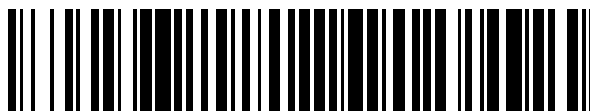


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 481**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/20 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 15/12 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A23C 11/10 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2004 E 04746953 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1649760**

54 Título: **Composición que contiene una bacteria del ácido láctico que produce ecuoI**

30 Prioridad:

30.06.2003 JP 2003187831

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.08.2013

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, KANDATSUKASA-CHO 2-CHOME
CHIYODA-KU, TOKYO 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**UCHIYAMA, SHIGETO;
UENO, TOMOMI y
SUZUKI, TOSHIMI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 417 481 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

Composición que contiene una bacteria del ácido láctico que produce ecuol.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana productora de ecuol, a una composición que comprende dicha cepa bacteriana, y a un método de producción de ecuol mediante la utilización de dicha cepa bacteriana.

10 **Antecedentes de la invención**

Hasta el momento se ha informado principalmente en Europa y en los Estados Unidos de que la isoflavona (isoflavona de soja) contenida en las semillas de soja presenta propiedades profilácticas (efecto antiestrógeno) en el cáncer de mama, el carcinoma de próstata y otras enfermedades, y que presenta propiedades de alivio (efecto de tipo estrogénico) en la osteoporosis climaterica y posmenopáusica, la hiperlipidemia, la hipertensión, etc. (H. Adlercreutz *et al.*, Lancet 339:1233, 1992; H. Adlercreutz *et al.*, Lancet 342:1209-1210, 1992; D.D. Baird *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 80:1685-1690, 1995; A.L. Murkies *et al.*, Maturitas 21:198-195, 1995; y D. Agnusdei *et al.*, Bone and Mineral 19(supl.):S43-S48, 1995).

Sin embargo, recientemente se ha puesto en duda la eficacia clínica de la isoflavona de soja y, por el contrario, se ha informado de que el ecuol como metabolito activo de la isoflavona de soja es un factor clave en las propiedades esperadas en la aplicación clínica. De esta manera, se dispone de varios informes que argumentan que en el cáncer de mama, el carcinoma de próstata y la osteoporosis climaterica y posmenopáusica, la eficacia de la isoflavona de soja resulta superada por la del ecuol, el metabolito de la isoflavona de soja (D. Ingram *et al.*, Lancet 350:990-994, 1997; A.M. Duncan *et al.*, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 9:581-586, 2000; C. Atkinson *et al.*, J. Nutr. 32(3):595S, 2002; H. Akaza *et al.*, Jpn. J. Clin. Oncol. 32(8):296-300, 2002, y S. Uchiyama *et al.*, Ann. Nutr. Metab. 45:113(abs), 2001).

Además, se presentaron muchas ponencias sobre el tema del ecuol en el IV Simposio Internacional sobre el papel de la soja en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas (San Diego, USA, 2001), y en diciembre de 2002 también se publicó una revisión completa de los estudios realizados sobre el ecuol. De esta manera, se acepta cada vez más en círculos académicos que el ecuol es la entidad real responsable de las propiedades de la isoflavona de soja (K.D.R. Settle *et al.*, J. Nutr. 132:3577-3584, 2002).

Además, en comparación con la isoflavona de soja, el ecuol se libera en tejidos tales como el tejido mamario y el tejido prostático con una eficiencia mucho mayor y este hecho respalda la significancia fisiológica del ecuol (J. Maubach *et al.*, J. Chromatography B. 784:137-144, 2003; T.E. Hedlund *et al.*, The Prostate 154:68-78, 2003).

El ecuol es producido por la flora intestinal y se ha informado de que existen diferencias individuales en su producción. También se ha publicado que aproximadamente 50% de los japoneses son productores de ecuol (S. Uchiyama *et al.*, Ann. Nutr. Metab. 45:113(abs), 2001). Se cree que los individuos que no pueden producir ecuol no presentan bacterias productoras de ecuol en su intestino. En estos individuos se sospecha que los efectos antiestrógeno y de tipo estrogénico esperados podrían no producirse aunque se ingiriesen alimentos de soja procesados. Con el fin de que se puedan expresar los efectos esperados en estos individuos, aparentemente es un curso razonable de acción que ingieran bacterias productoras de ecuol o ecuol mismo.

Basándose en la idea anteriormente indicada, se llevaron a cabo investigaciones intensivas y aislaron a partir de heces humanas 3 nuevas cepas de microorganismos y las identificaron: *Bacterioides* E-23-15 (nº FERM BP-6435), *Streptococcus* E-23-17 (nº FERM BP-6436) y *Streptococcus* A6G225 (nº FERM BP-6437), como bacterias productoras de ecuol adecuadas para la expresión de dichos efectos antiestrógeno y de tipo estrogénico, entre otros efectos, y solicitaron una patente que reivindicaba invenciones referentes a dichas cepas de microorganismos productoras de ecuol y a la utilización de los microorganismos (documento WO nº 99/07392).

55 **Exposición de la invención**

Se llevaron a cabo estudios adicionales y pudieron aislar y caracterizar una cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactococcus* que puede utilizar el glucósido daidzeína, daidzeína o dihidrodaidzeína para producir ecuol, como nueva cepa de microorganismo que es fundamentalmente diferente de los microorganismos aislados e identificados con anterioridad. La presente invención se ha desarrollado basándose en el aislamiento y la identificación anteriormente indicados de esta nueva cepa de bacteria del ácido láctico.

La presente invención presenta las invenciones siguientes, resumidas en los párrafos 1 a 13.

Ítem 1. Composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecuol, como componente esencial de la misma, una cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente a la especie *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad de utilizar por lo menos un compuesto de daidzeína seleccionado de entre el grupo que consiste en

glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína para producir ecuol.

Ítem 2. Composición según el ítem 1, en la que dicha cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente a *Lactococcus* es *Lactococcus* 20-92 depositada con el nº FERM BP-10036.

Ítem 3. Composición según el ítem 1, que comprende además por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en compuestos de daidzeína e ingredientes que contienen compuesto de daidzeína.

Ítem 4. Composición según el ítem 3, en la que el ingrediente que contiene compuesto de daidzeína es harina de soja o leche de soja.

Ítem 5. Composición según el ítem 3, que se encuentra en forma de una bebida o de un producto lácteo.

Ítem 6. Composición según el ítem 3, que comprende además ecuol.

Ítem 7. Composición según el ítem 6, que se encuentra en forma de un producto de fermentación de leche de soja.

Ítem 8. Método para producir ecuol que comprende la etapa de dejar que una cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente a la especie *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad de utilizar un compuesto de daidzeína para producir ecuol, actúe sobre por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en compuestos de daidzeína e ingredientes que contienen compuesto de daidzeína.

Ítem 9. Método según el ítem 8, en el que dicha cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactococcus* es *Lactococcus* 20-92, depositada con el nº FERM BP-10036.

Ítem 10. Método según el ítem 8, en el que el ingrediente que contiene compuesto de daidzeína es harina de soja o leche de soja.

Ítem 11. Cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente a la especie *Lactococcus garvieae* depositada con el nº FERM BP-10036.

La composición que contiene una bacteria del ácido láctico productora de ecuol de la invención se describe en detalle a continuación.

(1) Cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactococcus*

La composición que contiene una bacteria del ácido láctico productora de ecuol de la invención comprende, como componente esencial de la misma, una cepa de bacteria del ácido láctico perteneciente a la especie *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad (actividad metabólica) de utilizar por lo menos un compuesto de daidzeína seleccionado de entre el grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína y producir de esta manera ecuol.

