



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 153**

51 Int. Cl.:

A23L 1/20 (2006.01)

A23C 11/10 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07704603 .5**

96 Fecha de presentación : **15.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1983844**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54

Título: **Procedimiento de obtención de extractos activos a partir de granos de soja y utilizaciones de los extractos obtenidos correspondientes.**

30

Prioridad: **15.02.2006 FR 06 01332**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2011

73

Titular/es: **SOJASUN TECHNOLOGIES**
2 rue Julien Neveu Campus de Ker Lann
35530 Noyal-sur-Vilaine, FR

72

Inventor/es: **Efstathiou, Théo y**
Driss, Fathi

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 153 T3

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

DESCRIPCIÓN

El dominio de la invención es el de la nutraceutica. Más precisamente, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto activo de soja destinado a ser asociado a un producto alimentario con el fin de conferirle propiedades antioxidantes y/o anti-inflamatorias y/o anti-elastasa.

5 La « nutraceutica » se refiere a todo alimento o ingrediente alimentario que aporta un beneficio para la salud, tal como la prevención o el tratamiento de una enfermedad.

Más precisamente, la nutraceutica se refiere a las preparaciones alimentarias que proporcionan beneficios superiores a la nutrición clásica, a los alimentos para nutrición especializada adaptados a los regímenes de pacientes en condiciones médicas particulares tales como los pacientes afectados de diabetes, los regímenes para niños pequeños y neonatos, y ahora los regímenes especializados para personas ancianas, y finalmente los complementos alimentarios y más precisamente los complementos nutricionales de uso médico.

Entre estos complementos nutricionales de uso médico, se pueden citar:

- las especialidades que permiten reducir la frecuencia de los trastornos ligeros reforzando las defensas naturales del organismo o limitando de forma precoz los derivados metabólicos del organismo;

15 - las especialidades que contienen principios activos naturales con eficacia probada científicamente, que permiten prevenir o retardar las patologías reconocidas y con fuerte prevalencia, y/o reducir los tratamientos (frecuencia y dosis) médicos pesados, y/o limitar los efectos secundarios de los tratamientos y mejorar así el bienestar de los pacientes.

20 La soja, utilizada desde hace mucho tiempo en Asia en la alimentación tradicional, ha llegado a ser en Occidente una materia prima industrial en la composición de productos alimentarios.

En su explotación industrial, la soja se utiliza en la fabricación de alimentos principalmente bajo la forma de ingredientes procedentes de las semillas. Estos ingredientes se utilizan por sus propiedades funcionales (fijación de agua, espesamiento, emulsión, texturación, etc.) o sus propiedades nutricionales.

25 Desde el punto de vista nutricional, la soja constituye un aporte de nutrientes en la alimentación, pero igualmente se puede sacar provecho de la misma en el marco de una nutrición denominada « preventiva ».

A nivel industrial, se han realizado investigaciones para demostrar las propiedades de ciertas fracciones de las semillas de soja.

Los compuestos estudiados han sido extraídos de las fracciones proteica y lipídica, de las fibras y en gran parte de moléculas específicas.

30 Sin embargo, a pesar de las numerosas publicaciones, todavía están sin explorar numerosos aspectos relativos a la soja.

Se sabe sin embargo que la soja contiene isoflavonas (genisteína, daidzeína, gliceteína) que desde hace algunos años son objeto de investigaciones dirigidas. Estas isoflavonas tienen propiedades antioxidantes y podrían intervenir en diversas acciones biológicas asociadas a los extractos de soja en el marco de una nutrición preventiva.

35 Ahora bien, actualmente, las técnicas utilizadas para obtener y estudiar los extractos de semillas de soja están a un nivel exploratorio.

Parece por tanto deseable, en la perspectiva de una utilización creciente de la soja alimentaria, proponer una técnica de obtención de extractos activos a partir de la soja que pueda ser explotada industrialmente.

Este es el objetivo de la invención.

40 Otro objetivo de la invención es proponer utilizaciones de los extractos obtenidos a partir de la soja.

La invención tiene también por objetivo proporcionar una técnica de obtención de extractos activos a partir de la soja que sea de concepción sencilla y fácil de realizar.

Estos objetivos, así como otros que podrían aparecer como consecuencia, se alcanzan gracias a la invención que tiene por objeto un procedimiento de obtención de al menos un extracto activo rico en maninotriosa y en melibiosa a partir de semillas de soja, que comprende al menos una etapa de extracción de zumo de soja, una etapa de obtención de un permeato por ultrafiltración de dicho zumo de soja, preferiblemente una etapa de concentración de dicho permeato, de forma ventajosa por ósmosis inversa y/o evaporación a vacío, estando el permeato así obtenido esencialmente exento de lípidos y proteínas, y al menos una etapa de hidrólisis de dicho permeato mediante fermentación realizada con ayuda de al menos una levadura de pan en ausencia de todo fermento láctico, en el curso de cuya etapa se efectúa una hidrólisis enzimática de los azúcares que resultan de la actividad invertasa de dicha levadura de pan y a partir de la cual se obtiene dicho extracto activo.

Así, se realiza una fermentación particularmente eficaz por la acción de al menos una levadura de pan.

En efecto, estas levaduras tienen una fuerte actividad invertasa (β -fructofuranosidasa) y están desprovistas de actividad melibiosa (α -galactosidasa). Ahora bien, la invertasa, mayoritariamente exocelular, corta la unión glucosa-fructosa β 1-2 para liberar la fructosa terminal. También, la alfa-galactosidasa específica de las uniones α que hace intervenir un residuo galactosa, su ausencia permite recuperar al final de la fermentación un extracto rico en melibiosa y maninotriosa, procedentes respectivamente de la transformación de la rafinosa y de la estaquiosa.

Según una solución preferida, dicha levadura de pan es *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo la comercializada por la sociedad Lesaffre bajo la denominación « SAFINSTANT ».

Estas levaduras presentan una cepa en fermentación alta que se revela particularmente competitiva en el contexto de la invención, siendo particularmente fuerte su actividad invertasa (cuyo interés ha sido mencionado precedentemente).

Preferiblemente, dicha etapa de ultrafiltración se lleva a cabo gracias al menos a una membrana de ultrafiltración que presenta un umbral de corte comprendido entre 5000 y 50000 dalton, preferiblemente entre 5000 y 10000 dalton.

Según una solución ventajosa, dicha etapa de hidrólisis mediante fermentación se realiza durante un tiempo de al menos 2 horas, siendo este tiempo preferiblemente de aproximadamente 2,5 horas.

De forma ventajosa, el procedimiento comprende una etapa de deshidratación (por ejemplo por atomización o liofilización) de dicho o dichos extractos activos.

Así, dicho extracto deshidratado presenta un contenido en oligosacáridos con galactosa terminal, de forma ventajosa, de al menos 40 % en peso.

