵温度は、乳酸菌の種類に応じて適宜選択することができ、特に限定されないが、１０～５０℃で行うことができ、好ましくは２０～４０℃で行うことができる。培養中のｐＨについては、そのまま放置しても、酸やアルカリで制御してもよい。各種炭素源や窒素源を流加することもできる。用いる乳酸菌の種類に応じて、好気的条件、嫌気的条件、撹拌培養、静置培養等の

いずれの条件を選択することもできる。乳酸菌としてＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉを用いる場合、嫌気的条件下で培養を行うことが好ましい。

[0047] 発酵時間は、乳酸菌の種類に応じて適宜選択することができ、特に限定されないが、６時間から７２時間、簡便には１２～６０時間、発酵を行うことができる。例えば、乳酸は、乳酸菌発酵の進行を示す指標となりうるため、乳酸の濃度に応じて培養を停止することができ、例えば、乳酸濃度が０．１～７ｍｇ／ｍＬとなった時点で培養を停止することができる。

[0048] また、糖質の含有量が少ない豆乳発酵エキスを得るという観点からは、発酵過程において、培養液の糖質を分析することにより糖質の減少を確認し、糖質が消費された状態で培養を停止すると、含有糖質が少ない豆乳発酵エキスが得られるため、特に好ましい。糖質としては、例えば、グルコース、フルクトース、スクロースおよびマルトースが挙げられる。これらの糖質の分析方法については、特に限定されないが、好ましくはリン酸-フェニルヒドラジン法（糖をカラムで分離した後、リン酸-フェニルヒドラジン試薬と反応させて、蛍光誘導体化後検出する方法）やバイオセンサーを用いる方法が用いられる。

[0049] 発酵終了後、必要に応じて発酵物のｐＨを調整してもよい。例えば、乳酸の生成により低下したｐＨを、適宜、アルカリで中性に調整してもよい。発酵終了後、形成したカードを撹拌で破壊してもよい。

[0050] 得られた発酵物は、そのまま工程（Ｂ）で有機溶媒と混合してもよいが、高分子タンパク質を工程（Ｂ）で効率良く除去するという観点からは、発酵終了後に加熱殺菌を行うことが望ましい。加熱条件については、十分に固形分が形成される条件であれば特に限定されず、例えば、６０～１２０℃で１～１２０分間、簡便には８０～１１０℃で２０～６０分間、処理することにより実施できる。

[0051] 次の工程（Ｂ）では、得られた発酵物を有機溶媒と混合する。これにより、得られた発酵物から有機溶媒中にイソフラボン化合物等、所望の成分を抽出することができる。有機溶媒は、水と混和する極性溶媒が好ましく用いら

れる。化粧品への応用を考慮すると安全性が高いものが好ましく、例えば、エタノールやブチレングリコール等が特に好ましく用いられる。なかでも、エタノールは、豆乳発酵液の外原規に記載されているため、特に好ましく用いられる。また、飲食品および経口医薬品に豆乳発酵エキスを配合する場合も、エタノールが好ましく用いられる。有機溶媒の添加量および濃度については、固形分が生成し、イソフラボン化合物等、所望の成分を抽出することができ、結果として所望の成分を含む豆乳発酵エキスが得られる量および濃度であれば特に限定されないが、固形分が生成し、清澄なエキス分と分離する量および濃度が好ましく、例えば、培養液に対して５～９０％（ｖ／ｖ）の量の有機溶媒を添加することができる。例えばエタノールの場合、培養液に対して１５％（ｖ／ｖ）以上、好ましくは５０％（ｖ／ｖ）以上のエタノールを添加することができる。添加した後に、加熱、冷却、静置等の操作を行うこともできる。

[0052] 次いで、工程（Ｂ）で生成する固形分を除去する工程（Ｃ）を行う。工程（Ｃ）は、固形分を除去することができる任意の方法を用いて行うことができ、例えば、静置や遠心で上清を分離する方法や濾過する方法等を用いることができる。

[0053] なお、上記の工程に加えて、目的に応じてさらに追加の工程を行ってもよい。例えば、イソフラボン化合物（特に、イソフラボンアグリコン）の含有量の多い発酵エキスを得るという観点から、サイクロデキストリンなどの添加によってイソフラボン化合物等、所望の成分の包接を行うこともできる。サイクロデキストリンの添加は、工程（Ｃ）の固形分の除去に先立って行われる限り、任意の段階で行うことができ、例えば、工程（Ａ）の前、工程（Ａ）の発酵の最中、工程（Ａ）後であって工程（Ｂ）の前、工程（Ｂ）の有機溶媒との混合の最中、および工程（Ｂ）後であって工程（Ｃ）の前、のいずれか一以上の段階で行うことができる。サイクロデキストリンとしては、β-サイクロデキストリンまたはγ-サイクロデキストリンが使用でき、イソフラボン化合物の包接を目的とする場合、好ましくはβ-サイクロデキストリ

ンを使用することができる。

[0054] 本明細書において「胚軸発酵エキス」は、次の（A’）、（B’）および（C’）の工程：

（A’）大豆胚軸を乳酸菌で発酵する工程；

（B’）工程（A’）で得られた発酵物と有機溶媒を混合する工程；および

（C’）工程（B’）で生成する固形分を除去する工程；

を含む方法によって得られるエキスをさし、例えば、工程（C’）で固形分を除去して得られる液、これを濃縮した濃縮液、またはこれを乾燥した固形物であってもよい。

[0055] 本明細書において、大豆胚軸は、大豆の胚軸（胚芽ともいう）をさし、生の大豆胚軸のみならず、脱脂、焙煎、浸漬、熱処理等の任意の前処理を行ったものも含む。

[0056] 工程（A’）の発酵には、大豆胚軸そのものを用いることもできるし、粉砕して用いてもよい。より抽出効率を高める観点から、大豆胚軸またはその粉砕物を水に懸濁させた懸濁液や、大豆胚軸またはその粉砕物を水で抽出し、固形分を除去した胚軸抽出液を用いることもできる。

所望の成分（特に、イソフラボンアグリコン）の含有量の高い胚軸発酵エキスを簡便に得るという観点から、大豆胚軸またはその粉砕物を水に浸漬させた浸漬物、この浸漬物をさらに加熱処理した処理物等を、工程（A’）の発酵に用いてもよい。理論に束縛されるものではないが、これらの処理により、大豆胚軸中のイソフラボン配糖体からイソフラボンアグリコンへの変換およびイソフラボンマロニル配糖体からイソフラボン配糖体への変換が促進されると考えられる。

[0057] 大豆胚軸が由来する大豆の品種、ブランド、色は、特に限定されず、上記豆乳について言及したのと同様任意の大豆を用いることができる。

[0058] 工程（A’）、（B’）および（C’）は、大豆胚軸を豆乳の代わりに使用するほかは、それぞれ、上記工程（A）、（B）および（C）と同様に行うことができる。

[0059] このようにして得られた豆乳発酵エキスまたは胚軸発酵エキス（以下、単に「発酵エキス」ともいう。）は、そのまま、化粧品、皮膚外用剤、医薬品および飲食品の原料として利用することができる。また、水や有機溶媒等で適宜希釈したり、パラベンやフェノキシエタノール等の防腐剤を添加することもできる。また、例えば、加熱や減圧による有機溶媒の留去や成分の濃縮、凍結乾燥やスプレードライによる粉末化の処理を行うことができる。粉末化したものを水や有機溶媒等で溶解、分散、懸濁させることができる。

[0060] 本発明の発酵エキスは、各種作用を発揮する観点から、イソフラボン化合物の含有量が多いことが好ましい。イソフラボン分析は、各種イソフラボン化合物を分析できる公知の手法を用いて行うことができ、好ましくはＨＰＬＣ法が用いられる。

[0061] 本明細書において、イソフラボン化合物とは、ダイゼイン、ダイジン、アセチルダイジン、マロニルダイジン、ゲニステイン、ゲニスチン、アセチルゲニスチン、マロニルゲニスチン、グリシテイン、グリシチン、アセチルグリシチンおよびマロニルグリシチンをさす。このうち、特に、イソフラボンアグリコンであるダイゼイン、ゲニステインおよびグリシテインの含有量が多いことが、各種作用を発揮する観点から、より好ましい。本発明の発酵エキスが含有するイソフラボン化合物の濃度は、各種作用を発揮する観点から高いほど好ましく、イソフラボン化合物を１５０μＭ以上含有することが好ましい。例えば、豆乳発酵エキスの場合、イソフラボンアグリコンを７５μＭ以上することが好ましく、１５０μＭ以上含有することがさらに好ましい。

[0062] また、胚軸発酵エキスの場合、イソフラボンアグリコン含有量は、５５０μＭ以上であることが好ましく、７００μＭ以上であることがより好ましく、１０００μＭ以上であることがさらに好ましい。高い抗糖化作用を発揮するという観点から、特に、グリシテイン含有量が１００μＭ以上であることが好ましく、２００μＭ以上であることがより好ましい。

[0063] 本発明の発酵エキスは、各種作用を発揮する観点から、ポリアミンの含有

量が多いことが好ましい。ポリアミン分析は、ＨＰＬＣ法や酵素法等、各種ポリアミンを分析できる公知の手法を用いて行うことができ、好ましくはＨＰＬＣ法が用いられる。具体的には、Ｎｏｖｅｌｌａ－Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ Ｓ．らの方法（Ｊ．Ａｇｒｉｃ．Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍ．，４８，５１１７－５１２３（２０００））に基づいて、ＨＰＬＣを用いてポリアミンを分析することができる。

[0064] 本明細書において、ポリアミンとは、第１級アミノ基を２つ以上もつ脂肪族炭化水素であれば特に限定されないが、例えば、プトレッシン、スペルミジン、スペルミン、カダベリン等が挙げられる。本発明の発酵エキスが含有するポリアミンの濃度は、各種作用を発揮する観点から高いほど好ましく、発酵エキス中の主要なポリアミンであるプトレッシン、スペルミジンおよびカダベリンの合計が２０μＭ以上であることが好ましく、３０μＭ以上であることがより好ましく、４０μＭ以上であることが特に好ましい。特に、胚軸発酵エキスの場合、スペルミジンおよびカダベリンの合計が３１０μＭ以上であることが好ましく、４００μＭ以上であることがより好ましい。

[0065] なお、本発明の発酵エキスは、上記のイソフラボン化合物、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンについて、これらの各成分自体（原末等）を添加して、上記の含有量としてもよいが、これらの各成分自体は高価であるため、経済性の観点から、そのような添加をすることなく上記の含有量を満たす発酵エキスであることが望ましい。なお、後述の実施例においても示す通り、本発明の発酵エキスは、イソフラボン化合物単独と比較して、高い効果（抗酸化作用、抗糖化作用等）を示すことを、本発明者らは確認している。

[0066] 得られた発酵エキスが含有する糖質については、老化の原因となるメイラード反応の原料となることや、化粧品に配合したときに、皮膚に塗布したときのべとつきの原因となるため、少ないほうが好ましい。

[0067] 糖質としては、例えば、グルコース、フルクトース、スクロースおよびマルトースが挙げられる。これらの糖質の分析方法については、特に限定されないが、好ましくはリン酸-フェニルヒドラジン法（糖をカラムで分離した後