Un ejemplo específico de dicha cepa de bacteria del ácido láctico es *Lactococcus* 20-92 (nº FERM BP-10036), se ha aislado a partir de heces humanas y que han identificado *de novo*.

Las características bacteriológicas de la cepa de bacteria del ácido láctico se describen en detalle a continuación.

I. Estado de crecimiento en el medio

Dicha cepa muestra un crecimiento bueno o normal en agar EG (Eggerth-Gagnon), agar BL (sangre-hígado) y GAM (medio anaeróbico Gifu) al cultivarla anaeróbicamente en un frasco anaeróbico con lana de acero a 37°C durante 48 horas o al cultivarla aeróbicamente a 37°C durante 48 horas. La morfología de las colonias es elevada de manera circular o convexa, siendo lisos la superficie y borde perimetral, y adopta un color gris-blanco sobre agar EG y un color pardo-marrón sobre agar BL. Morfológicamente es un diplococcus Gram-positivo. Esta cepa no es esporogénica.

II. Características bioquímicas

(1) Temperatura de crecimiento óptima: 37°C

(2) pH óptimo de crecimiento: 7,0

(3) Licuefacción de la gelatina: -

(4) Producción de acetoina a partir de ácido pirúvico: +

(5) Hidrólisis de ácido hipúrico: -

(6) Hidrólisis de esculina: +

(7) Pirrolidonil-arilamidasa: +

(8) α-Galactosidasa: -

- (9) β -Galactosidasa: -
 (10) β -Glucuronidasa: -
 (11) Fosfatasa alcalina: -
 (12) Leucina arilamidasa: +
 (13) Arginina dihidrasa: +
 (14) Asimilación de fuentes de carbono:
 D-Ribosa +
 L-Arabinosa -
 D-Manitol +
 D-Sorbitol -
 Lactosa -
 D-Trehalosa +
 Inulina -
 D-Rafinosa -
 Almidón +
 Glucógeno -

(15) Composición de ácidos orgánicos tras la utilización de peptona o glucosa.

- 10 Mediante la utilización de medio PYF (peptona-extracto de levadura-Fields) (contenido de peptona: aproximadamente 5%) como medio de utilización de azúcar y medio PYF suplementado con glucosa a una concentración final de 0,5%, la cepa de la invención se cultivó aeróbicamente a 37°C durante 72 horas y los ácidos orgánicos en los cultivos se sometieron a ensayo mediante HPLC. Se presentan los resultados (unidad: mM) a continuación, en la Tabla 1.

15

Tabla 1

Ácido orgánico	Peptona	Glucosa
Ácido maleico	nd	nd
Ácido succínico	0,00	0,01
Ácido láctico	3,33	27,35
Ácido fórmico	1,13	0,88
Ácido acético	3,32	0,57
Ácido piroglutámico	0,12	0,25
Ácido propiónico	nd	nd
Ácido i-butírico	nd	nd
Ácido n-butírico	nd	nd
Ácido i-valérico	nd	nd
Ácido n-valérico	nd	nd

nd=no detectado

- 20 A partir de las características de cultivo y bioquímicas anteriormente indicadas, la cepa de la invención se clasifica como *Lactococcus garvieae* que es un coco Gram-positivo pero que es diferente de su cepa tipo (Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz R., Collins M.D. y Fischer W., Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6:183-195, 1985; ATCC n° 43921 (JCM n° 10343) y ATCC n° 49156 (JCM n° 8735)).

- 25 Por lo tanto, se denominó a esta cepa, *Lactococcus* 20-92 y la depositaron en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology International Patent Organism Depository, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón, el 23 de enero de 2003, bajo el número de acceso FERM P-19189. Este microorganismo ahora es un depósito bajo el Tratado de Budapest y el número de acceso es FERM BP-10036.

Se encontró que dicha cepa asimilaba la glucosa y después elaboraba ácido láctico (ácido L-láctico), verificando que pertenece al grupo de bacterias del ácido láctico homofermentativas.

- 35 Además, la secuenciación del ARNr 16s de dicha cepa reveló una homología de 99,189% con la cepa tipo *Lactococcus garvieae* (JCM10343) y una homología de 99,375% con *Enterococcus seriolicida*, JCM8735).

- De manera incidental, debido a que *Enterococcus seriolicida*, a la que se ha hecho referencia anteriormente, era similar a *Lactococcus garvieae* en el análisis de homología ADN-ADN, se reclasificó en *Lactococcus garvieae* en 1996. Por lo tanto, *Lactococcus garvieae* presenta dos cepas tipo (la cepa JCM8753 y la cepa 10343) que presentan un origen diferente. *Enterococcus seriolicida* (JCM8735) se derivó de riñones de jurel de cola amarilla infectados y el *Lactococcus garvieae* intrínseco (JCM10343) se derivó a partir de mastitis bovina.

40

Con el fin de explorar la homología relativa de *Lactococcus* 20-92 respecto a las dos cepas tipo anteriormente indicadas, se llevó a cabo una comparación fenotípica. Se presentan los resultados en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Características	Cepa de la invención	JCM10343	JCM8735
Desaminación (Arg → NH ₃)	±	±	±
Dependencia de la temperatura del crecimiento			
10°C	+	+	+
15°C	+	+	+
30°C	+	+	+
37°C	+	+	+
40°C	+	+	-
45°C	-	-	-
Dependencia del pH del crecimiento			
pH 4,5	±	±	±
pH 7,5	+	+	+
pH 9,6	+	+	+
Tolerancia salina (NaCl)			
6,5	+	+	+
Peptidoglicano	Lys-Ala-Gly	Lys-Ala-Gly	Lys-Ala-Gly
Tipo de quinona	MK-8,9	MK-8,9	Sin quinona

MK indica menaquinona

Resultará evidente a partir de la Tabla 2 que la presente cepa *Lactococcus* 20-92 concuerda en fenotipo con la cepa tipo (JCM10343) de *Lactococcus garvieae* pero que es diferente de la cepa tipo (JCM8735) de *Enterococcus seriolicida* en su comportamiento de crecimiento a 40°C y en la producción o no producción de quinona. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se consideró que la presente cepa era afín a *Lactococcus garvieae* (JCM10343).

La presente cepa *Lactococcus* 20-92 puede clasificarse entre los lactococos cultivados en leche de la lista GRAS [acrónimo en inglés de "generalmente reconocido como seguro", de la FDA (Food and Drug Administration, USA)] y su seguridad como alimento se considera elevada.

Con respecto a *Lactococcus garvieae*, no existe ninguna publicación que sugiera su patogenicidad para el ser humano y tampoco produce sustancias virulentas, tales como toxinas, de manera que esta especie bacteriana se reconoce generalmente como una especie de seguridad elevada.

Además, *Lactococcus garvieae* hasta el momento ha sido detectado en queso mozzarella, leche cruda, productos cárnicos procesados almacenados a baja temperatura, plaa-som (un producto de pescado fermentado ampliamente consumido en Tailandia) y en queso Toma Piemontese, que es un queso italiano artesanal de denominación de origen protegida (DOP), es decir, queso tradicional en Italia, entre otros, y se informa de que dicho microorganismo se detecta con elevada incidencia, del orden de 10⁵ células/gramo, en plaa-som, y de 10⁸ células/gramo en queso Toma Piemontese, pero que este alimento presenta una larga historia de alimentación, lo que garantiza la seguridad de este organismo (P-M. Christine *et al.*, Int. J. Food Microbiol. 73:61-70, 2002; M.G. Fortina *et al.*, Food Microbiol. 20:379-404, 2003).