Preferiblemente, el procedimiento comprende al menos una etapa de desalinización de dicho o dichos extractos activos, realizada preferiblemente con ayuda de una resina intercambiadora de iones.

Los extractos obtenidos pueden presentar una tasa elevada de cenizas. La etapa de desalinización permite entonces retener los aniones y los cationes y tiene el efecto de disminuir fuertemente la tasa de minerales y parcialmente la de materia nitrogenada total (MNT) y la de isoflavonas. Esta etapa permite también aumentar la tasa de oligosacáridos con galactosa terminal, que se puede situar entonces hasta aproximadamente el 85 % del extracto seco, representado en su mayor parte por maninotriosa (aproximadamente el 90 % de este 85 %) y melibiosa (aproximadamente 10 % de este 85 %).

De forma ventajosa, el procedimiento comprende una etapa de adición de sílice alimentaria a dicho o dichos extractos activos. Esta adición se revela como ventajosa en el contexto de la invención, siendo muy higroscópico el producto desalado y liofilizado.

La invención se refiere también a la utilización de un extracto activo obtenido por un procedimiento tal como el descrito precedentemente, para la fabricación de una composición nutracéutica con propiedades anti-oxidantes.

La invención se refiere también a la utilización de un extracto activo obtenido por un procedimiento tal como el descrito precedentemente, para la fabricación de una composición nutracéutica con propiedades anti-inflamatorias.

La invención se refiere también a la utilización de un extracto activo obtenido por un procedimiento tal como el descrito precedentemente, para la fabricación de una composición nutracéutica con propiedad anti-elastasa.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán más claramente con la lectura de la siguiente descripción de un modo de realización preferencial de la invención, dado a título de ejemplo ilustrativo y no limitativo, así como de los ensayos realizados, con referencia a los dibujos adjuntos, entre los cuales:

- la figura 1 es una representación en forma sinóptica de un procedimiento según la invención;
- la figura 2 es un diagrama que ilustra el efecto dosis de un producto fermentado de soja (PFS) sobre las formas reactivas de oxígeno (FRO) producidas por los polinucleares neutrófilos (PN) en reposo;
- la figura 3 es un diagrama que ilustra el efecto dosis de un producto fermentado de soja (PFS) sobre las formas reactivas de oxígeno (FRO) producidas por los polinucleares neutrófilos (PN) estimulados por PMA (forbol miristato acetato);
- la figura 4 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la producción del anión superóxido;
- la figura 5 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la desgranulación de los PN;
- la figura 6 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la producción de O₂-basal;

- la figura 7 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la producción de O₂ bajo PMA;
 - la figura 8 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la mieloperoxidasa de los PN estimulados por PMA;
 - la figura 9 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la elastasa de cerdo;
- 5 - la figura 10 es un diagrama que ilustra el efecto del PFS sobre la elastasa de los PN estimulados por PMA.

En referencia a la figura 1, se someten las semillas de soja a una sucesión de etapas (despeliculado, dilución, cocción, extracción, ultrafiltración del zumo extraído) con el fin de obtener un permeato. Este permeato se concentra preferiblemente mediante ósmosis inversa y/o evaporación a vacío. Este permeato de soja forma un sustrato de partida.

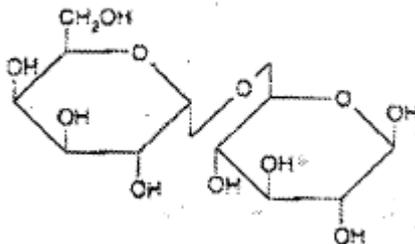
10 Este permeato de soja está compuesto en gran parte de azúcares:

- sacarosa [α -D-glucosa-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructosa],
- rafinosa [α -D-galactosa-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosa-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructosa],
- estaquiosa [α -D-galactosa-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactosa-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosa- (1 \rightarrow 2)- β -D-fructosa].

15 Estos tres azúcares tienen una galactosa en posición terminal no reductora, y un extremo de fructosa unido a glucosa en β 1-2.

Con el fin de eliminar el residuo de fructosa sin tocar al residuo de galactosa para obtener la melibiosa y la maninotriosa, se realiza una hidrólisis mediante fermentación gracias al menos a una levadura de pan, en ausencia de todo fermento láctico.

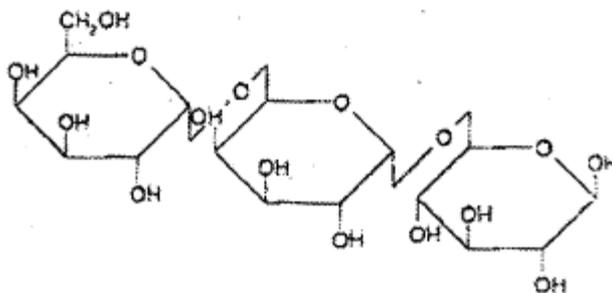
20 Las enzimas liberadas en el medio por los micro-organismos van a permitir cortar la unión β 1-2 entre la glucosa y la fructosa (1).



Melibiosa

(α -D-galactosa-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosa)

(α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosa)



Maninotriosa

(α -D-galactosa-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactosa-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosa)

(α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosa)

25

Preferiblemente, la levadura de pan utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*.

30 En las condiciones puestas a punto en el laboratorio, la concentración máxima en melibiosa y maninotriosa se alcanza en 2 horas de fermentación. La duración óptima de la fermentación se ha fijado en 2,5 horas. La

concentración en α -galactósidos de interés es entonces de 45 g por 100 g de extracto seco, en su mayor parte representados por maninotriosa (90 %) y melibiosa (10 %).

El producto obtenido se liofiliza. Contiene una tasa elevada de cenizas, se realiza por tanto una desalinización gracias a una resina mixta intercambiadora de iones AX-X8 (Biorad, marca depositada).

5 Se añade a continuación sílice alimentaria, a una altura de 0,2 a 2 % en peso: preferiblemente a una altura de 1 % en peso, al producto desalado y atomizado.

El producto fermentado de soja (PFS) ha sido ensayado con el fin de poner en evidencia sus propiedades anti-oxidantes, anti- inflamatorias, anti-elastasa.

10 El producto ensayado se presenta bajo la forma de polvo hidrosoluble. Tiene al menos cuatro moléculas activas: genisteína, daidzeína, maninotriosa y melibiosa.

Se buscó una concentración eficaz tomando como referencia la molécula de genisteína de PM = 270.

Se disolvió el producto en una solución tampón PBS para obtener una solución de trabajo que corresponde a una concentración 1,05 milimolar (en equivalente de genisteína), a partir de la cual las diluciones permiten ensayar concentraciones en el medio final que van de 1 μ M a 10 μ M.