、リン酸-フェニルヒドラジン試薬と反応させて、蛍光誘導体化後検出する方法）やバイオセンサーを用いる方法が用いられる。

[0068] 本発明の発酵エキスは、糖質含有量が４．０ｍｇ／ｍＬ以下であることが好ましく、３．０ｍｇ以下であることがより好ましく、１．５ｍｇ／ｍＬ以下であることがさらに好ましい。特に、グルコースおよびスクロースの含有量の和が３．０ｍｇ／ｍＬ以下であることが好ましく、１．５ｍｇ／ｍＬ以下であることがより好ましい。

[0069] 一態様において、本発明の発酵エキスは、グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：イソフラボン化合物の含有量（μＭ）、すなわち、グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）／イソフラボン化合物の含有量（μＭ）が０．１以下であることが好ましく、０．０５以下であることがより好ましく、０．０１５以下であることがさらに好ましく、０．０１以下であることが特に好ましい。

[0070] 一態様において、本発明の発酵エキスは、イソフラボンアグリコンを含有し、グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：イソフラボンアグリコンの含有量（μＭ）、すなわち、グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）／イソフラボンアグリコンの含有量（μＭ）が０．２以下であることが好ましく、０．１以下であることがより好ましく、０．０１以下であることが特に好ましい。

[0071] 一態様において、本発明の発酵エキスは、グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：ポリアミンの含有量（μＭ）、すなわち、グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）／ポリアミンの含有量（μＭ）が０．３以下であることが好ましく、０．２５以下であることがより好ましく、０．１以下であることがさらに好ましく、０．０５以下であることが特に好ましい。

[0072] 本発明の発酵エキスの他の成分については、特に限定されないが、液体状の窒素分については外原規記載の０．０１～０．０４％であることが好ましい。

[0073] 本発明の発酵エキスは、懸濁状であっても透明であってもよく、色は、例えば、淡い黄色か淡い褐色か無色であることが好ましい。香りは、特に限定されないが、大豆臭が少なく、乳酸菌発酵のさわやかな香りがするものが好ましい。

[0074] 本発明の発酵エキスは、後述の実施例に示すように、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用および保湿作用のいずれか１以上の作用を示し、一態様において、好ましくは表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用ならびに抗糖化作用のいずれか１以上の作用を示す。

[0075] 表皮角化細胞の細胞賦活活性は、市販されている正常ヒト表皮角化細胞（クラボウ社製）に本発明の発酵エキスを培地に対して０．０１～５０％添加して培養液を調製し、これを用いて細胞の増殖を促進させるか否かを判定することにより測定することができる。試料が表皮角化細胞の賦活活性を有する場合とは、試料無添加のときの活性を１００％とすると、例えば、試料を添加したときの表皮角化細胞の賦活活性が１１０％以上の場合をさす。

[0076] 皮膚線維芽細胞の細胞賦活活性は、市販されている正常ヒト皮膚線維芽細胞（クラボウ社製）に本発明の発酵エキスを培地に対して０．０１～５０％添加して培養液を調製し、これを用いて細胞の増殖を促進させるか否かを判定することにより測定することができる。試料が線維芽細胞の賦活活性を有する場合とは、試料無添加のときの活性を１００％とすると、例えば、試料を添加したときの線維芽細胞の賦活活性が１１０％以上の場合をさす。

[0077] 抗酸化作用（ＤＰＰＨラジカル消去活性）は、擬似活性酸素であるＤＰＰＨラジカルに本発明の発酵エキスを添加し、ＤＰＰＨラジカルを消去するか否かを判定することにより測定することができる。試料が抗酸化作用を有する場合とは、試料無添加のＤＰＰＨラジカル消去率を０％とすると、例えば、試料を添加したときのＤＰＰＨラジカル消去率が１０％以上の場合をさす。

[0078] 抗酸化作用（細胞保護作用）は、市販されている正常ヒト表皮角化細胞（

クラボウ社製）に本発明の発酵エキスを培地に対して０．０１～５０％添加して培養液を調製し、これを用いて活性酸素種曝露による細胞ダメージを軽減させるか否かを判定することにより測定することができる。試料が細胞保護作用を有する場合とは、活性酸素を曝露した条件下において、試料無添加の際の細胞生存率に対して、試料添加の際の細胞生存率が１０％以上高まる場合をさす。

[0079] 抗糖化作用は、グルコースとヒト血清アルブミンの混合液に本発明の発酵エキスを添加し、これを用いてＡＧＥｓの生成を抑制するか否かを判定することにより測定することができる。試料が抗糖化作用を有する場合とは、試料無添加のＡＧＥｓ生成抑制活性を０％とすると、例えば、試料を添加したときのＡＧＥｓ生成抑制活性が１０％以上の場合をさす。

[0080] 保湿作用は、ヒトに本発明の発酵エキス０．０１～５０％含有の化粧水を塗布した後に角層水分量および経皮水分蒸散量を測定し、角層水分量の増加または経皮水分蒸散量の減少を確認することにより測定することができる。試料保湿作用を有する場合とは、試料含有化粧水の塗布によって試料費含有化粧水を塗布した場合と比較して、角層水分量が１０％以上増加する場合、または経皮水分蒸散量が１０％以上減少する場合をさす。

[0081] 本発明は、また、本発明の発酵エキスを含む抗老化剤にも関する。上記の表皮角化細胞賦活作用、皮膚線維芽細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用および保湿作用のいずれか１以上の作用を有することを確認することにより、抗老化剤が抗老化作用を有することを確認することができる。

[0082] 本発明は、また、本発明の発酵エキスを含む化粧品および皮膚外用剤にも関する。本発明の化粧品および皮膚外用剤は、常法に従い、通常の化粧品および皮膚外用剤として知られる種々の形態の基材に本発明の発酵エキスを配合して調製することができる。発酵エキスの配合量は、効果や安定性等の点から、全量に対して、０．０１～５０質量％が好ましい。

[0083] 化粧品および皮膚外用剤の形態としては、特に限定されず、例えば、乳液、クリーム、水溶液、パック等の任意の剤形を選択することができる。

[0084] 本発明の化粧品および皮膚外用剤には、上記した必須成分の他に通常の化粧品および皮膚外用剤に配合される成分、例えば、油剤、粉体、精製水、高分子化合物、ゲル化剤、紫外線吸収剤、紫外線散乱剤、酸化防止剤、色素、防腐剤、香料、美容成分を本発明の効果を損なわない範囲で適宜選択して用いることができる。

[0085] 本発明の発酵エキスを医薬品とする場合、薬学的に許容可能な賦形剤を添加して医薬製剤とすることができる。

医薬製剤は、特に限定されないが、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、液剤、シロップ剤、チュアブル、トローチ等の経口剤、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、貼付剤等の外用剤、注射剤、舌下剤、吸入剤、点眼剤、坐剤等の剤形であることができる。また、本発明の医薬品は、本発明の発酵エキスを含むキットとして提供することもできる。

[0086] 本発明の発酵エキスは、摂取容易性の観点から、飲食品に配合することができる。飲食品としては、サプリメント、特定保健用食品、栄養機能食品、健康食品、機能性食品、健康補助食品、通常の飲食品等が挙げられる。飲食品の形状としては、ジュース、清涼飲料、ドリンク剤、茶等の液状、ビスケット、タブレット、顆粒粉末、粉末、カプセル等の固形、ペースト、ゼリー、スープ、調味料、ドレッシング等の半流動状等が挙げられる。

[0087] 本発明は、また、豆乳を乳酸菌で発酵し、次いでポリアミンを抽出することを特徴とする、ポリアミンの製造方法、および大豆胚軸を乳酸菌で発酵し、次いでポリアミンを抽出することを特徴とする、ポリアミンの製造方法にも関する。これにより、酸の添加なしにポリアミンを製造することができる。該方法は、上記の本発明の発酵エキスに関する記載を参照して行うことができ、例えば、豆乳の乳酸菌による発酵および大豆胚軸の乳酸菌による発酵は、上記工程（Ａ）および（Ａ’）を参照して行うことができる。発酵物からのポリアミンの抽出は、当業者に公知の手法を用いて行うことができ、例えば、上記工程（Ｂ）および（Ｃ）ならびに工程（Ｂ’）および（Ｃ’）を参照して行うことができる。

[0088] 本発明は、また、大豆胚軸を、乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉで発酵する工程を含む、イソフラボンアグリコンまたはポリアミンの製造方法にも関する。該方法は、上記の本発明の発酵エキスに関する記載を参照して行うことができる。

[0089] 本発明は、また、豆乳を、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ ＪＣＭ １００１、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １０１０およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ＪＣＭ １０１２から選択される乳酸菌で発酵して得られる豆乳発酵物ならびに大豆胚軸を乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉで発酵して得られる、胚軸発酵物にも関する。これらの発酵物は、上記本発明の発酵エキスに関する記載を参照して、例えば上記工程（Ａ）および（Ａ’）を参照して行うことにより得ることができる。

[0090] 以下、実施例、比較例、分析例および試験例（単に「実施例等」という場合がある）により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明の技術的範囲は、それらの例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0091] 〔豆乳発酵エキスの作製〕

［実施例１－１］

＜菌前培養をＭＲＳ培地で行った豆乳発酵エキスの調製＞

豆乳発酵エキスは、以下に示す方法で調製した。

[0092] 表１に記載の各種Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ（独立行政法人理化学研究所より入手）をＭＲＳ培地に接種し、３７℃で２４時間前培養した。培養培地を遠心して集菌した後、１０倍濃縮した菌液をそれぞれ無調整豆乳（キッコーマンソイフーズ社製）に接種し、３７℃で４８時間、嫌気培養した。培養終了後、１００℃で３０分間加熱し、次いで、エタノールを含量５０％（

ｖ／ｖ）となるように添加し撹拌した。この添加液を４℃で２４時間静置した後、不溶物を遠心および濾過によって除去し、清澄な豆乳発酵エキスを得た。

[0093] ［実施例１－２］

＜菌前培養を無調整豆乳で行った豆乳発酵エキスの調製＞

豆乳発酵エキスは、以下に示す方法で調製した。

Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ　ＪＣＭ　１１０５を無調整豆乳に接種し、３７℃で２４時間前培養した。培養培地を遠心して集菌した後、１０倍濃縮した菌液を無調整豆乳（キッコーマンソイフーズ社製）に接種し、３７℃で４８時間培養した。培養終了後、１００℃で３０分間加熱し、次いで、エタノールを含量５０％（ｖ／ｖ）となるように添加し撹拌した。この添加液を４℃で２４時間静置した後、不溶物を遠心および濾過によって除去し、清澄な豆乳発酵エキスを得た。Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ　ＪＣＭ　１１４８を用いて同様の操作を行った場合も、清澄な豆乳発酵エキスが得られた。

[0094] ［比較例１］

＜豆乳抽出エキス（非発酵）の調製＞

無調整豆乳（キッコーマンソイフーズ社製）を１００℃で３０分間加熱し、次いで、エタノールを含量５０％（ｖ／ｖ）となるように添加した後、遠心および濾過を行って清澄な豆乳抽出エキス（非発酵）を得た。