Por otra parte, se informa de que *Enterococcus seriolicida* es patógeno para peces cultivados tales como el medregal de Japón. Debido a que *Lactococcus* 20-92, que es, de esta manera, una cepa de *Lactococcus garvieae*, se considera filogenéticamente relacionado con *Enterococcus seriolicida*, existía la preocupación de su potencial patógeno para peces cultivados. Sin embargo, los estudios realizados comparando micrografías electrónicas de *Lactococcus* 20-92 y de la contrapartida patogénica (*Enterococcus seriolicida* KG) revelaron que, al contrario que dicha cepa patogénica, la cepa de la invención no presenta cápsula sobre la superficie celular. Por lo tanto, la cepa de la presente invención se considera que no presenta patogenicidad y que no supone ningún problema de contaminación ecológica. Esta conclusión también resulta corroborada en la descripción de la literatura siguiente. De esta manera, Yoshida *et al.* argumentan que la patogenicidad de las células microbianas para los peces cultivados se debe a que una cápsula presente sobre la superficie celular inhibe la fagocitosis por parte de los macrófagos, con el resultado de que las bacterias particulares no resultan eliminadas y se induce sistémicamente septicemia en los peces cultivados infectados por la bacteria (T. Yoshida *et al.*, Dis. Aquat. Org. 25:81-86, 1996).

Además, la cepa de la presente invención *Lactococcus* 20-92 retiene la capacidad (actividad) deseada de producción de ecul incluso en el caso de fermentación directa en la leche y presenta la característica de que, para

el mantenimiento de esta capacidad de producción de ecuol, no resulta necesaria ningún medio de cultivo especial. De esta manera, al llevar a cabo una fermentación en leche de soja utilizado por sí sola, la cepa utiliza compuestos de daidzeína en la leche de soja para elaborar ecuol.

- 5 Actualmente no existen informes de bacterias del ácido láctico del género *Lactococcus* que presenten dicha capacidad de producción de ecuol. Por lo tanto, la presente invención proporciona además una nueva cepa de bacteria del ácido láctico que presenta dicha capacidad de producción de ecuol.

(2) Compuestos de daidzeína e ingredientes que contienen compuestos de daidzeína

- 10 Los compuestos de daidzeína, los cuales son utilizados por la cepa de la presente invención *Lactococcus* 20-92, incluyen un glucósido de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína. Un ejemplo específico de dicho glucósido de daidzeína es la daidzina. La daidzina es un glucósido de isoflavona que presenta la daidzeína como aglicona (glucósido de daidzeína). En referencia a la daidzina, es utilizada por dicha cepa de microorganismo para liberar la daidzeína, que es utilizada adicionalmente por la cepa para proporcionar dihidrodaidzeína, a partir de la cual finalmente se produce ecuol.

- En la presente invención, dicho compuesto de daidzeína se utiliza como sustrato. El sustrato incluye no sólo compuestos de daidzeína, sino también diversos materiales o ingredientes que lo contienen. A título de ejemplo representativo de dicho material o ingrediente que contiene compuestos de daidzeína (denominados ingrediente que contiene compuesto de daidzeína), puede mencionarse la isoflavona de soja. La isoflavona de soja ya se encuentra disponible de fuentes comerciales y, en la presente invención, pueden utilizarse dichos productos comerciales, por ejemplo "Fujiflavone P10" (marca comercial registrada) de Fujicco Co., Ltd. Además, dicho ingrediente que contiene compuesto de daidzeína incluye no sólo isoflavona de soja, sino también tejidos vegetales, por ejemplo kudzu (= *Pueraria thurbergiana* Benth) y raíz de kudzu (raíz de maranta), clavo rojo, alfalfa, etc., y derivados de isoflavona originados de los mismos.

- Entre los ejemplos adicionales de dicho ingrediente que contiene compuesto de daidzeína se incluyen no sólo los materiales alimentarios anteriormente indicados, tales como semilla de soja, kudzu, raíz de maranta, clavo rojo, alfalfa, etc., sino también productos procesados de los mismos, tales como harina de semilla de soja (harina de soja), soja hervida, tofu (cuajada de soja), tofu frito, leche de soja, extracto de hipocótilos de soja, etc., productos de fermentación de los mismos, tales como natto (soja fermentada), salsa de soja, miso, tempeh y bebidas fermentadas de soja. Estos materiales invariablemente contienen compuestos de daidzeína. Además, no sólo contienen compuestos de daidzeína, sino también isoflavonas estrogénicas, tales como genisteína y sus glucósidos (genistina, etc.), gliciteína y sus glucósidos (glicitina, etc.), biochanina A y formononetina, que son precursores de daidzeína y genistina parcialmente metilados y pueden utilizarse ventajosamente en la presente invención.

(3) Composición de la invención

- 40 (3-1) Composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecuol

- La composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecuol de la invención comprende, como componente esencial de la misma, una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente a la especie *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad de actuar sobre el sustrato compuesto de daidzeína o el ingrediente que contiene daidzeína para producir ecuol, siendo *Lactococcus* 20-92 anteriormente indicado un ejemplo representativo. La cepa de bacteria del ácido láctico para la utilización como dicho componente esencial habitualmente es una cepa bacteriana viable, aunque no se encuentra limitada a ella, sino que puede ser cualquiera de sus cultivos, preparaciones crudas o purificadas de dichos cultivos, los cuales contienen células aisladas, y liofilizados de los mismos.

- Los cultivos de dicha cepa bacteriana pueden obtenerse típicamente mediante el procedimiento que comprende cultivar la cepa en un medio adecuado para su crecimiento, por ejemplo medio MRS, a 37°C durante aproximadamente 48 horas. Tras el cultivo, las células pueden recuperarse mediante, por ejemplo, centrifugación del cultivo a 3.000 rpm (4°C) durante 10 minutos. Éstas pueden purificarse de la manera convencional. Además, estas células pueden liofilizarse. Los liofilizados resultantes también pueden utilizarse como el componente activo de la composición de la invención.

- Lo único que resulta necesario en la composición de la invención es que contenga la bacteria (células o equivalente) como dicho componente activo de la misma aunque, si se desea, la composición puede suplementarse con nutrientes adecuados para el mantenimiento (o crecimiento) del microorganismo como dicho componente activo. Los nutrientes indicados anteriormente puede ser, por ejemplo, los medios nutritivos para el cultivo de los microorganismos respectivos, tales como BHI, EG, BL y GAM, tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria.

- Entre los ejemplos de otros nutrientes se incluyen diversos oligosacáridos, tales como lactooligosacáridos, oligosacáridos de soja, lactulosa, lactitol, fructooligosacáridos y galactooligosacáridos. La cantidad de dichos

oligosacáridos no se encuentra particularmente restringida, aunque preferentemente se selecciona de entre un intervalo con el que la concentración final de los mismos en la composición de la invención sea de aproximadamente 1% a 3% en peso.

La composición anteriormente indicada de la invención, ingerida oralmente, expresa la actividad de producción de ecuol deseada en el cuerpo del receptor. Generalmente los japoneses presentan el hábito de comer alimentos que contienen compuesto de daidzeína, típicamente los materiales alimenticios o ingredientes anteriormente indicados, por ejemplo soja, productos secundarios de la misma, y productos de fermentación de la misma y, por lo tanto, la ingesta de la composición de la invención resulta en la producción de ecuol *in vivo*.

Además, en caso necesario, la composición de la invención puede suplementarse con cantidades adecuadas de diversas vitaminas, elementos metálicos traza y similares. Entre los ejemplos de dichas vitaminas se incluyen la vitamina B, la vitamina D, la vitamina C, la vitamina E y la vitamina K (particularmente MK-7 (menaquinona-7) derivada de *Bacillus natto*). Son ejemplos de dichos elementos de metal traza, cinc, selenio, hierro, manganeso, etc.