15 1- Efecto del PFS sobre la producción de formas reactivas de oxígeno (FRO) por los polinucleares neutrófilos (PN) humanos:

Los PN (Polinucleares neutrófilos) se aíslan de la sangre total por la técnica de aislamiento clásica basada en la sedimentación de Dextran/Ficoll.

20 La medida de la producción de las FRO se realiza por la técnica de quimioluminiscencia amplificada con luminol utilizando 500.000 PN por ensayo. Se preincuban los PN en presencia o ausencia del producto a 37 °C durante 10 minutos, y se cuantifica la producción de FRO gracias a un luminómetro (Berthold 953). Se midieron la producción basal y la producción después de estimulación por un agonista (el PMA).

25 Los resultados se presentan en las figuras 2 y 3: el PFS disminuye significativamente la quimioluminiscencia inducida por PMA de $8,9 \times 10^7$ cpm (PN control) frente a $2,2 \times 10^7$, $1,8 \times 10^6$ y $1,6 \times 10^6$ (para los PN tratados por PFS 0,1 μ M, 2 μ M y 5 μ M respectivamente).

2- Efecto del PFS sobre la producción del anión superóxido por los polinucleares neutrófilos (PN) humanos:

La estimulación de los PN por el PMA activa la NADPH-oxidasa, la enzima responsable de la producción del anión superóxido en el origen de las otras FRO.

30 La cinética de esta activación se mide por la técnica de reducción del Citocromo C por el anión O_2^- , registrada gracias a la variación de absorción a 550 nm. Una unidad de DO corresponde a 1 nanomol de O_2^- producido por minuto.

Los resultados del efecto del PFS sobre la producción del anión superóxido se representan en la figura 4.

$\Delta DO = 0,02$ para los PN no tratados, frente a $\Delta DO = 0,017$, y $\Delta DO = 0,013$ para los PN tratados por el PFS 5 μ M y 10 μ M respectivamente.

35 La producción de O_2^- se midió por la quimioluminiscencia de la Lucigenina sobre los PN en reposo y después de estimulación por el PMA. El PFS disminuye también esta producción tanto en el estado basal (figura 6) como después de estimulación por el PMA (figura 7) a las concentraciones 2 y 5 μ M.

3- Efecto del PFS sobre la desgranulación de los PN:

40 Los PN aislados se incubaron en presencia de PFS a 30 °C durante 10 min y después se estimularon por el PMA para inducir una desgranulación y una liberación del contenido de los gránulos en el sobrenadante.

La actividad de lisozima (presente en los diferentes tipos de gránulos) se midió utilizando *micrococcus lysodecticus* como sustrato y registrando su degradación a 450 nm.

Los resultados muestran que el PFS no tiene efecto significativo sobre la desgranulación de los PN estimulados por el PMA (figura 5).

45 4- Efecto del PFS sobre la actividad mieloperoxidasa de los PN:

La mieloperoxidasa, situada en los gránulos azurófilos de los PN, es una enzima clave del metabolismo oxidativo y de la reacción inflamatoria. Utiliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato para producir el ácido hipocloroso (HOCl) altamente tóxico.

Se determinó la actividad mieloperoxidasa de los PN en el sobrenadante de los PN estimulados por el PMA utilizando la técnica de oxidación de la ortodianizidina.

Los resultados muestran que el PFS inhibe esta actividad a la concentración 5 μM y la anula completamente a la concentración 10 μM (figura 8).

5 5- El efecto del PFS sobre la actividad Elastasa de los PN:

La elastasa es una proteasa situada en los gránulos azurófilos de los PN; desempeña un papel en la reacción inflamatoria y en la lucha anti-infecciosa. Se determina su actividad en el sobrenadante de los PN estimulados por el PMA utilizando un sustrato específico y siguiendo su degradación a 340 nm.

10 Los resultados muestran que el PFS inhibe fuertemente y de forma dependiente de la dosis, la actividad elastasa de los neutrófilos (figuras 9 y 10).

6. Confirmación de las propiedades inflamatorias

15 Se estudió igualmente el efecto del PFS sobre la secreción de moléculas más específicas de la inflamación, a saber las citocinas ($\text{TNF}\alpha$). Para hacer esto, se realizaron valoraciones de citocina en los sobrenadantes de las células (monocitos, macrófagos y polinucleares). Los resultados de estas valoraciones han demostrado una inhibición de $\text{TNF}\alpha$ por el PFS.

Conclusiones

El conjunto de estos resultados demuestra que el PFS inhibe la actividad de la NADPH-oxidasa y en consecuencia la producción de las FRO y del anión superóxido.

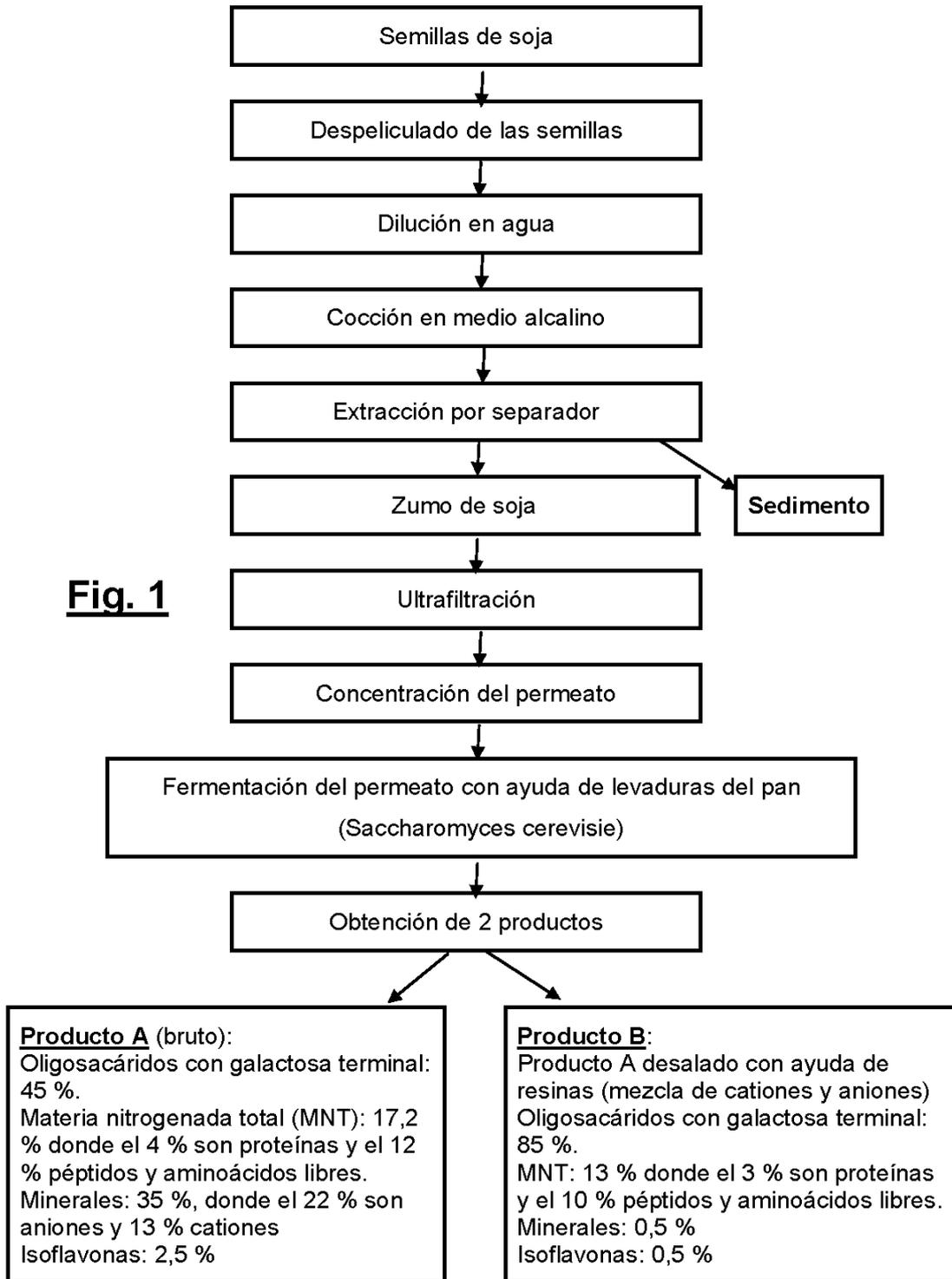
Además, el PFS disminuye la actividad de la mieloperoxidasa y de la elastasa de los neutrófilos.