［実施例２］

＜胚軸発酵エキスの調製＞

胚軸発酵エキスは、以下に示す方法で調製した。

ミルで破砕した胚軸に１６％重量で精製水を加え、室温で５時間浸漬させた。次いで、１００℃で２時間加熱処理を行った後、遠心および加熱滅菌処理を行い、得られた液を胚軸抽出液とした。Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ　ＪＣＭ　１１０５またはＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ　ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ　ＪＣＭ　１１４８（独立行政法人理化学研究所より入手）をＭＲＳ培地に接種し、３７℃で２４時間前培養し、培

養培地を遠心して集菌した後、胚軸抽出液に接種し、３７℃で７２時間培養した。培養終了後、１００℃で３０分間加熱し、含量エタノールを５０％（ｖ／ｖ）となるように添加して撹拌し、４℃で２４時間静置した後、不溶物を遠心および濾過によって除去し、清澄な胚軸発酵エキスを得た。

[0095] ［比較例２］

＜胚軸抽出エキス（非発酵）の調製＞

実施例２で調製した胚軸抽出液を１００℃で３０分間加熱し、次いで、エタノールを含量５０％（ｖ／ｖ）となるように添加し、遠心および濾過を行って清澄な胚軸抽出エキス（非発酵）を得た。

[0096] 〔試料の各種分析〕

［分析例１］

（ａ）イソフラボンの定量分析

試料は全てＰＴＦＥ　０．４５μｍフィルターで濾過した後、下記の条件でＨＰＬＣ（東ソー社製、ＬＣ－８０２０）に付し、イソフラボン配糖体およびイソフラボンアグリコンを分離、検出した。ＨＰＬＣカラムはＹＭＣ－Ｔｒｉａｒｔ　Ｃ１８（ＹＭＣ社製，ＴＡ１２Ｓ０３－０５４６ＷＴ，５０×４．６ｍｍｌ．Ｄ．，粒子径３μｍ）を使用した。溶離には、溶離液Ａ（アセトニトリル：精製水：蟻酸＝１０：９０：０．１）と溶離液Ｂ（アセトニトリル：精製水：蟻酸＝６０：４０：０．１）をそれぞれ５％および９５％含む溶液で開始し、溶離液Ａ　３５％、溶離液Ｂ　６５％で終了する直線濃度勾配を用いた。流速は、２．０ｍＬ／ｍｉｎとし、ＵＶ検出器を用いて、２５４ｎｍにおける吸光度を測定した。試料中のイソフラボン含量は、標準液と試料のＨＰＬＣチャートより、それぞれ各イソフラボンのピーク面積を求めて算出した。標準化合物として、和光純薬社製のイソフラボン化合物の精製品（ダイジン、グリシチン、ゲニスチン、ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン、６”－Ｏ－アセチルダイジン、６”－Ｏ－アセチルグリシチン、６”－Ｏ－アセチルゲニスチン、６”－Ｏ－マロニルダイジン、６”－Ｏ－マロニルグリシチンおよび６”－Ｏ－マロニルゲニスチン）を用いた

。

[0097] また、イソフラボン配糖体からイソフラボンアグリコンへの変換率は、発酵前後のイソフラボン配糖体（マロニル配糖体を含む）のモル濃度を算出し、［（発酵前のイソフラボン配糖体）－（発酵後のイソフラボン配糖体）］／（発酵前のイソフラボン配糖体）×１００（％）として算出した。

各実施例および比較例のサンプルならびに市販の豆乳発酵液の各種イソフラボンの濃度を表１に示す。

[0098] 実施例１－１にて調製した豆乳発酵エキスについて、用いる乳酸菌の種類によってアグリコン化の有無に違いがあった。Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ ＪＣＭ １００１を用いた場合には、イソフラボン配糖体であるダイジンおよびゲニスチンの減少とイソフラボンアグリコンであるダイゼインおよびゲニステインの生成が認められ、イソフラボンアグリコン高含有の豆乳発酵エキスを得た。これらのイソフラボンアグリコンの濃度は、すでに市販されている豆乳発酵液よりも高いものであった。また、実施例１－２にて調製した豆乳発酵エキスおいてもイソフラボンのアグリコン化が認められたことから、豆乳発酵エキス作製の菌前培養には、ＭＲＳ培地だけでなく無調整豆乳も使用できることが明らかとなった。

[0099] 一方で、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １０１０およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ＪＣＭ １０１２を用いて作製した豆乳発酵エキスにおいては、イソフラボンのアグリコン化は認められなかった。

[0100] また、実施例２にて調製した胚軸発酵エキスについても、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８を用いたとき、比較例２にて調製した胚軸抽出エキス（非発酵）と比較して、イ

ソフラボン配糖体であるダイジン、グリシチンおよびゲニスチンの減少とイソフラボンアグリコンであるダイゼイン、グリシテインおよびゲニステインの増加が認められた。胚軸発酵エキスのイソフラボンアグリコン含有量は、発酵に同一の乳酸菌を用いて調製した実施例１－１の豆乳発酵エキスよりもさらに高いものであった。特に、後述の試験例４においてＡＧＥｓ生成阻害活性への寄与が特に大きいことが示されたグリシテインを２００μＭ以上と多量に含むものであった。

[0101] [表1]

単位：μM

イソフラボン	実施例1－1					実施例1－2	比較例1	実施例2		比較例2	A社製豆乳発酵液	B社製豆乳発酵液
	JCM 1105	JCM 1148	JCM 1001	JCM 1010	JCM 1012	JCM 1105	（非発酵）	JCM 1105	JCM 1148	（非発酵）		
ダイジン	20.1	15.6	55.1	115.6	99.6	18.3	66.9	57.8	433.1	912.4	21.1	0.0
グリスチン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	345.5	450.3	0.0	0.0
ゲニスチン	32.7	25.3	34.2	159.2	144.8	27.9	99.3	0.0	57.5	253.9	39.9	0.0
マロニルダイジン	22.1	16.4	18.3	21.2	19.0	19.9	42.6	11.9	16.4	76.9	0.0	0.0
マロニルグリシチン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	27.8	0.0	0.0
マロニルゲニスチン	43.3	31.6	33.3	41.3	38.9	37.7	80.2	12.9	14.1	34.8	0.0	0.0
ダイゼイン	68.2	86.4	55.5	0.0	0.0	85.3	0.0	1171.9	931.9	344.1	22.2	0.0
グリシテイン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	350.6	232.7	98.2	0.0	0.0
ゲニステイン	92.2	120.7	128.1	0.0	0.0	118.9	0.0	309.1	291.5	80.1	33.0	0.0
アグリコンへの変換率(%)	59.1	69.2	51.3	0.0	0.0	64.1		95.3	50.7		47.5	0.0

[0102] ［分析例２］

（ｂ）ポリアミンの定量分析

試料は全てＰＴＦＥ　０．４５μｍフィルターで濾過した後、Ｎｏｖｅｌｌａ－Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｇｒｉｃ．Ｆｏｏｄ　Ｃｈｅｍ．，４８，５１１７－５１２３（２０００）らの方法に基づいて、ＨＰＬＣを用いてポリアミンを分析した［カラム：Ｎｏｖａ　Ｐａｃｋ　C_{18}，３．９　×１５０ｍｍ，粒径４μｍ（Ｗａｔｅｒｓ社製）］。

各実施例および比較例のサンプルならびに市販の豆乳発酵エキスの各種ポリアミンの濃度を表２に示す。

[0103] 実施例１－１にて調製した豆乳発酵エキスにおけるプトレッシン、スペルミジンおよびカダベリンの濃度は、比較例１の豆乳抽出エキス（非発酵）と比較して約２．０－２．５倍高いことがわかった。これらのポリアミンの濃度は、すでに市販されている豆乳発酵液よりも高いものであった。

[0104] また、実施例２にて調製した胚軸発酵エキスにおけるプトレッシン、カダ

ベリンおよびスペルミジンの濃度は、比較例２の胚軸抽出エキス（非発酵）と比較して約１．４－３．０倍高いことがわかった。スペルミンの濃度については、測定限界以下またはプトレッシン、カダベリンおよびスペルミジンの濃度と比較して微量であった。胚軸発酵エキスのポリアミン含有量は、豆乳発酵エキスよりもさらに高いものであり、特に、非常に多量のスペルミジンおよびカダベリンを含有していた。

[0105] [表2]

単位：μM

ポリアミン	実施例1－1					比較例1	実施例2		比較例2	A社製豆乳発酵液	B社製豆乳発酵液
	JCM 1105	JCM 1148	JCM 1001	JCM 1010	JCM 1012	（非発酵）	JCM 1105	JCM 1148	（非発酵）		
プトレッシン	20. 1	19. 1	18. 0	20. 1	20. 1	7. 7	17. 2	17. 2	10. 1	11. 5	4. 6
スペルミジン	24. 3	26. 2	22. 5	28. 0	25. 0	10. 0	135. 4	104. 2	44. 6	3. 5	6. 9
カダベリン	3. 5	3. 5	3. 5	3. 5	4. 3	1. 7	367. 5	357. 1	260. 7	0. 0	1. 0

[0106] ［分析例３］

（ｃ）全窒素量、ｐＨ、グルコース、スクロースおよび乳酸含有量の分析

また、各実施例および比較例のサンプルならびに市販の豆乳発酵液の全窒素量、ｐＨ、グルコース、スクロースおよび乳酸含有量を表３に示した。それぞれの分析に用いた手法は以下のとおりである：

[0107] 豆乳発酵エキスおよび胚軸発酵エキスにおいては、豆乳抽出エキス（非発酵）および胚軸抽出エキス（非発酵）に比較して、ｐＨの低下および乳酸生成が認められた。また、豆乳発酵エキスにおける全窒素量は０．０４０前後、胚軸発酵エキスにおける全窒素量は、０．１１０前後であった。豆乳発酵エキスおよび胚軸発酵エキスにおけるグルコースおよびスクロースの合計含有量は、市販の豆乳発酵液に比較して著しく低く、全て１．５ｍｇ／ｍＬ以下であった。

[0108] [表3]

	実施例1－1					比較例1	実施例2		比較例2	A社製豆乳発酵液	B社製豆乳発酵液
	JCM 1105	JCM 1148	JCM 1001	JCM 1010	JCM 1012	（非発酵）	JCM 1105	JCM 1148	（非発酵）		
pH	5. 17	5. 16	5. 04	4. 96	4. 98	7. 29	4. 70	4. 85	6. 79	6. 67	6. 63
全窒素(w／v)%	0. 037	0. 041	0. 040	0. 041	0. 034	0. 029	0. 106	0. 107	0. 110	0. 064	0. 035
グルコース(mg／mL)	0. 05	0. 05	0. 06	0. 00	0. 24	0. 00	0. 00	0. 00	0. 58	11. 00	3. 71
スクロース(mg／mL)	1. 22	1. 44	1. 04	0. 00	0. 00	5. 09	0. 45	1. 28	6. 39	2. 32	0. 65
乳酸(mg／mL)	3. 66	3. 33	4. 24	5. 08	4. 33	0. 0	6. 33	6. 10	0. 0	2. 77	0. 26

[0109] また、上記分析例１～３の結果をもとに、各実施例および比較例のサンプルならびに市販の豆乳発酵液について、イソフラボンまたはポリアミン量に対する糖質量を算出した結果を以下の表４および５に示す。なお、表４および５中の各成分の含有量は以下のとおり算出した：