La cantidad del microorganismo que debe formularse en la composición de la invención puede seleccionarse juiciosamente según el tipo de cepa bacteriana utilizada. A título de ejemplo, el número de organismos (recuento de células viables) de *Lactococcus* 20-92 se ajusta preferentemente a aproximadamente 10^8 a 10^9 células/100 g de composición. El recuento de células viables se determina de la manera siguiente. Una dilución de muestra se utiliza para cubrir un medio agar para el cultivo bacteriano y se cultiva aeróbicamente a 37°C y se cuentan las colonias formadas. La cantidad del microorganismo indicado anteriormente puede ajustarse juiciosamente según la forma de la composición que debe prepararse utilizando la cantidad anteriormente indicada como referencia.

(3-2) Composición que contiene compuesto de daidzeína de la invención

La composición de la invención puede contener además, en caso necesario, por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en los compuestos de daidzeína anteriormente indicados e ingredientes que contienen compuesto de daidzeína. Entre los diversos tipos de compuestos de daidzeína e ingrediente que contiene compuesto de daidzeína, los hipocótilos de soja y los ingredientes alimenticios preparados a partir de los hipocótilos, resultan particularmente preferidos y, entre ellos, resultan todavía más preferidos los ingredientes alimenticios solubles en agua o emulsionados. Entre otros ejemplos preferidos de dicho ingrediente que contiene compuesto de daidzeína se encuentran la harina de soja y la leche de soja.

Debido al sustrato contenido en la formulación, una persona no habituada a comer soja e ingredientes alimenticios similares puede ingerir la composición oralmente, y el microorganismo ingerido utilizará el sustrato formulado para producir el ecuol objetivo dentro del cuerpo.

La cantidad de dicho compuesto de daidzeína y/o ingrediente que contiene compuesto de daidzeína en la composición no se encuentra particularmente restringida, pero puede ser razonablemente de entre aproximadamente 10 y 25 mg, que es equivalente a la ingesta diaria habitual promedio en Japón.

(3-3) Composición que contiene ecuol de la invención

La composición de la invención puede contener además ecuol.

Generalmente, el apetito de un alimento se ha despertado cuando se ha causado que el material alimentario inicie la fermentación del ácido láctico, por ejemplo. Además, *Lactococcus* 20-92, que es un ejemplo representativo de microorganismo para la utilización en la composición de la invención, presenta una capacidad (actividad) de producción de ecuol muy elevada. La presente invención proporciona además una composición que contiene ecuol, tal como leche de soja fermentada, que se prepara dejando que dicha cepa de microorganismo actúe sobre el ingrediente que contiene compuesto de daidzeína, tal como leche de soja, y de esta manera utilice el compuesto de daidzeína en la leche de soja para elaborar ecuol.

Como sustrato para la utilización en dicho aspecto de la invención, pueden utilizarse los diversos tipos anteriormente indicados de compuesto de daidzeína e ingrediente que contiene compuesto de daidzeína. Entre ellos resultan preferidas las soluciones o emulsiones preparadas a partir de leche de soja, harina de soja o similar.

Un ejemplo específico preferido de composición que contiene ecuol de la invención es el producto de fermentación obtenido mediante un procedimiento que comprende añadir isoflavona de soja o un material alimentario que lo contiene a un medio adecuado y cultivar el microorganismo de la invención, preferentemente *Lactococcus* 20-92, en el mismo para provocar la fermentación. Más particularmente, dicha fermentación puede llevarse a cabo mediante un procedimiento que comprende añadir una cantidad predeterminada del microorganismo de la invención a una mezcla de una solución de sustrato esterilizada y un medio nutritivo favorable al crecimiento del microorganismo, tal como BHI, EG, BL o GAM, o a leche de vaca, leche de soja o un zumo vegetal que pueda utilizarse como alimento, y llevar a cabo una reacción de fermentación anaeróbica o aeróbica a 37°C bajo condiciones fijas durante aproximadamente 48 a 96 horas (en caso necesario, puede añadirse un agente de control del pH y un agente

reductor (por ejemplo extracto de levadura, vitamina K₁ o similar)). En el procedimiento anteriormente indicado, la cantidad del sustrato puede ser de entre aproximadamente 0,01 y 0,5 mg/ml y el tamaño del inóculo del microorganismo puede seleccionarse del intervalo de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5%.

De esta manera, puede producirse la composición que contiene ecuol de la invención. Esta composición puede aplicarse ventajosamente en la forma anteriormente indicada de un producto de fermentación como alimento o producto farmacéutico. Además, el ecuol producido puede aislarse y purificarse a partir del caldo de cultivo o producto de fermentación de una manera conocida *per se*, opcionalmente formulado con cantidades adecuadas de otros ingredientes alimenticios o similares, y procesarse en formas alimenticias o de producto farmacéutico adecuadas.

El aislamiento y la purificación a las que se ha hecho referencia anteriormente pueden llevarse a cabo mediante, por ejemplo, adsorción del producto de fermentación sobre una resina de intercambio iónico (DIAION HP20, producto de Mitsubishi Kasei Corporation), eluyéndolo con metanol y concentrando el eluido a sequedad.

La cantidad de ecuol en la composición de la invención se selecciona según al forma de alimento o producto farmacéutico que debe producirse y no se encuentra particularmente restringida. Preferentemente, sin embargo, la cantidad generalmente debería ser suficiente para que se encuentren contenidos aproximadamente 2 a 5 mg de ecuol en cada 100 g de la composición total.

La presencia de ecuol en la composición producto de la invención puede confirmarse mediante el método descrito a continuación en la presente memoria, en el Ejemplo de ensayo 1.

La composición que contiene ecuol de la invención ocupa un lugar elevado en la escala de seguridad debido a que el principio activo, ecuol, es una sustancia de origen natural. Además, debido a que se prepara mediante la utilización de la cepa de bacteria de ácido láctico, el riesgo de contaminación con compuestos químicos originados en la línea de producción es bajo. Como ventajas adicionales, puede mencionarse el rendimiento elevado y el bajo coste, así como el sabor y aroma sabrosos como alimento.

(3-4) Formas alimenticias

La composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecuol de la invención generalmente se procesa en formas alimenticias que comprenden la cepa bacteriana del ácido láctico particular como componente esencial en combinación con un portador comestible adecuado.

Entre las formas alimenticias específicas de la composición de la invención se incluyen la forma de bebida, la forma de producto lácteo diferente de dicha forma de bebida (incluido la forma de leche fermentada), la forma de alimento sólido, la forma microencapsulada que contiene células, y similares. La composición de la invención en la forma de bebida incluye bebidas de bacterias del ácido láctico y bebidas que contienen bacterias del ácido láctico.

Las expresiones "leche fermentada" y "bebida con bacterias del ácido láctico" tal como se utilizan en la presente memoria se ajustan a las definiciones en el artículo 2-37, "Leche fermentada", y en el artículo 2-38, "Bebida con bacterias del ácido láctico" de las "Regulations relating to the Ingredients etc. of Milks and Milk Products" del anterior Ministerio de Sanidad y Bienestar Social. De esta manera, la expresión "leche fermentada" se refiere a una preparación pastosa o líquida que resulta de la fermentación de una leche o producto de leche (lácteo) con bacterias del ácido láctico o levaduras. Por lo tanto, la "leche fermentada" incluye no sólo productos en forma de bebida, sino también productos en forma de yogur. La expresión "bebida con bacterias del ácido láctico" se refiere a una bebida preparada mediante la utilización de un producto pastoso o líquido resultante de la fermentación de una leche o producto lácteo con una bacteria o levadura fermentadora del ácido láctico a modo de material principal y la dilución de la misma con agua.