20 Todas estas enzimas están implicadas, a la vez en la defensa del organismo contra los agentes patógenos, pero también en la reacción inflamatoria inducida por múltiples factores.

Estos resultados demuestran que el PFS es un poderoso antioxidante y susceptible de presentar un poder anti-inflamatorio y que presenta una actividad anti-elastasa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de obtención de al menos un extracto activo rico en maninotriosa y en melibiosa a partir de semillas de soja, que comprende al menos una etapa de extracción de zumo de soja, una etapa de obtención de un permeato por ultrafiltración de dicho zumo de soja, estando el permeato así obtenido esencialmente exento de lípidos y proteínas, y al menos una etapa de hidrólisis de dicho permeato mediante fermentación realizada con ayuda de al menos una levadura de pan en ausencia de todo fermento láctico, en el curso de cuya etapa se efectúa una hidrólisis enzimática de los azúcares que resultan de la actividad invertasa de dicha levadura de pan y a partir de la cual se obtiene dicho extracto activo.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa de concentración de dicho permeato por ósmosis inversa y/o evaporación a vacío.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicha levadura de pan es *Saccharomyces cerevisae*.
4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha etapa de hidrólisis mediante fermentación, se realiza durante un tiempo de al menos 2 horas.
- 15 5. El procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha etapa de hidrólisis mediante fermentación, se realiza durante un tiempo de aproximadamente 2,5 horas.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicha etapa de ultrafiltración se lleva a cabo gracias al menos a una membrana de ultrafiltración que presenta un umbral de corte comprendido entre 5000 y 50000 dalton, preferiblemente entre 5000 y 10000 dalton.
- 20 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende una etapa de deshidratación de dicho extracto activo.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho extracto deshidratado presenta un contenido en oligosacárido con galactosa terminal de al menos 40 % en peso.
- 25 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende al menos una etapa de desalinización de dicho extracto activo.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha etapa de desalinización se realiza con ayuda de una resina intercambiadora de iones.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende una etapa de adición de sílice alimentaria a dicho extracto activo.
- 30 12. La utilización de un extracto activo obtenido por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de una composición nutracéutica con propiedades anti-oxidantes.
13. La utilización de un extracto activo obtenido por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de una composición nutracéutica con propiedades anti-inflamatorias.
- 35 14. La utilización de un extracto activo obtenido por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de una composición nutracéutica con propiedad anti-elastasa.