（ａ１）イソフラボン化合物：表１に記載の９種のイソフラボンの合計量（μＭ）

（ａ２）イソフラボンアグリコン：表１に記載のダイゼイン、グリシテインおよびゲニステインの合計量（μＭ）

（ｂ）ポリアミン：表２に記載のプトレッシン、スペルミジンおよびカダベリンの合計量（μＭ）

（ｃ）糖質：表３に記載のグルコースおよびスクロースの含有量をμＭに換算後の合計量（ｍｇ／ｍＬ）

[表4]

	実施例1－1					比較例1	A社製豆乳発酵液	B社製豆乳発酵液
	JCM 1105	JCM 1148	JCM 1001	JCM 1010	JCM 1012	（非発酵）		
(a1)イソフラボン化合物	278.6	296.0	324.5	337.3	302.3	289.0	116.2	0.0
(a2)イソフラボンアグリコン	160.4	207.1	183.6	0.0	0.0	0.0	55.2	0.0
(b)ポリアミン	47.9	48.8	44.0	51.6	49.4	19.4	15.0	12.5
(c)糖質	1.27	1.49	1.10	0.00	0.24	5.09	13.32	4.36
(c)／(a1)	0.0046	0.0050	0.0034	0.0000	0.0079	0.0176	0.1146	-
(c)／(a2)	0.0079	0.0072	0.0060	0.0000	-	-	0.2413	-
(c)／(b)	0.0265	0.0305	0.0250	0.0000	0.0049	0.2624	0.8880	0.3488

[表5]

	実施例2		比較例2
	JCM 1105	JCM 1148	（非発酵）
(a1)イソフラボン化合物	1914.2	2322.7	2278.5
(a2)イソフラボンアグリコン	1831.6	1456.1	522.4
(b)ポリアミン	520.1	478.5	315.4
(c)糖質	0.45	1.28	6.97
(c)／(a1)	0.0002	0.0006	0.0031
(c)／(a2)	0.0002	0.0009	0.0133
(c)／(b)	0.0009	0.0027	0.0221

[0110] 〔試作品の効果効能評価〕

［試験例１］表皮角化細胞における発酵エキスの細胞賦活作用の評価

実施例１－１および実施例２で調製した発酵エキスのうち、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８を用いて調製した発酵エキスならびに比較例１および２で調製した抽出エキス（非発酵）について、以下に示す方法で表皮角化細胞における細胞賦活作用を評価した。試料は全て、１規定の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ７．４±０．０５に調整した後、０．２０μｍフィルターで濾過滅菌を行った。

[0111] 正常ヒト表皮角化細胞［クラボウ社製，製品名ＮＨＥＫ（ＮＢ）］を１ウェルあたり５×１０^{3}個となるように９６ウェルマイクロプレートに播種し、３７℃、二酸化炭素濃度５ｖｏｌ％中にて４８時間培養した。播種培地にはＨｕＭｅｄｉａ－ＫＧ２培地（クラボウ社製）を用いた。次いで、ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＢ２（クラボウ社製）培地を用いて各濃度に調製した試料培養液に交換し、さらに４８時間培養した。各試料培養液の最終エタノール濃度は１％になるように調製を行った。

[0112] 培養終了後、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８（同仁化学社製）を用い、生細胞数を測定した。評価には、試料培養液の他に、ポジティブコントロールとしてＨｕＭｅｄｉａ－ＫＧ２を、各試料のブランクとして１％エタノール含有ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＢ２を用いた。

[0113] 表皮角化細胞における細胞賦活作用評価結果を、試料無添加のブランクにおける細胞賦活作用を１００とした相対値［Ｉｎｄｅｘ（％）］にて図１に示した。ブランクであるエタノール１％および比較例１の豆乳抽出エキス（非発酵）においては有意な表皮細胞賦活作用が認められなかったのに対し、実施例１－１の豆乳発酵エキスにおいては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルではともに１２４％と、有意な細胞賦活作用が認められた。また、実施例２の胚軸発酵エキスについても、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５で発酵したサンプルでは１５２％、Ｌ．ｄ

ｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルでは１５１％と、いずれも有意な細胞賦活作用が認められ、また、比較例２の胚軸抽出エキス（非発酵）と比較して高い作用を示し、発酵によって作用が増強する傾向が認められた。図１より明らかなように、本発明の発酵エキスは、正常ヒト表皮角化細胞に対して非常に強力な細胞賦活作用を有していることが確認された。

[0114] ［試験例２］皮膚線維芽細胞における発酵エキスの細胞賦活作用の評価

試験例１と同様のサンプルについて、以下に示す方法で皮膚線維芽細胞における細胞賦活作用を評価した。試料は全て、１規定の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ７．４±０．０５に調整した後、０．２０μｍフィルターで濾過滅菌を行った。

[0115] 正常ヒト皮膚線維芽細胞［クラボウ社製，製品名ＮＨＤＦ（ＮＢ）］を１ウェルあたり２×１０^{3}個となるように９６ウェルマイクロプレートに播種し、３７℃、二酸化炭素濃度５ｖｏｌ％中にて４８時間培養した。播種培地には、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地（ライフテクノロジー社製）を用いた。次いで、ＦＢＳ不含ＤＭＥＭ培地を用いて各濃度に調製した試料培養液に交換し、さらに４８時間培養した。各試料培養液の最終エタノール濃度は１％になるように調製を行った。

[0116] 培養終了後、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８（同仁化学社製）を用い、生細胞数を測定した。評価には、試料培養液の他に、ポジティブコントロールとして１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地を、各試料のブランクとして１％エタノール含有ＦＢＳ不含ＤＭＥＭ培地を用いた。

[0117] 皮膚線維芽細胞における細胞賦活作用評価結果を、試料無添加のブランクにおける細胞賦活作用を１００とした相対値［Ｉｎｄｅｘ（％）］にて図２に示した。ブランクであるエタノール１％および比較例１の豆乳抽出エキス（非発酵）においては皮膚線維芽細胞賦活作用が認められなかったのに対し、実施例１－１の豆乳発酵エキスにおいては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５で発酵したサンプルでは１

１３％、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルでは１１７％と、いずれも有意な細胞賦活作用が認められ、発酵によって作用が増強する傾向が認められた。また、実施例２の胚軸発酵エキスについても、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５で発酵したサンプルでは１３２％、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルでは１３７％と、強力な細胞賦活作用が認められ、胚軸発酵エキスの効果は、実施例１－１の豆乳発酵エキスと比較してより高いものであった。図２より明らかなように、本発明の発酵エキスは、正常ヒト皮膚線維芽細胞に対して非常に強力な細胞賦活作用を有していることが確認された。

[0118] ［試験例３］発酵エキスの抗酸化作用（ＤＰＰＨラジカル消去活性）の評価

試験例１と同様のサンプルおよび市販の豆乳発酵エキスについて、以下に示す方法で抗酸化作用（ＤＰＰＨラジカル消去活性）を評価した。試料は全て、１規定の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ７．４±０．０５に調整した後、０．２０μｍフィルターで濾過滅菌を行った。

[0119] ９６ウェルマイクロプレートに試料を４０μＬずつ添加した。そこへ、０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ５．５）および０．１５ｍＭの１，１－ジフェニル－２－ピクリルヒドラジル（ＤＰＰＨ）メタノール溶液をそれぞれ８０μＬずつ添加し、よく混合した後、室温、暗所にて１時間静置した。静置後、ＤＰＰＨラジカルに由来する５１７ｎｍの吸光度を測定した。試料無添加の場合の吸光度を（Ａ）、試料を添加した場合の吸光度を（Ｂ）としたとき、ＤＰＰＨラジカルの消去率は次式に定義される。

ＤＰＰＨラジカル消去率＝｛１－（Ｂ）／（Ａ）｝×１００

抗酸化作用を有するポジティブコントロールとしてＴｒｏｌｏｘを、各試料のブランクとして５０％エタノールを用いた。

[0120] 抗酸化作用（ＤＰＰＨラジカル消去活性）評価結果を図３に示した。比較例１の豆乳抽出エキス（非発酵）におけるＤＰＰＨラジカル消去活性は５４

％であったのに対し、実施例１－１の豆乳発酵エキスにおいては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５で発酵したサンプルでは７６％、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルでは６９％と高いＤＰＰＨラジカル消去活性が認められ、発酵によって作用が増強する傾向が認められた。また、比較例２の胚軸抽出エキス（非発酵）におけるＤＰＰＨラジカル消去活性は７７％であったのに対し、実施例２の胚軸発酵エキスにおいては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５で発酵したサンプルでは８２％、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルでは８０％と非常に高いＤＰＰＨラジカル消去活性が認められ、発酵によって作用が増強する傾向が認められた。また、胚軸発酵エキスの効果は、実施例１－１の豆乳発酵エキスに比較してより高いものであった。一方で、Ａ社およびＢ社製の豆乳発酵エキスには、ＤＰＰＨラジカル消去活性はほとんど認められなかった。図３より明らかなように、本発明の発酵エキスは、非常に強力な抗酸化作用を有していることが確認された。

[0121] 同様の方法で、イソフラボン標品の抗酸化作用を評価した結果を図４に示した。実施例１－１のＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵した豆乳発酵エキスに含まれるイソフラボンよりも多い２００μＭのイソフラボン標品においても、高いＤＰＰＨラジカル消去活性は認められなかった。このことから、発酵エキスのＤＰＰＨラジカル消去活性の大部分は、イソフラボン以外の有効成分によって発揮されていると考えられた。よって、本発明の発酵エキスは、抗酸化物質として広く知られているイソフラボンに加えて、イソフラボン以外の高い抗酸化能を有する成分を含有しており、非常に強力な抗酸化作用を発揮することが確認された。

[0122] ［試験例４］発酵エキスの抗糖化作用の評価

試験例３と同様のサンプルについて、以下に示す方法で抗糖化作用を評価した。試料は全て、１規定の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ７．４±０．０５に調整した後、０．２０μｍフィルターで濾過滅菌を行った。

[0123] １．５ｍＬマイクロチューブに５００μＬの０．１Ｍ　ＰＢＳ、２０μＬの４０ｍｇ／ｍＬヒト血清アルブミン、１００μＬの２Ｍグルコース溶液、３６０μＬの蒸留水および２０μＬの試料を添加し、よく混合した後６０℃で４０時間インキュベートした。同時に各反応ブランクとして、グルコース溶液の代わりに蒸留水を添加したものをインキュベートした。陽性コントロールとして試料の代わりに蒸留水を添加したものを、陽性コントロールブランクとして、陽性コントロールのグルコース溶液の代わりに蒸留水を添加したものをインキュベートした。インキュベート後、９６ウェルプレートに試験溶液を分注し、励起波長３７０ｎｍ、蛍光波長４４０ｎｍにて蛍光を測定した。試料添加の場合の蛍光を（Ａ）、反応ブランクの蛍光を（Ｂ）、陽性コントロールの蛍光を（Ｃ）、陽性コントロールブランクの蛍光を（Ｄ）としたとき、ＡＧＥｓ生成阻害活性は次式に定義される。