La bebida que contiene bacterias del ácido láctico incluye bebidas vegetales fermentadas, bebidas de frutas fermentadas y bebidas de leche de soja fermentada, etc. Entre los ejemplos de elementos en forma de productos lácteos diferentes de la forma de bebida se incluyen productos en forma de cuajada, tales como yogur. La forma de alimento sólido incluye gránulos, polvos (incluyendo, por ejemplo, polvos secados por congelación de leche fermentada), comprimidos, comprimidos efervescentes, gomas, pastillas de goma y pudines, etc.

El procesamiento para producir dichas formas puede llevarse a cabo de la manera convencional. Además, el portador para la utilización en el procesamiento para producir dichas formas puede ser cualquier portador comestible. Son portadores particularmente preferentes aquellos que presentan buenos efectos de sensación en boca y mejorantes del sabor. Entre los ejemplos de dichos portadores que presentan buenos efectos de sensación en boca y de mejora del sabor se incluyen edulcorantes artificiales, sorbitol, xilitol y similares. Otros portadores preferentes son, por ejemplo, agentes enmascaradores, tales como trehalosa (producto de Hayashibara), ciclodextrina, Benekote BMI (producto de Kao Corporation), etc.

La bebida que contiene bacterias del ácido láctico como forma alimenticia específica preferente se describe en

detalle a continuación. El procesamiento para producir dicha bebida puede llevarse a cabo mediante el procedimiento que comprende el cultivo del microorganismo en un material de fermentación adecuado que contiene nutrientes para el microorganismo, tal como líquidos derivados de vegetales o frutas, leche de soja (soja emulsionada), etc., para provocar de esta manera la fermentación de dicho material. Entre los vegetales y frutas para la utilización como material de fermentación se incluyen restos vegetales de poda, restos triturados, restos de molienda, zumos exprimidos, productos tratados con enzimas y diluciones o concentrados de los mismos. Entre los vegetales se incluyen calabazas, zanahorias, tomates, pimientos dulces, apio, espinaca, boniatos pigmentados, maíz, remolacha, col verde, perejil, coles y brócoli, etc. Entre las frutas se incluyen manzanas, melocotones, plátanos, fresas, uvas, sandías, naranjas y mandarinas, etc.

Los restos de poda, triturados y molidos de vegetales y frutas pueden obtenerse mediante, por ejemplo, el procedimiento que comprende lavar los vegetales o frutas, sometiéndolos a un tratamiento de blanqueo, por ejemplo introduciéndolos en agua caliente, en caso necesario, y cortándolos, pulverizándolos o moliéndolos mediante un triturador, mezclador, procesador de alimentos, despulpador-refinador, molino coloidal Mycolloider, o similar.

Pueden prepararse zumos mediante la utilización de un filtro-prensa, exprimidor-mezclador o similar. Los zumos pueden prepararse también mediante filtración de dichos triturados (restos de molienda) a través de un tejido filtrante o similar. Los productos tratados con enzimas pueden prepararse dejando que la celulasa, pectinasa, protopectinasa o similar actúan sobre dichos residuos de poda, triturados, molidos o zumos. Entre las diluciones se incluyen las diluciones acuosas de 1 a 50 veces. Entre los concentrados se incluyen los concentrados 1 a 100 veces mediante medios tales como la concentración por congelación, la concentración bajo presión reducida, etc.

La leche de soja es otro ejemplo específico del material de sustrato de fermentación que puede prepararse a partir de materiales de soja rutinariamente. La leche de soja incluye un homogenado preparado mediante inmersión de semillas de soja descascarilladas en agua, pulverización en húmedo de estas semillas de soja utilizando un molino adecuado o similar, y homogeneización del pulverizado de la manera rutinaria y una solución en agua de proteína de soja soluble en agua, etc.

La fermentación utilizando un microorganismo puede llevarse a cabo mediante inoculación de dicho material de sustrato de fermentación con el microorganismo de la invención e incubando el material inoculado bajo condiciones fijas. El medio opcionalmente puede suplementarse con sustancias inductoras de la fermentación, garantizando un buen crecimiento del microorganismo utilizado, por ejemplo diversas fuentes de carbono, tales como glucosa, almidón, sacarosa, lactosa, dextrina, sorbitol, fructosa, etc., fuentes de nitrógeno tales como extracto de levadura, peptona, etc., vitaminas y minerales.

El tamaño del inóculo del microorganismo debe ser generalmente equivalente a un recuento de células viables no inferior a aproximadamente 1×10^6 células, preferentemente de aproximadamente 1×10^7 células por centímetro cúbico de líquido de sustrato de fermentación. Con respecto a las condiciones de cultivo, la temperatura de fermentación generalmente se selecciona de entre el intervalo de aproximadamente 20°C a 40°C, preferentemente de aproximadamente 25°C a 37°C, más preferentemente de 37°C, y el tiempo de fermentación se selecciona de entre el intervalo de aproximadamente 8 a 24 horas.

Para una fermentación estable, resulta recomendable preparar un iniciador con anticipación e inocular el sustrato de fermentación con el iniciador para la fermentación. Un iniciador representativo puede ser, por ejemplo, el cultivo obtenido mediante inoculación de la presente cepa de microorganismo de la invención en dicho material de sustrato de fermentación sometido a la esterilización habitual a una temperatura de entre 90°C y 121°C durante 5 a 20 minutos previamente, leche desnatada al 10% en polvo suplementada con extracto de levadura o similar, y el cultivo del microorganismo bajo las mismas condiciones que las indicadas anteriormente. El iniciador preparado de esta manera habitualmente contiene aproximadamente 10^7 a 10^9 células del microorganismo de la invención por cada gramo de cultivo.

El producto de fermentación del ácido láctico obtenido de la manera anteriormente indicada puede en ocasiones encontrarse en forma de cuajada (una forma de tipo yogur o pudín) y dicho producto puede consumirse directamente como alimento. El producto de fermentación del ácido láctico en dicha forma de cuajada puede homogeneizarse adicionalmente con el fin de preparar la forma de bebida deseada (por ejemplo una bebida de leche de soja fermentada). Esta homogeneización puede llevarse a cabo utilizando un homogeneizador ordinario. Más particularmente, puede llevarse a cabo utilizando un homogeneizador de alta presión de Gaulin [LAB 40] a aproximadamente 200 a 1.000 kgf/cm², preferentemente a aproximadamente 300 a 800 kgf/cm², o un homogeneizador de Sanwa Machine Industry Co. (número de artículo HA X 4571, H20-A2, etc.) a no menos de 150 kg/cm². Mediante esta homogeneización, puede obtenerse un producto de bebida, particularmente una bebida de leche de soja fermentación, que presenta una excelente palatabilidad, particularmente una sensación en boca suave. Durante la realización de dicha homogeneización, resulta permisible, en caso necesario, para preparar la dilución apropiada, añadir un ácido orgánico para el ajuste del pH y/o añadir diversos aditivos que se utilizan habitualmente en la preparación de bebidas, tales como azúcares, zumos de fruta, formadores de viscosidad, surfactantes y saborizantes, en cantidades adecuadas. Como ejemplo preferido específico de cada tipo de aditivo indicado anteriormente y su nivel de adición (% en peso basado en el peso del producto de fermentación de forma

cuajada): glucosa al 8% (% en peso, lo mismo se aplica en adelante), azúcar al 8%, dextrina al 8%, ácido cítrico al 0,1%, éster de glicerol-ácido graso al 0,2% y saborizante al 0,1%.

La bebida de bacterias del ácido láctico de la invención obtenida de esta manera, tal como una bebida de leche de soja fermentada, puede dispensarse asépticamente en recipientes adecuados de la manera convencional con el fin de proporcionar el producto final. Este producto presenta una buena palatabilidad, permitiendo una deglución suave y un buen sabor.