Efecto dosis de PFS sobre FRO producidas por PN en reposo

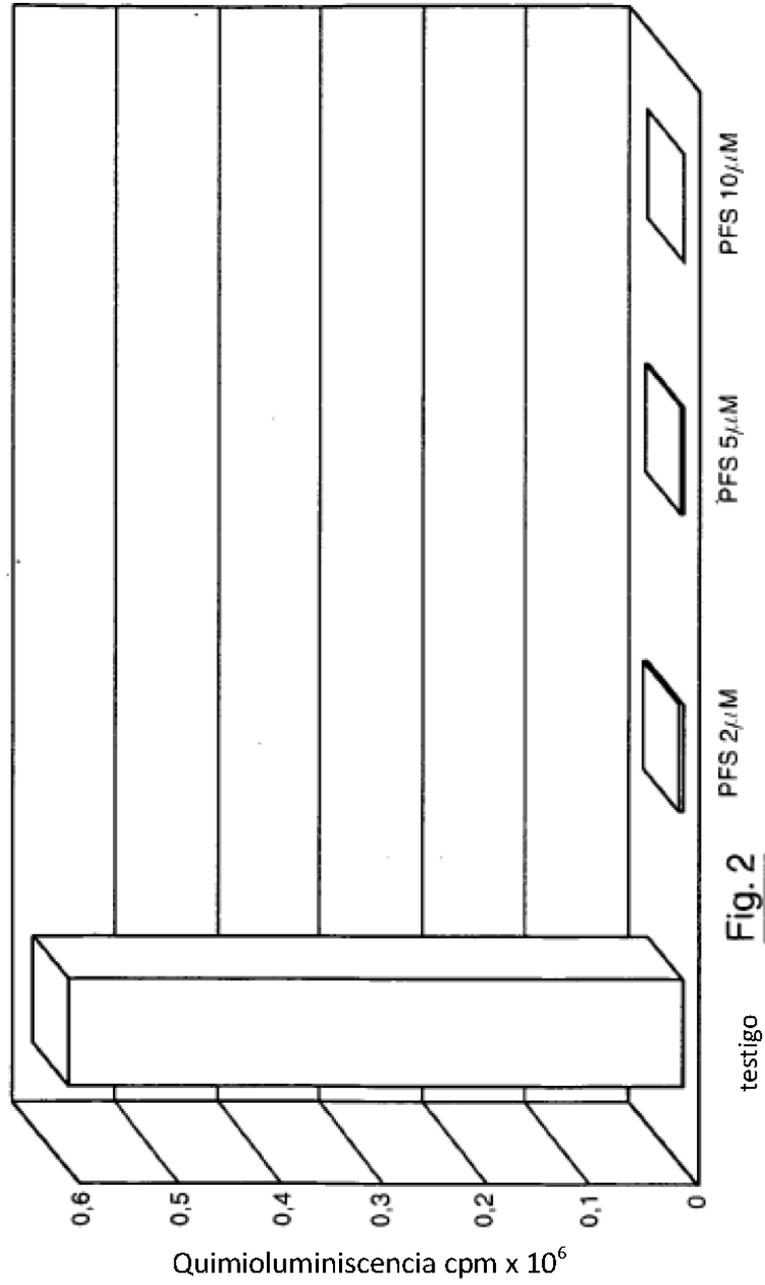


Fig. 2

Efecto dosis de PFS sobre FRO producidas por PN en reposo

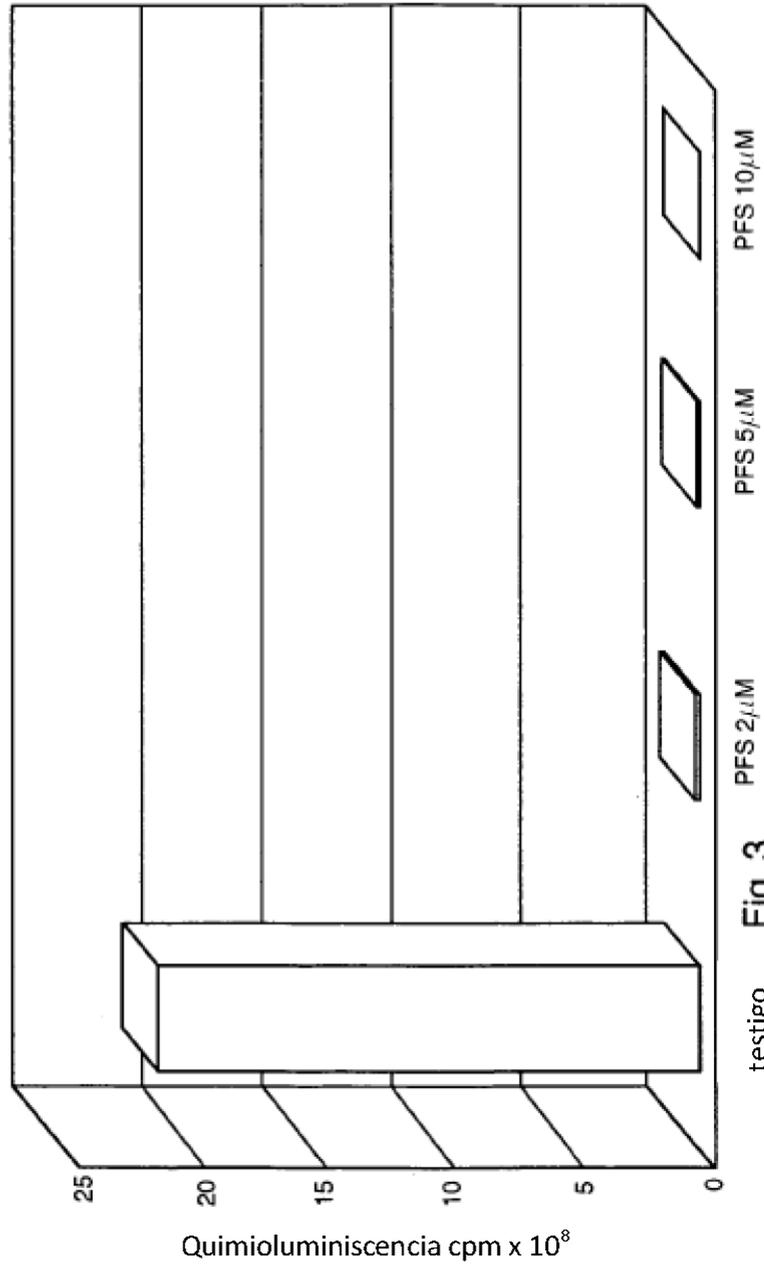
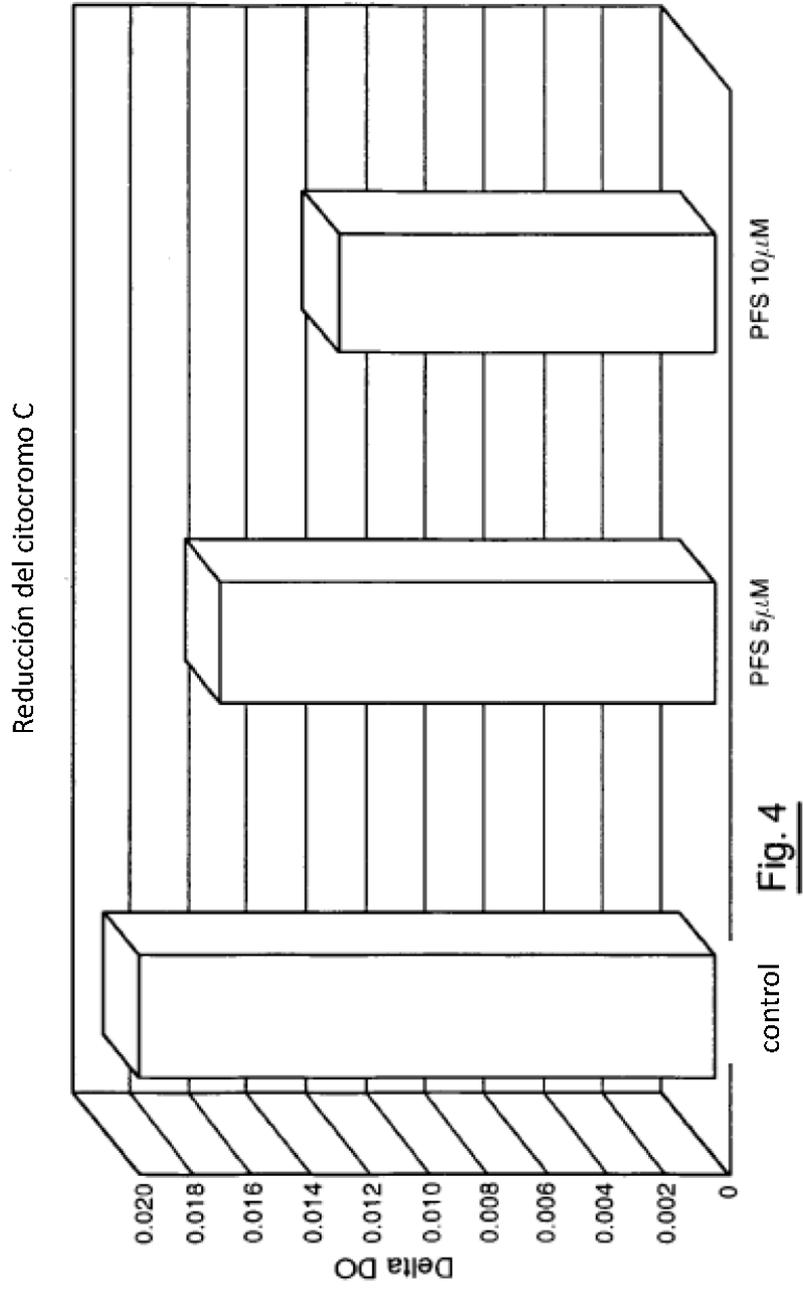