ＡＧＥｓ生成阻害活性＝｛１－（Ａ－Ｂ）／（Ｃ－Ｄ）｝×１００

また、ＡＧＥｓ生成阻害活性を有するポジティブコントロールとして、アミノグアニジンを用いた。

[0124] 発酵エキスの抗糖化作用評価結果を図５に示した。比較例１の豆乳抽出エキス（非発酵）におけるＡＧＥｓ生成阻害活性は１７％であったのに対し、実施例１－１の豆乳発酵エキスにおいては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ　ＪＣＭ　１１０５で発酵したサンプルでは３０％、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ　ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ　ＪＣＭ　１１４８で発酵したサンプルでは３６％と高いＡＧＥｓ生成阻害活性が認められ、発酵によって作用が増強する傾向が認められた。また、比較例２の胚軸抽出エキス（非発酵）におけるＡＧＥｓ生成阻害活性は８１％であったのに対し、実施例２の胚軸発酵エキスにおいては、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ　ＪＣＭ　１１０５およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅ

ｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵したサンプルともに１００％という非常に高いＡＧＥｓ生成阻害活性が認められ、豆乳発酵エキスと同様に、発酵によって作用が増強する傾向が認められた。また、胚軸発酵エキスの効果は、実施例１－１の豆乳発酵エキスに比較してより高いものであった。一方で、Ａ社およびＢ社製の豆乳発酵エキスには、ＡＧＥｓ生成阻害活性は認められなかった。図５より明らかなように、本発明の発酵エキスは、非常に強力な抗糖化作用を有していることが確認された。

[0125] 同様に、イソフラボン標品の抗糖化作用を評価した結果を図６に示した。豆乳発酵エキスに含まれるダイジン、ダイゼイン、ゲニスチンおよびゲニステインについては、実施例１－１のＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８で発酵した豆乳発酵エキスに含まれる濃度よりも高い２００μＭの標品においても、豆乳発酵エキスに匹敵する強力な抗糖化作用は認められなかった。このことから、豆乳発酵エキスの抗糖化作用は、イソフラボンの組み合わせによって相乗的な効果が発揮されているか、もしくはイソフラボン以外の有効成分によっても効果が発揮されている可能性が考えられた。また、グリシテイン２００μＭ標品において非常に顕著なＡＧＥｓ生成阻害作用が認められたことから、図５で示した胚軸発酵エキスの抗糖化作用は、主にグリシテインによって発揮されている可能性が考えられた。

[0126] ［試験例５］豆乳発酵エキスの抗酸化作用（細胞保護作用）の評価

実施例１－１で調製した豆乳発酵エキスのうち、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８を用いて調製した豆乳発酵エキスおよび比較例１で調製した豆乳抽出エキス（非発酵）について、以下に示す方法で抗酸化作用（細胞保護作用）を評価した。試料は全て、１規定の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ７．４±０．０５に調整した後、０．２０μｍフィルターで濾過滅菌を行った。

[0127] 正常ヒト表皮角化細胞［クラボウ社製，製品名ＮＨＥＫ（ＮＢ）］を１ウェ

ルあたり１０×１０^{3}個となるように９６ウェルマイクロプレートに播種し、３７℃、二酸化炭素濃度５ｖｏｌ％中にて２４時間培養した。播種培地にはＨｕＭｅｄｉａ－ＫＧ２培地（クラボウ社製）を用いた。次いで、ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＢ２（クラボウ社製）培地を用いて各濃度に調製した試料培養液に交換し、さらに２４時間培養した。各試料培養液の最終エタノール濃度は１％になるように調製を行った。試料培養液への交換から２４時間後に、ｔｅｒｔ－ｂｕｔｙｌ　ｈｙｄｒｏｐｅｒｏｘｉｄｅ（ｔ－ＢＨＰ）を最終濃度０．５ｍＭとなるように曝露し、２時間培養した。次いで、各ウェルをＨＢＳＳ（－）で十分に洗浄した後、ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＢ２培地でさらに２２時間培養を行った。

[0128] 培養終了後、Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８（同仁化学社製）を用い、細胞生存率を算出した。評価には、試料培養液の他に、ポジティブコントロールとしてＴｒｏｌｏｘを、ＴｒｏｌｏｘのブランクとしてＤＭＳＯを、各試料のブランクとして１％エタノール含有ＨｕＭｅｄｉａ－ＫＢ２培地を用いた。

[0129] 抗酸化作用（細胞保護作用）評価結果を図７に示した。比較例１の豆乳抽出エキス（非発酵）における細胞生存率は１４％であったのに対し、実施例１－１の豆乳発酵エキスにおいては４８％と高い細胞生存率が認められ、発酵によって細胞保護作用が増強する傾向が認められた。図７より明らかなように、本発明の豆乳発酵エキスは、非常に強力な抗酸化作用を有していることが確認された。

[0130] ［試験例６］豆乳発酵エキスの保湿作用の評価

実施例１－１で調製した豆乳発酵エキスのうち、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ　ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ　ＪＣＭ　１１４８を用いて調製した豆乳発酵エキスについて、以下に示す方法でヒトｉｎ　ｖｉｖｏにおける保湿作用を評価した。試料は全て、１規定の水酸化ナトリウムを用いてｐＨ７．４±０．０５に調整した後、０．２０μｍフィルターで濾過滅菌を行った。

[0131] 豆乳発酵エキスを用いて、表６の処方に基づき２種類の化粧水を作製し、

試験試料とした。

[0132] [表6]

豆乳発酵エキス(＋)

豆乳発酵エキス	2．0%	1mL
グリセリン	2．0%	1mL
1，3－ブチレングリコール	3．0%	1．5mL
メチルパラベン	0．1%	50mg
滅菌水	残余	46．5mL
		50mL

豆乳発酵エキス(－)

グリセリン	2．0%	1mL
1，3－ブチレングリコール	3．0%	1．5mL
メチルパラベン	0．1%	50mg
滅菌水	残余	47．5mL
		50mL

[0133] 被験者の前腕内側部に３ｃｍ四方の試験部位を取り、試験試料を１日３回、３日間塗布した。試験試料の最終塗布から８～１０時間後に、角層水分量および経皮水分蒸散量の測定を行った。角層水分量の測定には高感度角層膜厚・水分計ＡＳＡ－ＭＸ３を、経皮水分蒸散量の測定にはバポスキャンＡＳ－ＶＴ１００ＲＳを用いた（ともにアサヒバイオメッド社製）。

[0134] 豆乳発酵エキスの保湿作用評価結果を図８および図９に示した。３名の被験者いずれにおいても、豆乳発酵エキス含有化粧水の塗布によって角層水分量が１０％以上増加した。また、豆乳発酵エキス含有化粧水の塗布によって経皮水分蒸散量は１０％以上減少する傾向が認められた。このことから、豆乳発酵エキスは角層水分量増加作用および角層バリア機能増強作用を有しており、ヒトｉｎ　ｖｉｖｏにおいて保湿作用を発揮することが確認された。

[0135] 本出願は、２０１２年１２月１１日に出願された日本国特許出願第２０１２－２６９９２８号、２０１３年７月１日に出願された日本国特許出願第２０１３－１３７９０１号、および２０１３年７月１７日に出願された日本国特許出願第２０１３－１４８３９１号に基づく優先権を主張するものであり、この内容はここに参照として組み込まれる。

産業上の利用可能性

[0136] 本発明によれば、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンが高含有である豆乳発酵エキスを提供することができ、特に、糖質含量が少なく、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用ならびに保湿作用などの抗老化作用を示す豆乳発酵エキスを提供することができる。また、本発明によれば、大豆胚軸を乳酸菌で発酵することによっ

て得られる胚軸発酵エキスを提供することができ、特に、イソフラボンアグリコンおよびポリアミンが高含有であり、表皮角化細胞および皮膚線維芽細胞に対する細胞賦活作用、抗酸化作用ならびに抗糖化作用などの抗老化作用を有する胚軸発酵エキスを提供することができる。本発明の豆乳発酵エキスおよび胚軸発酵エキスは、化粧品、医薬品、飲食品の分野において、産業上の利用可能性を有する。

請求の範囲

[請求項1] 次の（Ａ）、（Ｂ）および（Ｃ）の工程：

（Ａ）豆乳を乳酸菌で発酵する工程；

（Ｂ）工程（Ａ）で得られた発酵物と有機溶媒を混合する工程；および

（Ｃ）工程（Ｂ）で生成する固形分を除去する工程；

を含む方法によって得られる豆乳発酵エキスであって、

次の（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）：

（ｉ）イソフラボン化合物の含有量が１５０μＭ以上；

（ｉｉ）工程（Ａ）におけるイソフラボン配糖体からイソフラボンアグリコンへの変換率が５０％以上；および

（ｉｉｉ）ポリアミンの含有量が２０μＭ以上；

を満たす、豆乳発酵エキス。

[請求項2] （ｉｖ）グルコースおよびスクロースの含有量の和が３．０ｍｇ／ｍＬ以下である、請求項１に記載の豆乳発酵エキス。

[請求項3] 次の（ｖ）および（ｖｉ）：

（ｖ）グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：イソフラボン化合物の含有量（μＭ）が０．１以下；および

（ｖｉ）グルコースおよびスクロースの含有量の和（ｍｇ／ｍＬ）：ポリアミンの含有量（μＭ）が０．３以下；

の１以上を満たす、請求項１または２に記載の豆乳発酵エキス。

[請求項4] 工程（Ａ）における乳酸菌がＬａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉである、請求項１～３のいずれか１項に記載の豆乳発酵エキス。

[請求項5] 工程（Ａ）に先立って、（Ｐ）前培養を豆乳で行う工程を含む方法によって得られる、請求項１～４のいずれか１項に記載の豆乳発酵エキス。

[請求項6] 次の（Ａ’）、（Ｂ’）および（Ｃ’）の工程：

（Ａ’）大豆胚軸を乳酸菌で発酵する工程；

（Ｂ’）工程（Ａ’）で得られた発酵物と有機溶媒を混合する工程；および

（Ｃ’）工程（Ｂ’）で生成する固形分を除去する工程；

を含む方法によって得られる胚軸発酵エキス。

[請求項7] グリシテインを１００μＭ以上含有する、請求項６に記載の胚軸発酵エキス。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか１項に記載の発酵エキスを含む、抗老化剤。