La dosis (cantidad ingerida) del producto anteriormente indicado puede seleccionarse juiciosamente según la edad, sexo, peso corporal y gravedad de la enfermedad del receptor, entre otras variables y no se encuentra particularmente restringida. Generalmente pueden ingerirse 100 a 300 ml al día de un producto de bebida con un recuento de células viables de entre 10^8 y 10^9 células/ml.

Un ejemplo específico adicional de la composición de la invención en la forma alimenticia es la forma de comprimido efervescente. Esta forma puede prepararse formulando 10% a 35% (% en peso; lo mismo se aplica posteriormente) de carbonato sódico y/o hidrogenocarbonato sódico y 20% a 70% de un neutralizador, a modo de ingredientes efervescentes, con 0,01% a 50% de la bacteria (células liofilizadas) de la invención. El neutralizador que debe utilizarse de esta manera es un compuesto ácido capaz de neutralizar dicho carbonato sódico y/o hidrogenocarbonato sódico para generar gas dióxido de carbono. Son ejemplos representativos de dicho neutralizador ácidos orgánicos tales como ácido L-tartárico, ácido cítrico, ácido fumárico y ácido ascórbico.

La cantidad de dichos ingredientes efervescentes en el producto efervescente de la invención resulta suficiente para que, al disolver en agua dicho producto de la invención, la solución muestre acidez, particularmente una acidez de pH entre 3,5 y 4,6. Más particularmente, la cantidad puede seleccionarse de entre el intervalo de 10% a 35% de carbonato sódico y/o hidrogenocarbonato sódico y 20% a 70% de neutralizador. Particularmente, la cantidad de carbonato sódico se selecciona de entre el intervalo de 11% a 31%, preferentemente de 22% a 26%; el hidrogenocarbonato sódico de entre el intervalo de 10% a 35%, preferentemente de 20% a 30%. Entre estas opciones alternativas, resulta más preferente utilizar hidrogenocarbonato sódico por sí solo dentro del intervalo de 20% a 25%. La cantidad del neutralizador se selecciona de entre el intervalo de 20% a 70%, particularmente de 30% a 40%. En particular, resulta más preferente utilizar ácido L-tartárico dentro del intervalo de 20% a 25% y ácido ascórbico dentro del intervalo de 8% a 15%.

El producto efervescente contiene los microorganismos de la invención y los ingredientes efervescentes como componentes esenciales y opcionalmente puede contener cantidades adecuadas de diversos aditivos conocidos, tales como excipiente, ligante, desintegrador, lubricante, formador de viscosidad, surfactante, agente modulador de la osmolaridad, electrolito, edulcorante, saborizante, colorante, agente de control del pH y similares. Son ejemplos de los aditivos, almidones tales como almidón de trigo, almidón de patata, almidón de maíz, dextrina, etc.; sacáridos tales como sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, lactosa, etc.; alcoholes de azúcar, tales como sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, etc.; glucósidos de reorganización de azúcar, tales como azúcar de acoplamiento, palatinosa, etc.; excipientes tales como fosfato de calcio, sulfato de calcio, etc.; ligantes/espesantes, tales como almidones, sacáridos, gelatina, goma arábiga, dextrina, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, goma xantano, pectina, goma tragacanto, caseína, ácido alginico, etc.; lubricantes tales como leucina, isoleucina, L-valina, ésteres de azúcar, aceites hidrogenados, ácido esteárico, estearato de manganeso, talco, macrogoles, etc.; desintegradores tales como celulosa microcristalina (Avicel, Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), carboximetilcelulosa (CMC), carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na), carboximetilcelulosa cálcica (CMC-Ca), etc.; surfactantes tales como éster de polioxietilén-sorbitán ácido graso (polisorbato), lecitina, etc.; dipéptidos tales como aspartamo, alitamo, etc.; y edulcorantes tales como Stevia, sacarina y similares. Estos pueden seleccionarse juiciosamente y utilizarse en cantidades adecuadas considerando la relación de cada uno con los componentes esenciales, la proporción de la preparación, el método de producción de la preparación, entre otros factores.

Además, en la preparación efervescente de la invención, pueden formularse vitaminas, particularmente cianocobalamina y ácido ascórbico (vitamina C) en cantidades adecuadas. La cantidad no se encuentra particularmente limitada, aunque habitualmente puede añadirse vitamina C, por ejemplo, al 30% como máximo, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5% a 25%.

El método de producción de la preparación efervescente de la invención puede ser fundamentalmente similar al método convencional de producción de comprimidos efervescentes de este tipo. De esta manera, la preparación de la invención en forma de comprimido efervescente puede prepararse dosificando cantidades predeterminadas de los ingredientes respectivos, mezclándolos, y procesando el total mediante el método de compresión directa de los polvos o el método de granulación seca o húmeda-compresión, por ejemplo.

La preparación de la invención, obtenida de esta manera, puede convertirse en una forma de bebida adecuada para la administración oral simplemente introduciéndola en agua y administrándola oralmente.

La dosis (cantidad consumida) puede establecerse juiciosamente según la edad, sexo, peso corporal, severidad de la enfermedad del receptor, entre otras variables, y no se encuentra particularmente limitada, aunque generalmente

pueden disolverse 1 a 2 comprimidos de la forma de comprimido efervescente de la invención, que pesan aproximadamente 1,5 a 6,0 g por comprimido, en 100 a 300 ml de agua, que se ingieren en cada dosis.

Las proporciones de mezcla particularmente preferentes del sustrato compuesto de daidzeína o del ingrediente que contiene compuesto de daidzeína, la cepa de bacteria del ácido láctico particular y otros ingredientes formulados opcionalmente en la composición de la invención, por cada 100 g de la composición, son: el compuesto de daidzeína o ingrediente que contiene compuesto de daidzeína en el intervalo de aproximadamente 10 a 50 mg, calculados como daidzeína; el número de bacterias de la cepa de bacteria del ácido láctico en el intervalo de 10^9 a 10^{10} células (recuento de células viables), y los oligosacáridos y otros, en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 g.

Debido a que la composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecual de la invención está diseñada para contener un microorganismo (principalmente bacterias vivas), tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, condiciones tales como la aplicación de calor y presión no resultan recomendables en el procesamiento de la composición en los productos finales. Por lo tanto, en el procesamiento de la composición de la invención en formas de producto tales como barras, gránulos, polvos y comprimidos, resulta preferente formular directamente el microorganismo en forma de células liofilizadas o utilizar células liofilizadas tratadas con un agente de recubrimiento adecuado.

Sin embargo, la composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecual de la invención no resulta necesario que contengan esencialmente bacterias vivas. En el caso de que dicha composición que comprende bacterias viables y dicho compuesto de daidzeína o similar que dichas bacterias pueden utilizar contiene ecual producido por bacterias, puede someterse a una esterilización por calor rutinaria para matar las bacterias. Dicha esterilización por calor a la que se somete la composición inhibe los deterioros de sabor y aroma causados por la fermentación excesiva de las bacterias viables formuladas en la composición durante el almacenamiento o distribución en el mercado.

(3-5) Formas de producto farmacéutico

La composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecual de la invención puede procesarse en preparaciones farmacéuticas que generalmente contienen dicha cepa bacteriana del ácido láctico definida como componente esencial conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado.

El portador incluye diversos diluyentes y excipientes, tales como rellenos, formadores de volumen, ligantes, humectantes, desintegradores, surfactantes, lubricantes, etc., que es conocido que son utilizados en la técnica. Pueden utilizarse selectivamente según la forma de dosificación unitaria de la preparación.

Como forma de dosificación unitaria de la preparación farmacéutica puede utilizarse selectivamente una diversidad de formas. Las formas representativas son comprimidos, píldoras, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas y supositorios.