Fig. 3



Efecto de PFS sobre la desgranulación de los PN

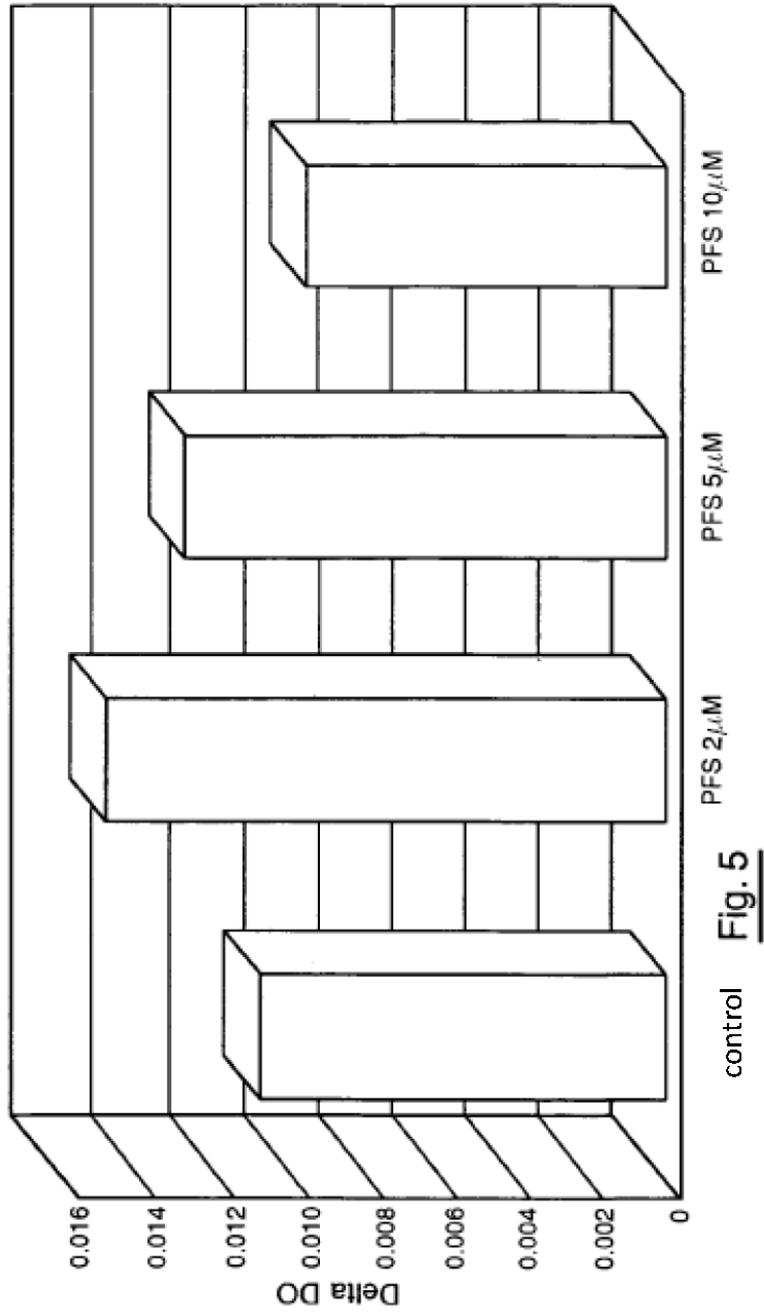


Fig. 5

Efecto de PFS sobre la producción de O₂ - basal