[請求項9] 表皮角化細胞賦活作用、皮膚線維芽細胞賦活作用、抗酸化作用、抗糖化作用および保湿作用のいずれか１以上の作用を有する、請求項８に記載の抗老化剤。

[請求項10] 請求項１～７のいずれか１項に記載の発酵エキスを含む、化粧品、皮膚外用剤、医薬品または飲食品。

[請求項11] 豆乳を乳酸菌で発酵し、次いでポリアミンを抽出することを特徴とする、ポリアミンの製造方法。

[請求項12] 大豆胚軸を乳酸菌で発酵し、次いでポリアミンを抽出することを特徴とする、ポリアミンの製造方法。

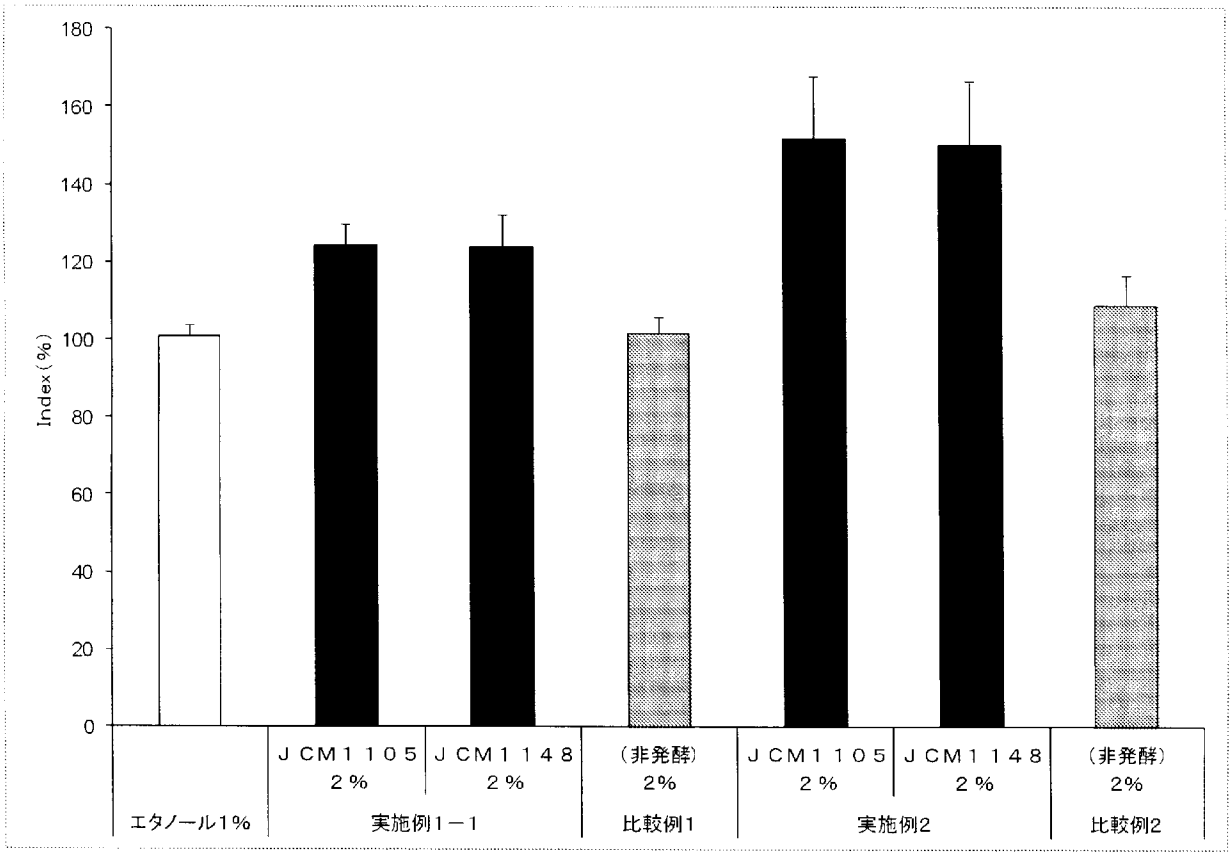
[請求項13] 大豆胚軸を乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉで発酵する工程を含む、イソフラボンアグリコンまたはポリアミンの製造方法。

[請求項14] 豆乳を、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１０５、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １１４８、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ ＪＣＭ １００１、Ｌ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＪＣＭ １０１０およびＬ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ｓｕｂｓｐ．ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ ＪＣＭ １０１２から選択される乳酸菌で発酵して得られる豆乳発

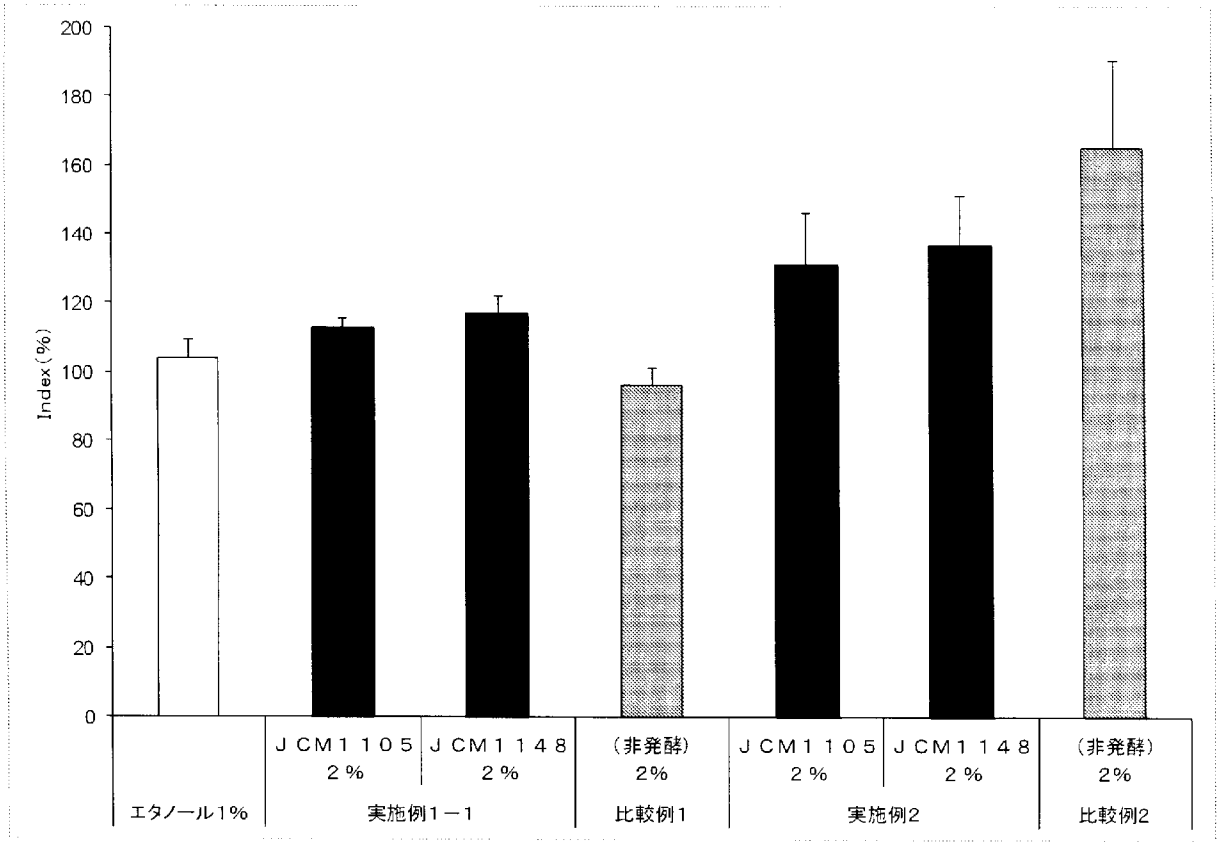
酵物。

[請求項15] 大豆胚軸を乳酸菌Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉで発酵して得られる、胚軸発酵物。

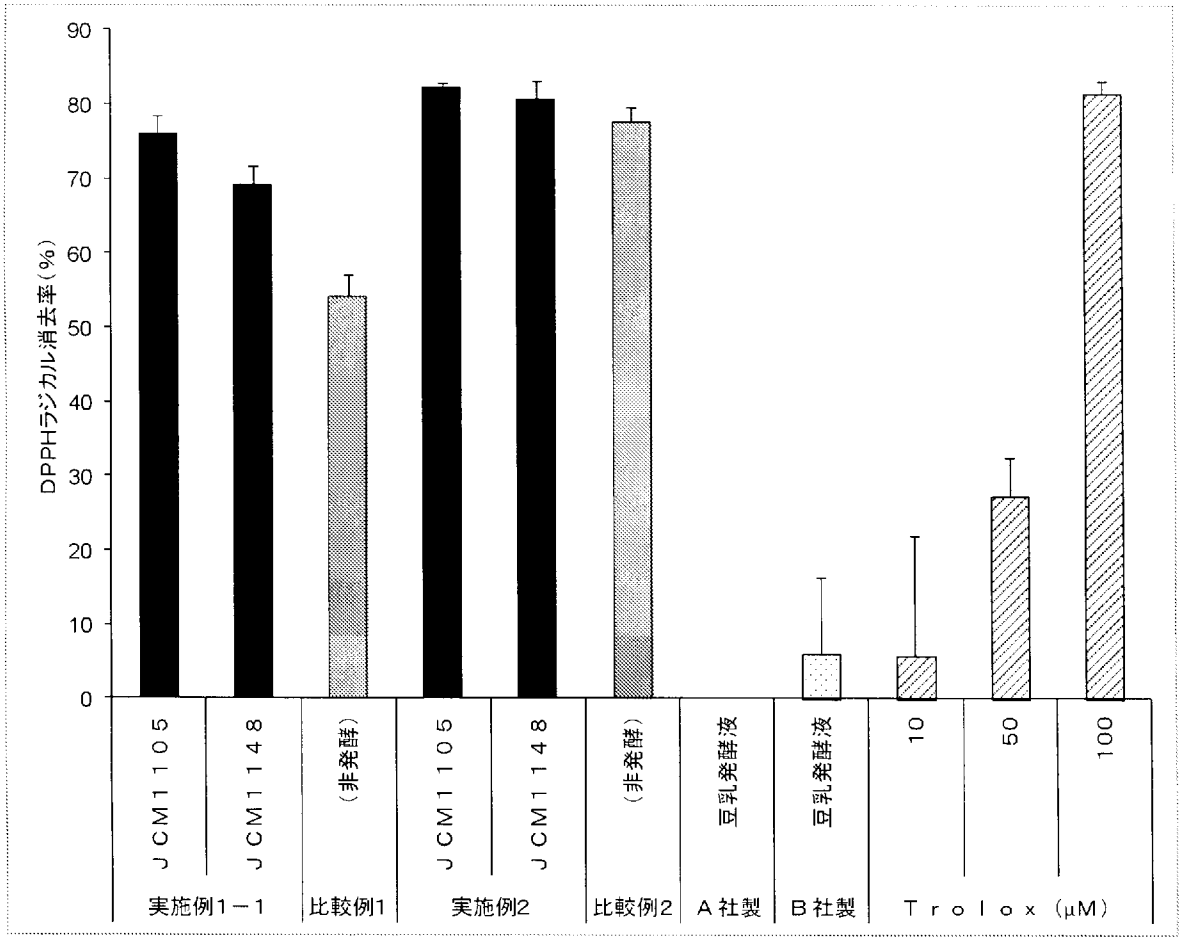
[図1]


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Index(%)
エタノール1%
JCM1105 2%
JCM1148 2%
実施例1－1
(非発酵) 2%
比較例1
JCM1105 2%
JCM1148 2%
実施例2
(非発酵) 2%
比較例2