El portador que puede utilizarse en el procesamiento para producir la forma de comprimido incluye diversos excipientes, tales como lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico, fosfato potásico, etc.; ligantes, tales como agua, etanol, jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc.; desintegrantes, tales como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, almidón seco, alginato sódico, agar en polvo, laminarán en polvo, hidrogenocarbonato sódico, carbonato cálcico, etc.; surfactantes, tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietilén-sorbitán, laurilsulfato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, etc.; inhibidores de la desintegración, tales como sacarosa, estearina, manteca de cacao hidrogenado, aceites hidrogenados, etc.; inductores de la absorción, tales como bases de amonio cuaternario, laurilsulfato sódico, etc.; humectantes, tales como glicerol, almidón, etc.; adsorbentes, tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita, sílice coloidal, etc.; y lubricantes, tales como talco purificado, estearatos, ácido bórico en polvo, polietilenglicol, y similares.

Además, en caso necesario, pueden prepararse comprimidos en las formas que presentan recubrimientos convencionales, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos de gelatina, comprimidos de recubrimiento entérico, comprimidos recubiertos de película, etc., o en forma de comprimidos de doble capa o comprimidos multicapa.

El portador que puede utilizarse en la formación de píldoras incluye diversos excipientes, tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceites vegetales hidrogenados, caolín, talco, etc.; ligantes, tales como goma arábiga en polvo, goma tragacanto en polvo, gelatina, etanol, etc., y desintegradores, tales como laminarán, agar, y similares.

Los portadores que pueden utilizarse en la formación de supositorios comprenden polietilenglicol, manteca de cacao, alcoholes superiores, ésteres de alcohol superior, gelatina y glicéridos semisintéticos, etc. El producto encapsulado puede fabricarse generalmente mediante la mezcla de las bacterias de la invención con diversos tipos de portadores

farmacéuticos, tales como los indicados anteriormente, y utilizando la mezcla para rellenar cápsulas duras o cápsulas elásticas blandas de la manera convencional.

Además, en caso necesario, pueden incorporarse colorante, conservante, saborizante, corrector, edulcorante y otros fármacos en el producto farmacéutico de la invención.

La cantidad del microorganismo de la invención que debe incorporarse en la preparación de la invención no se encuentra particularmente limitada sino que puede seleccionarse juiciosamente de entre un amplio intervalo. La proporcionada generalmente recomendada es de aproximadamente 10^8 a 10^{10} células/g de preparación farmacéutica.

El método de administración de la preparación farmacéutica anteriormente indicado no se encuentra particularmente limitado sino que puede establecerse según las formas de preparación, diversos factores del paciente tales como edad, sexo, etc., y la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas se administran oralmente y los supositorios se administran rectalmente.

La dosis de dicha preparación farmacéutica puede establecerse juiciosamente según el método de administración, la edad del paciente, el sexo y otros factores, y la gravedad de la enfermedad, aunque preferentemente es de aproximadamente 0,5 a 20 mg/día en términos del microorganismo de la invención, es decir, de principio activo, por kg de peso corporal. Esta preparación puede administrarse en 1 a 4 dosis divididas al día.

Con la ingestión (administración) de la composición de la invención, el microorganismo en la composición alcanza estando vivo el tracto digestivo inferior o se establece en él como parte de la flora intestinal, en donde se expresa la eficacia esperada. En este aspecto, la forma de preparación particularmente preferente es el comprimido de recubrimiento entérico, con el que puede transportarse el microorganismo al intestino sin resultar atacada por el ácido gástrico.

La composición que contiene las bacterias del ácido láctico productoras de ecual de la invención tal como se ha obtenido de la manera anteriormente indicada resulta útil para la profilaxis y tratamiento sintomáticos de malestar y/o osteoporosis posmenopáusica y alteraciones climatéricas en mujeres de mediana edad y ancianas. Dicha profilaxis y tratamiento pueden llevarse a cabo mediante la administración de una cantidad efectiva de dicha composición de la invención en mujeres de mediana edad o ancianas para las que se requiere, o conseguir que la ingieran. La cantidad efectiva indicada anteriormente no se encuentra particularmente limitada en la medida en que resulte suficiente para prevenir y controlar las diversas manifestaciones de la osteoporosis y las alteraciones climatéricas que acompañan al malestar y/o menopausia en mujeres de mediana edad y ancianas. Como regla general, sin embargo, la dosis puede seleccionarse generalmente de manera que la cantidad de ecual excretada en la orina de la persona que ha ingerido la composición de la invención alcance por lo menos 5 μ moles (aproximadamente 1,2 mg/día).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática que muestra la relación entre el tiempo de incubación hasta el recuento de células viables determinado mediante el protocolo de ensayo descrito en el Ejemplo de ensayo 1.

La figura 2 es una representación esquemática que muestra la relación entre el tiempo de incubación y la capacidad de producción de ecual (puntuación) determinadas mediante el protocolo de ensayo descrito en el Ejemplo de ensayo 1.

La figura 3 es una representación esquemática que muestra la relación entre el tiempo de incubación y la producción de ecual determinada mediante el protocolo de ensayo descrito en el Ejemplo de ensayo 1.

La figura 4 es una representación esquemática que muestra el curso temporal de la concentración de cada uno de los compuestos de daidzeína y ecual en el cultivo según el seguimiento realizado de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo de ensayo 2.

La figura 5 es una representación esquemática que muestra la relación entre el periodo de almacenamiento y la capacidad de producción de ecual (puntuación) determinadas según el protocolo de ensayo descrito en el Ejemplo de ensayo 3.

La figura 6 es una representación esquemática que muestra los comportamientos dependientes del tiempo de incubación de la cepa productora de ecual (cambios en la tasa de crecimiento, en la capacidad de producción de ecual y en la cantidad producida de ecual) determinados mediante el experimento descrito en el Ejemplo de ensayo 1-3.

La figura 7 es una representación esquemática que muestra la relación entre el tiempo de incubación hasta un recuento de células viables, determinada mediante el protocolo de ensayo descrito en el Ejemplo de ensayo 4.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Los ejemplos siguientes de producción de la composición que contiene bacterias del ácido láctico productoras de ecual de la invención pretenden describir la presente invención con mayor detalle y no deben interpretarse en modo alguno como definitorios de la invención.

Ejemplo 1(1) Producción de bebida de leche de soja fermentada

Se mezclaron los ingredientes siguientes según la fórmula con el fin de preparar la composición de la invención en forma de una bebida de leche de soja fermentada.

Cultivo de fermentación de proteína de soja soluble en agua	100 ml
Vitaminas y minerales	c.s.
Saborizante	c.s.
Agua	c.s.
Total	150 ml

El cultivo fermentativo anteriormente indicado de proteína de soja soluble en agua se obtuvo mediante disolución de 13 g de proteína de soja soluble en agua en 100 ml de agua, añadiendo 10^8 a 10^9 células de *Lactococcus* 20-92 (nº FERM BP-10036) y llevando a cabo la fermentación a 37°C durante 24 a 48 horas. La proteína de soja soluble en agua contenía aproximadamente 1 a 2 mg, calculados como daidzeína, de compuestos de daidzeína en cada gramo.

(2) Producción de una leche fermentada

Se mezclaron los ingredientes siguientes según la fórmula con el fin de preparar la composición de la invención en una forma de leche fermentada.

Leche fermentada con <i>Lactococcus</i> 20-92	100 ml
Vitaminas y minerales	c.s.
Saborizante	c.s.
Agua	c.s.
Total	150 ml.

La leche fermentada con *Lactococcus* 20-92 se obtuvo mediante la adición de 10^8 a 10^9 células de *Lactococcus* 20-92 (nº FERM BP-10036) a 1 litro de leche de vaca (que presenta un contenido de sólidos no grasos lácteos de 8,5% o superior y un contenido de materias grasas lácteas de 3,8% o superior) y llevar a cabo la fermentación a 37°C durante 24 a 48 horas.