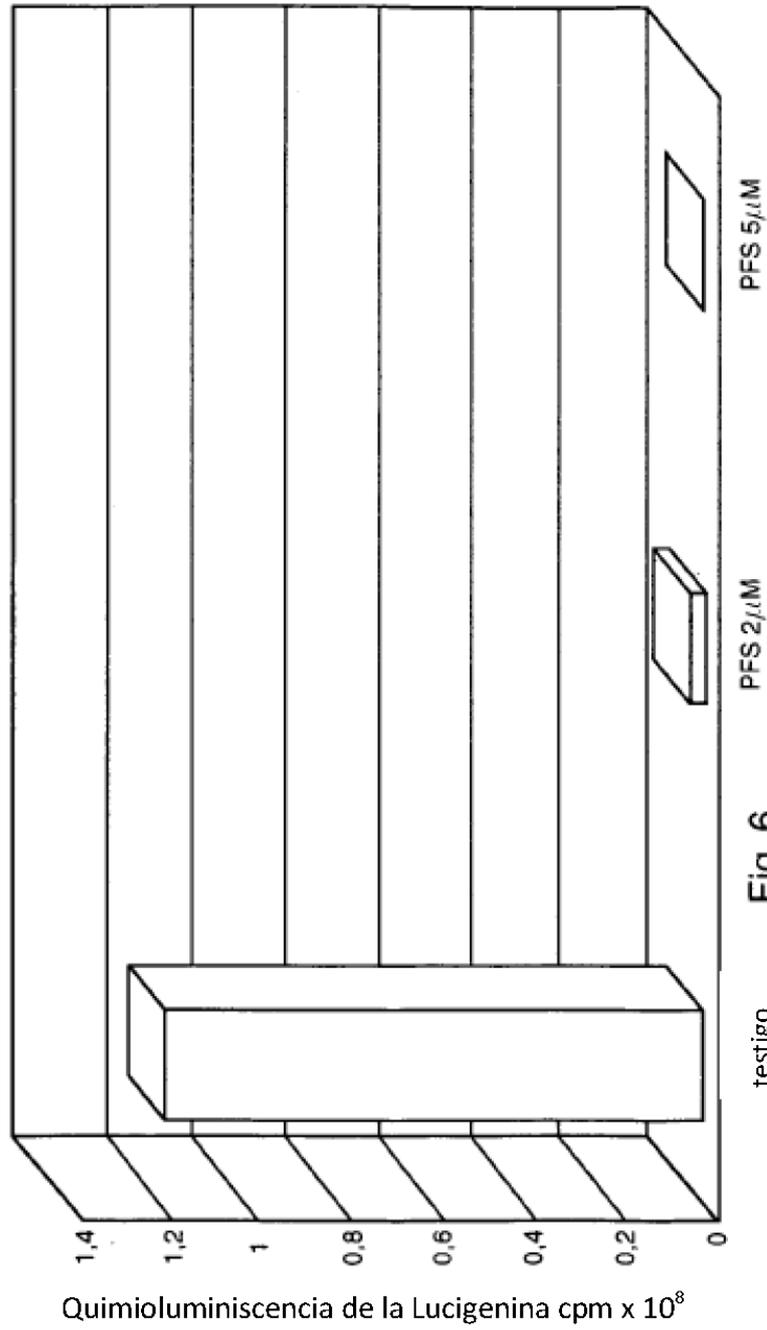
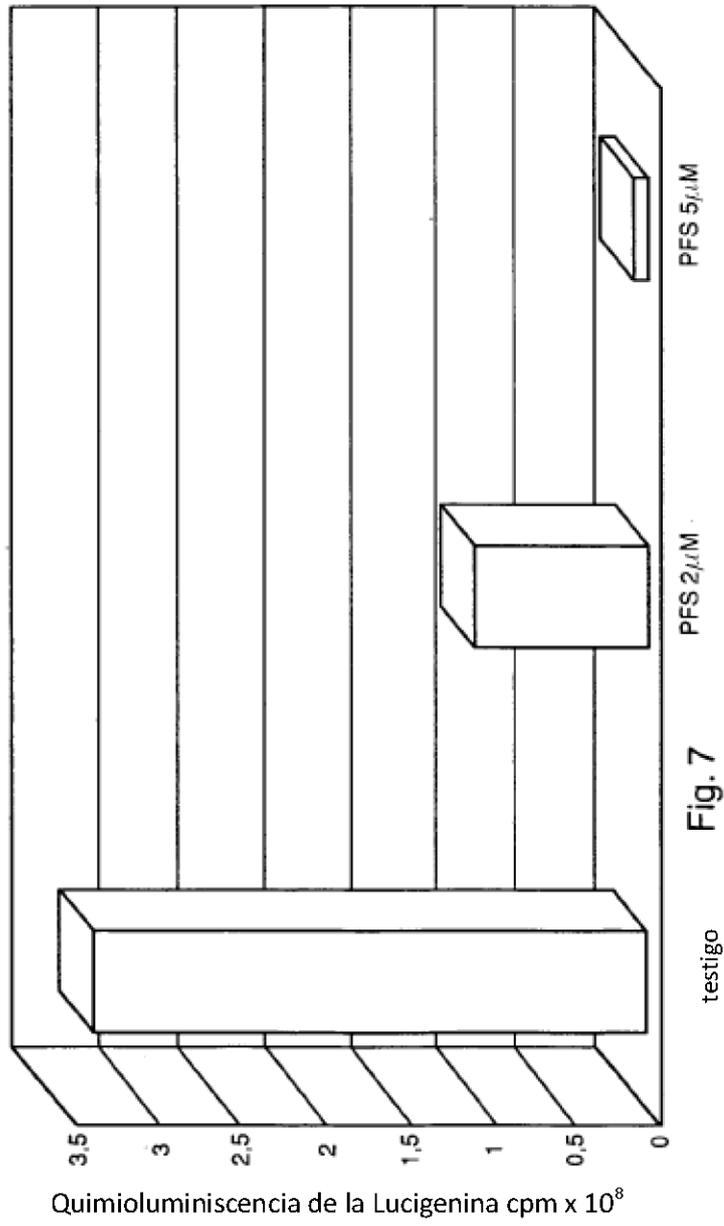
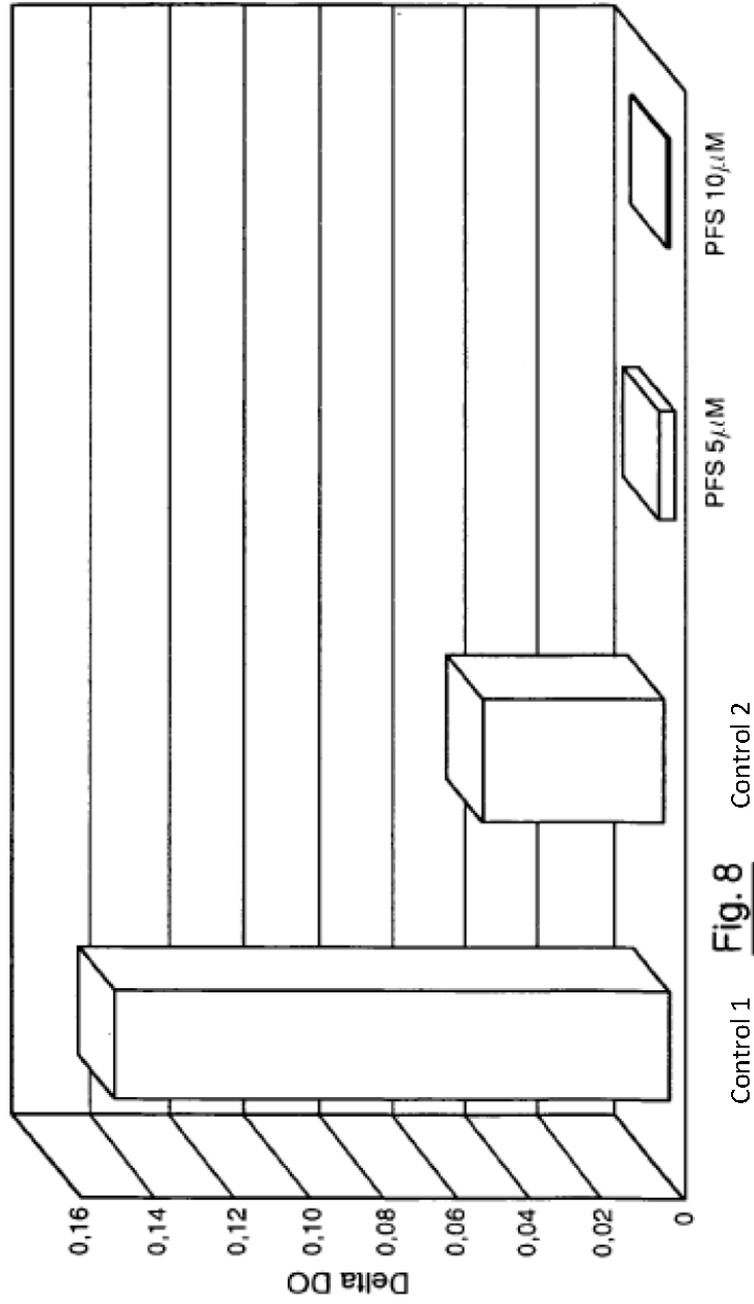