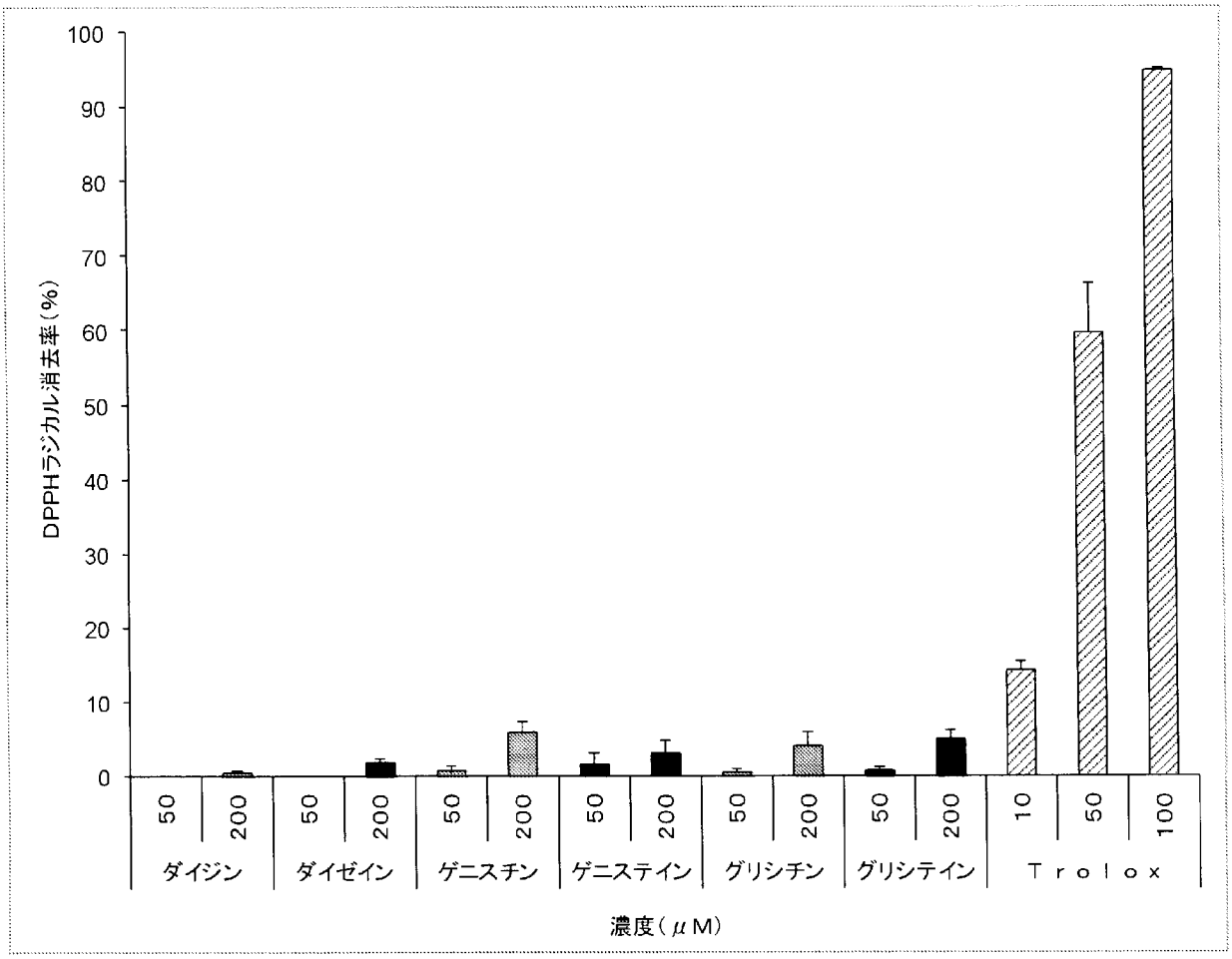
[図2]


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Index(%)
エタノール1%
JCM1105 2%
JCM1148 2%
実施例1－1
(非発酵) 2%
比較例1
JCM1105 2%
JCM1148 2%
実施例2
(非発酵) 2%
比較例2

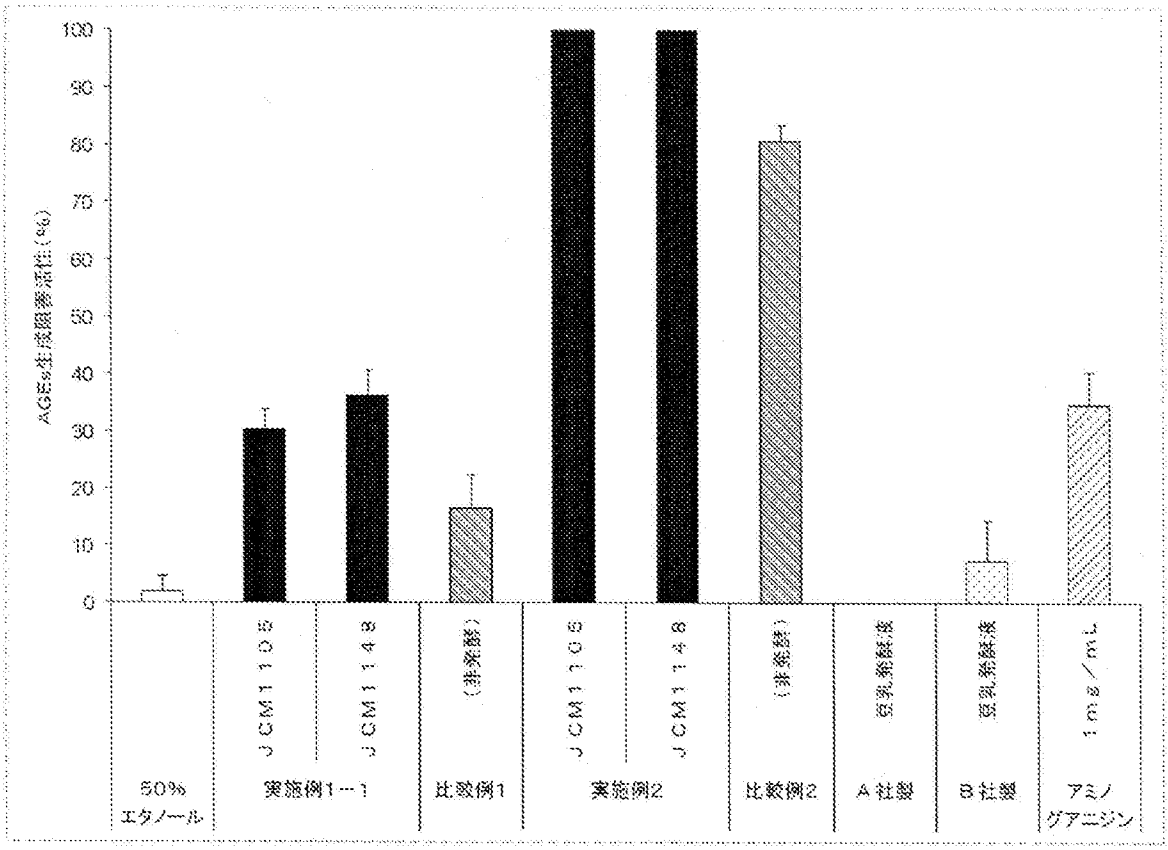
[図3]


DPPHラジカル消去率(%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
JCM1105
JCM1148
(非発酵)
JCM1105
JCM1148
(非発酵)
豆乳発酵液
豆乳発酵液
10
50
100
実施例1－1
比較例1
実施例2
比較例2
A社製
B社製
Trolox (μM)

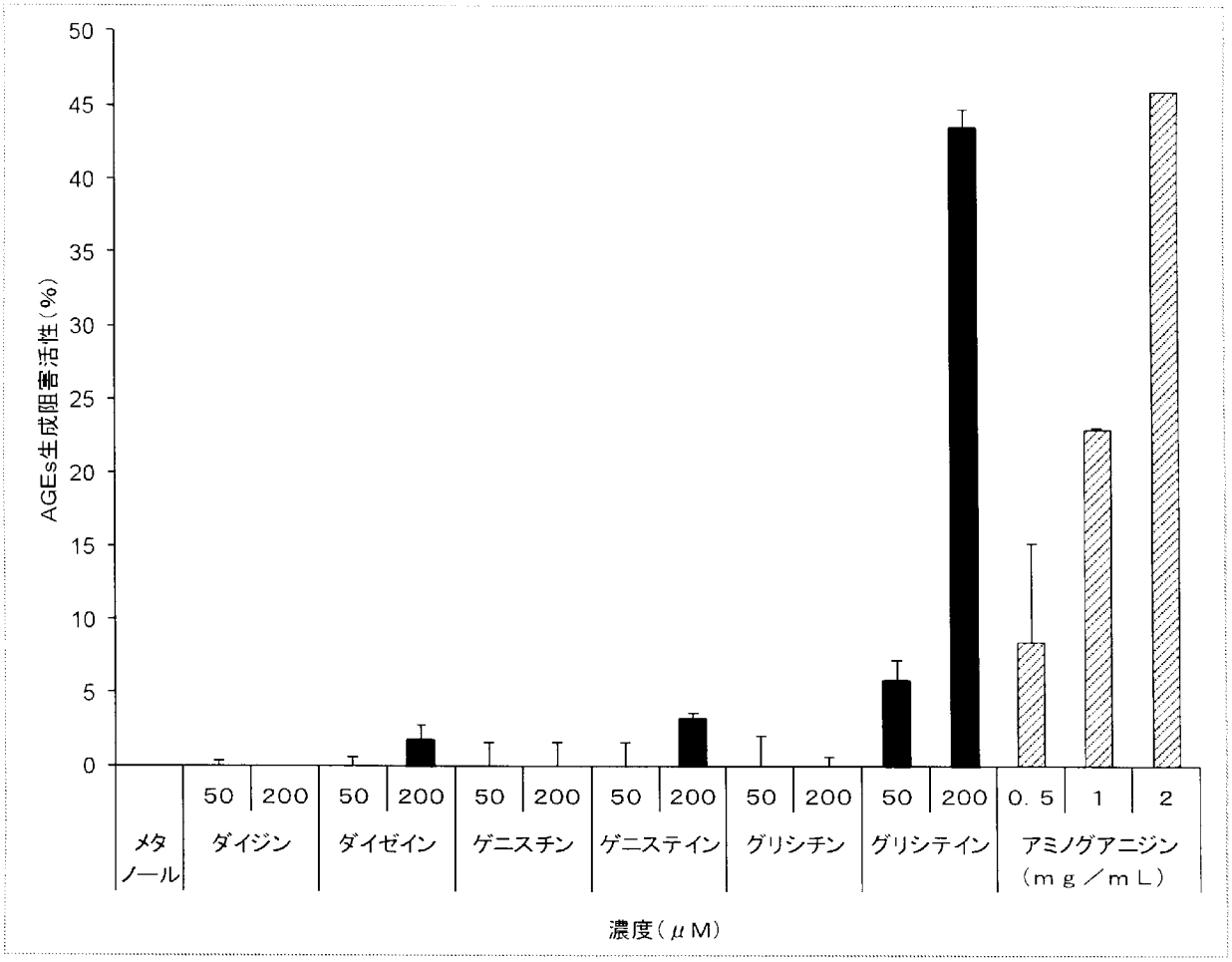
[図4]


DPPHラジカル消去率(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50
200
ダイジン
ダイゼイン
ゲニスチン
ゲニステイン
グリシチン
グリシテイン
10
50
100
Trolox
濃度(μM)

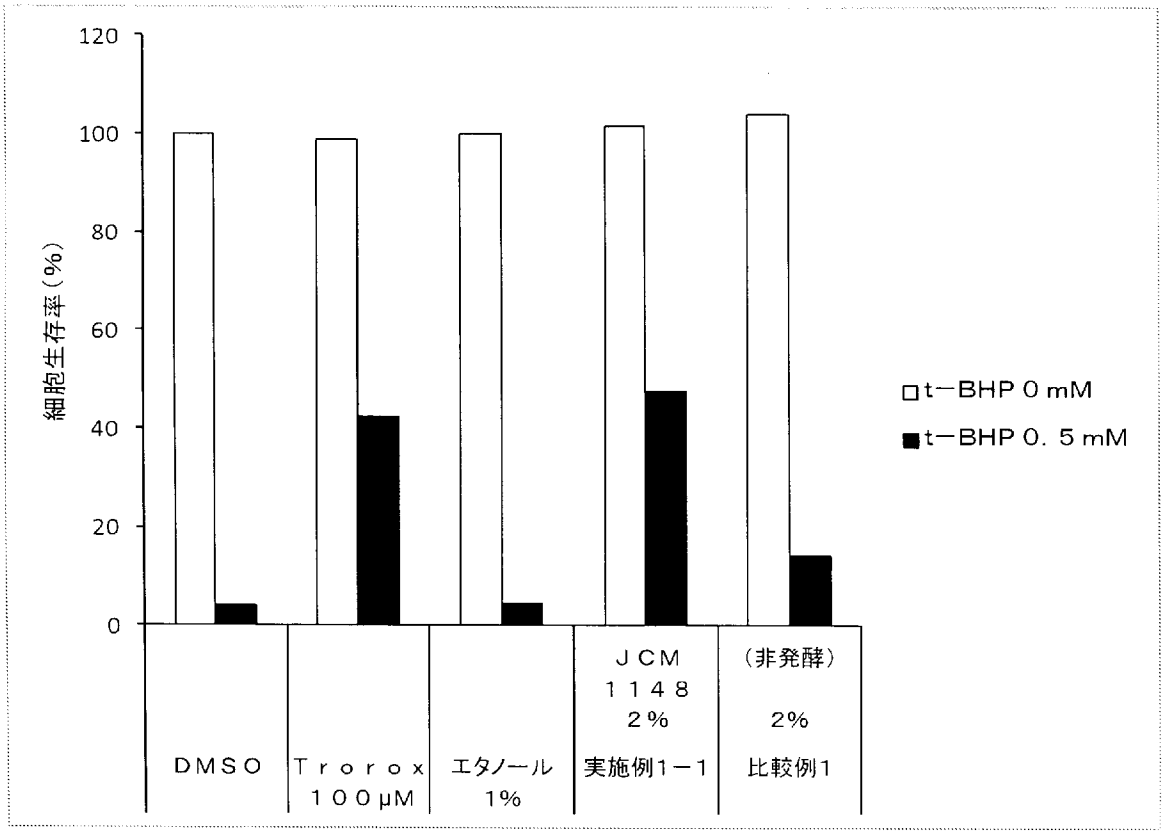
[図5]


AGEs生成阻害活性(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50%
エタノール
実施例1--1
JCM1105
JCM1148
比較例1
(非発酵)
実施例2
JCM1105
JCM1148
比較例2
(非発酵)
A社製
豆乳発酵液
B社製
豆乳発酵液
アミノ
グアニジン
1mg/mL

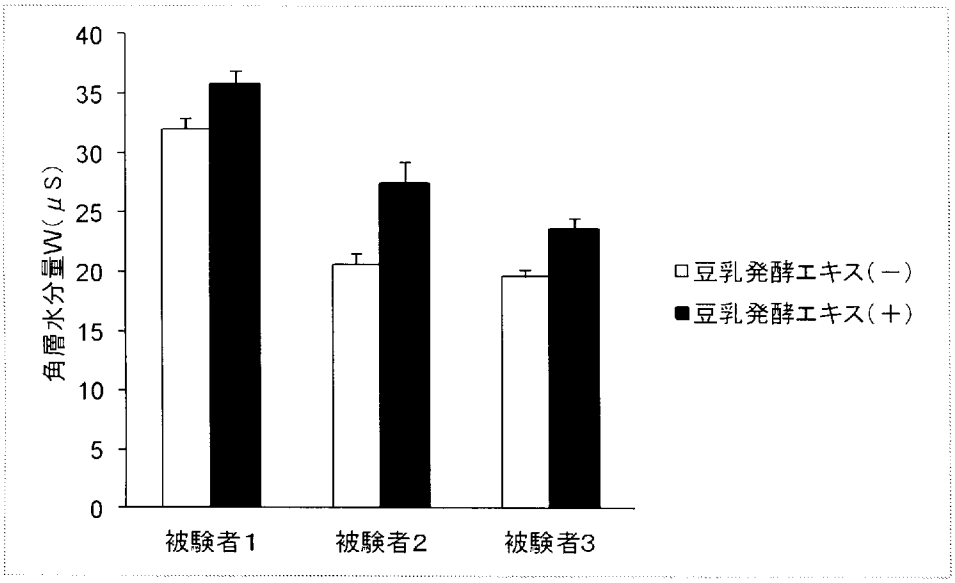
[図6]


AGEs生成阻害活性(%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
50
200
メタノール
ダイジン
ダイゼイン
ゲニスチン
ゲニステイン
グリシチン
グリシテイン
0.5
1
2
アミノグアニジン
(mg/mL)
濃度(μM)

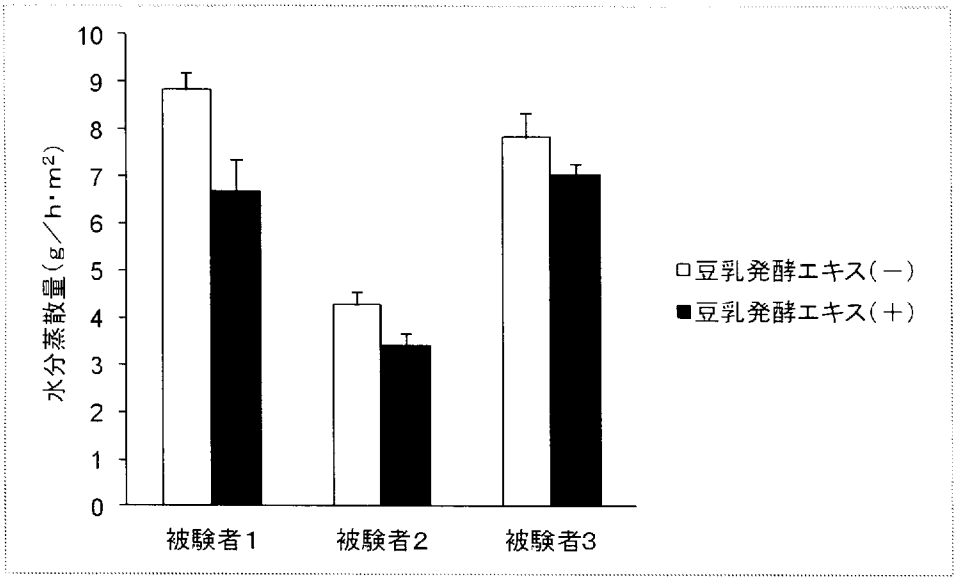
[図7]


細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
□t−BHP 0 mM
■t−BHP 0.5 mM
DMSO
Trorox
100μM
エタノール
1%
JCM
1148
2%
実施例1−1
(非発酵)
2%
比較例1

[図8]


角層水分量W(μS)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
被験者1
被験者2
被験者3
□豆乳発酵エキス(－)
■豆乳発酵エキス(＋)

[図9]


水分蒸散量(g／h･m²)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
被験者1
被験者2
被験者3
□豆乳発酵エキス(－)
■豆乳発酵エキス(＋)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/082603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A23L1/20(2006.01)i, *A23L1/30*(2006.01)i, *A61K8/41*(2006.01)i, *A61K8/49*(2006.01)i, *A61K8/97*(2006.01)i, *A61K36/00*(2006.01)i, *A61K36/48*(2006.01)i, *A61P17/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *A61Q19/00*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23L1/20, A23L1/30, A61K8/41, A61K8/49, A61K8/97, A61K36/00, A61K36/48, A61P17/00, A61P43/00, A61Q19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Tonyu Hakkoeki, The Japanese Standards of Quasi-Drug Ingredients 2006, 2006 Nen 6 Gatsu, Yakuji Nippo Ltd., page 1124	1-4,8-10/ 1-5,8-10,14
X/Y	JP 2006-022050 A (Kanebo Cosmetics Inc.), 26 January 2006 (26.01.2006), (Family: none)	1-4,8-10/ 1-5,8-10,14
X/Y	Tomen Corp., Hadashitsu Kairyozai 'Shokubutsusei Nyusankin Hakkoeki', Fragrance Journal, 2004, vol.32, no.4, pages 129 to 130	1-4,8-10/ 1-5,8-10,14
X	WO 2008/153158 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 18 December 2008 (18.12.2008), & EP 2168440 A1 & US 2011/0033564 A1	6-10,13,15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 February, 2014 (12.02.14)	25 February, 2014 (25.02.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/082603

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-081855 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 19 March 2003 (19.03.2003), (Family: none)	1-5,8-10,14
Y	Maki KOBAYASHI et al., "Nyusan Hakko Tonyu Sesshuji no Rat no Kecchu Isoflavone Polyamine Nodo to Ensho Yokusei Sayo", The Japanese Society of Nutrition and Food science Taikai Koen Yoshishu, April 2012, vol.66, page 102 (2E-15p)	11-13
Y	Naohiro TAKAGI et al., "Effect of Okara and Soymilk Mixture Fermented with Lactic Acid Bacteria on Short Chain Fatty Acid and Polyamine Concentration in Rat Cecum", Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 2009, vol.56, no.11, pages 585 to 590	11-13
P,A	WO 2013/051483 A1 (TOYOBO CO., LTD.), 11 April 2013 (11.04.2013), & TW 201321338 A	1-15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０８２６０３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A23L1/20(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K8/41(2006.01)i, A61K8/49(2006.01)i, A61K8/97(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61K36/48(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A23L1/20, A23L1/30, A61K8/41, A61K8/49, A61K8/97, A61K36/00, A61K36/48, A61P17/00, A61P43/00, A61Q19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)、WPI

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X／Y	豆乳発酵液, 医薬部外品原料規格 2006, 2006 年 6 月, 株式会社薬事日報社, p.1124	1-4, 8-10／ 1-5, 8-10, 14
X／Y	JP 2006-022050 A (株式会社カネボウ化粧品) 2006.01.26 (ファミリーなし)	1-4, 8-10／ 1-5, 8-10, 14

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１２．０２．２０１４	２５．０２．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３７６５
池上　文緒
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X／Y	株式会社トーメン, 肌質改良剤「植物性乳酸菌発酵液」, フレグランスジャーナル, 2004, vol.32, no.4, p.129-130	1-4, 8-10／ 1-5, 8-10, 14
X	WO 2008/153158 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2008.12.18 & EP 2168440 A1 & US 2011/0033564 A1	6-10, 13, 15
Y	JP 2003-081855 A (株式会社ヤクルト本社) 2003.03.19 (ファミリーなし)	1-5, 8-10, 14
Y	小林麻貴ほか, 乳酸発酵豆乳摂取時のラットの血中イソフラボン・ポリアミン濃度と炎症抑制作用, 日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, Apr-2012, vol.66, p.102(2E-15p)	11-13
Y	高木尚紘ほか, 乳酸発酵オカラ豆乳がラット盲腸内の短鎖脂肪酸およびポリアミン含量に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, 2009, vol.56, no.11, p.585-590	11-13
ＰＡ	WO 2013/051483 A1 (TOYOBO CO., LTD.) 2013.04.11 & TW 201321338 A	1-15