Fig. 6

Efecto de PFS sobre la producción de O₂ – bajo PMA



Efecto de PFS sobre la mieloperoxidasa de los PN estimulados por PMA



Control 1 Control 2 PFS 5 μM PFS 10 μM **Fig. 8**

Efecto de PFS sobre la elastasa de cerdo

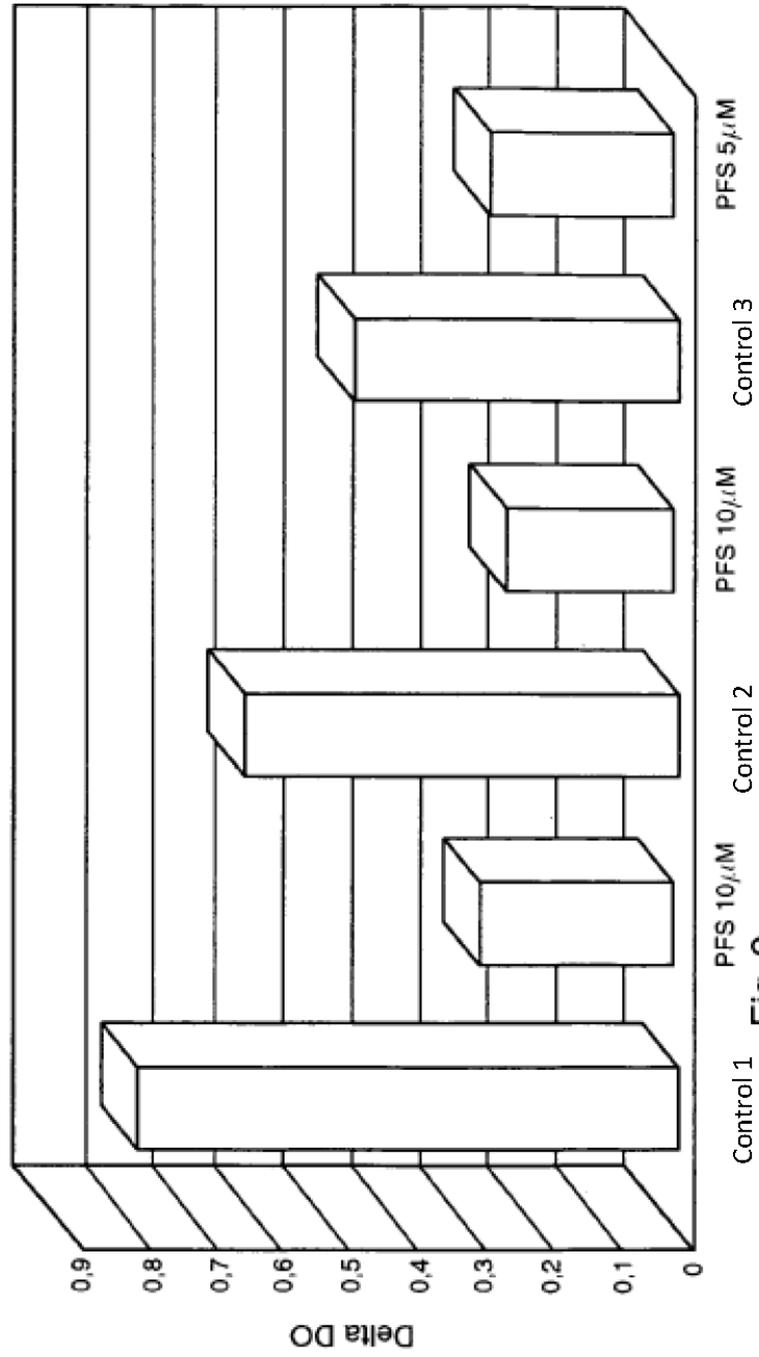


Fig. 9

Efecto de PFS sobre la elastasa de los PN estimulados por PMA

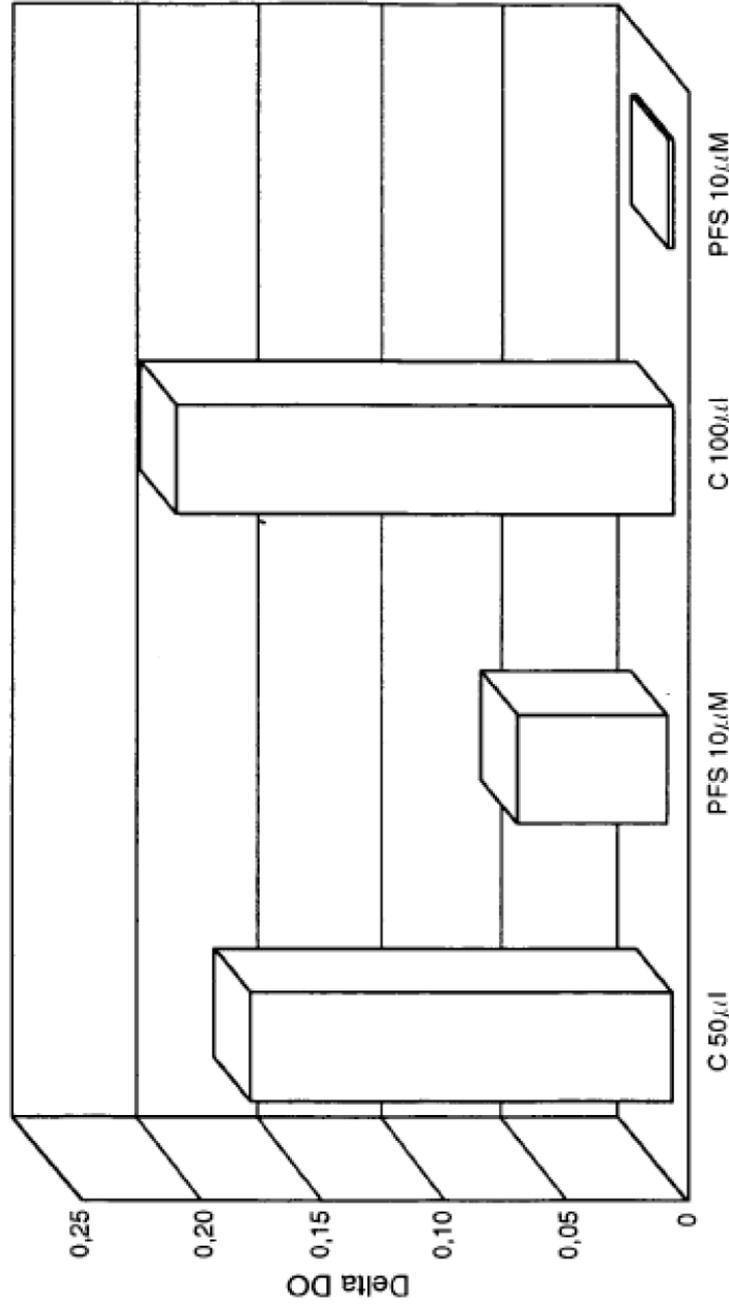


Fig. 10