(3) Producción de unos polvos liofilizados de leche de soja fermentada

Utilizando aproximadamente 10^9 células de *Lactococcus* 20-92 (nº FERM BP-10036) y 100 g de leche de soja (sólidos de soja 10%, contenido de compuesto de daidzeína: 10 a 15 mg calculados como daidzeína), se llevó a cabo la fermentación del ácido láctico a 37°C durante 72 a 96 horas para la producción de ecual. Este producto de fermentación se liofilizó con el fin de preparar unos polvos. El contenido de ecual de los polvos determinado mediante HPLC fue de 0,1% a 0,3% en peso.

Los polvos obtenidos anteriormente y diversos otros ingredientes se pesaron según la fórmula siguiente y se mezclaron con el fin de preparar la composición de la invención en forma de polvos (forma alimenticia y forma de producto farmacéutico).

Polvos liofilizados de leche de soja fermentada	2,2 g (contenido de ecual: 0,005 g)
Excipiente (almidón de maíz)	17 g
Vitaminas y minerales	c.s.
Saborizante	c.s.
Total	20 g

(4) Producción de unos polvos

Se pesaron los ingredientes siguientes según la fórmula y se mezclaron con el fin de preparar la composición de la invención en una forma de polvos (forma alimenticia y forma de producto farmacéutico).

Polvos liofilizados de <i>Lactococcus</i> 20-92	4,1 g
Excipiente (lactosa)	1,0 g

Vitaminas y minerales	c.s.
Saborizante	c.s.
Total	20 g

Se obtuvieron unos polvos liofilizados de *Lactococcus* 20-92 mediante el cultivo de *Lactococcus* 20-92 (n° FERM BP-10036) en un medio de cultivo líquido adecuado (MRS) (37°C, 24 a 48 horas), recolectando y suspendiendo las células cultivadas en leche desnatada al 10%, y liofilizando la suspensión. El contenido de células de los polvos era de 10^9 a 10^{10} células/g.

Los polvos anteriormente indicados se mezclaron en unos polvos que contenían daidzeína, añadiendo además 4,1 g de polvos de isoflavona de soja semipurificada.

La ingestión de los polvos que contenían daidzeína obtenidos de esta manera resultó en excreciones urinarias de ecuol de aproximadamente 5 μ moles (aproximadamente 1,2 mg) al día, indicando claramente que la cantidad de ecuol correspondiente a las excreciones anteriormente indicadas puede producirse in vivo.

(5) Producción de gránulos

Se pesaron los ingredientes siguientes según la fórmula y se mezclaron para preparar la composición de la invención en una forma granular (forma alimenticia y forma de producto farmacéutico).

Polvos de isoflavona de soja semipurificada	4,1 g
Polvos liofilizados de <i>Lactococcus</i> 20-92	1,0 g
Éster de ácido de sacarosa	c.s.
Vitaminas y minerales	c.s.
Saborizante	c.s.
Total	20 g

Los polvos liofilizados de *Lactococcus* 2-92 utilizados fueron los utilizados anteriormente, en (1).

La ingestión de la composición anteriormente indicada resultó en la administración concurrente de daidzeína y bacterias productoras de ecuol en el intestino grueso, permitiendo de esta manera la producción de ecuol en el mismo.

Se proporcionan a continuación ejemplos de ensayo referentes a la cepa de bacteria de ácido láctico productora de ecuol de la invención.

Ejemplo de ensayo 1

Ensayo de tasa de crecimiento, capacidad (actividad) de producción de ecuol y cantidad producida de ecuol

(1) Protocolo de ensayo

Se incubó *Lactococcus* 20-92 (10^7 a 10^9 células/g) en 5 ml de caldo BRI (un medio líquido de cultivo (medio de base)) anaeróbicamente a 37°C durante 24 horas y el cultivo se diluyó a 10^2 y a 10^4 células con el medio de base.

El cultivo obtenido tras completar la incubación y las diluciones del mismo preparadas anteriormente se mezclaron, 0,2 ml de cada una, con 5 ml de medio de base suplementado con daidzeína (daidzeína añadida a caldo BRI hasta una concentración final de 10 μ g/ml), con 5 ml de leche de vaca y con 5 ml de leche de soja, respectivamente, y se cultivaron anaeróbicamente a 37°C. Se fijó el tiempo de incubación en 8, 24, 48, 72 y 96 horas en el caso del medio de base suplementado con 10 μ g/ml de daidzeína y de leche de soja, y en 8, 24 y 48 horas en el caso de la leche de vaca.

Antes de iniciar la incubación y al final de cada periodo de incubación, se muestrearon porciones de 0,1 ml y 0,2 ml del cultivo y se sometieron respectivamente a recuento de células y al ensayo de la capacidad (actividad) productora de ecuol. Además, para el medio de base que contenía 10 μ g/ml de daidzeína y para la leche de soja, se muestrearon 0,5 ml de cada cultivo antes del inicio de la incubación y al final de cada periodo de incubación y se determinó la cantidad de ecuol producida en cada muestra.

Se determinó el número de bacterias de la manera siguiente. Se diluyó cada muestra de 0,1 ml con PBS(-) (producto de Nissui Co.) para preparar diluciones de 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 veces y se utilizó 0,1 ml de cada una de estas diluciones para cubrir, respectivamente, medio agar GAM y se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 horas. Se contaron las colonias formadas sobre el medio para la utilización como número de bacterias.

La capacidad (actividad) de producción de ecuol se sometió a ensayo de la manera siguiente. Se mezclaron 0,2 ml de cada muestra con 5 ml de medio de base suplementado con daidzeína (cada uno por triplicado) y se incubaron

anaeróticamente a 37°C durante 96 horas. Tras completar la incubación, se obtuvieron muestras de 0,5 ml de los cultivos respectivos y se extrajeron dos veces respectivamente con porciones de 5 ml de acetato de etilo y se cuantificó la daidzeína, la dihidrodaidzeína (producto intermedio) y el ecuol mediante HPLC. Además, basándose en la cantidad total, se calculó el porcentaje de ecuol. Se puntuaron los resultados en la escala de 5 puntos siguiente y se utilizó la puntuación media de 3 muestras como índice de la capacidad (actividad) de producción de ecuol.

4: Ecuol (90% o más)

3: Ecuol producido, reduciéndose la cantidad de daidzeína a menos de 50% (formación de producto intermedio)

2: Ecuol producido, daidzeína residual (50% o más) (formación de producto intermedio)

1: Producto intermedio producido, ecuol no producido

0: no se produce ni producto intermedio ni ecuol, reduciéndose la cantidad de daidzeína.

La cantidad de ecuol producida se determinó de la manera siguiente. Se extrajo cada muestra de 0,5 ml dos veces con porciones de 5 ml de acetato de etilo y se cuantificaron mediante HPLC las cantidades de daidzeína, dihidrodaidzeína (producto intermedio) y ecuol en el extracto. A continuación, se utilizaron las concentraciones respectivas para calcular la cantidad de ecuol producida.

(2) Resultados de ensayo

(2-1) Los resultados del recuento de las células (tasa de crecimiento) se presentan en la figura 1.

En la representación esquemática, (1) representa el resultado obtenido en el caso en que se utiliza el medio de base suplementado con daidzeína, (2) representa el resultado obtenido en el caso en que se utilizó leche de soja, y (3) representa el resultado obtenido al utilizar leche de vaca. En cada diagrama, el eje horizontal representa el tiempo de incubación (h) y el eje vertical representa el recuento de células viables (log(UFC/ml)).

Puede observarse a partir de los diagramas respectivos, que la tasa de crecimiento de la cepa de la invención es buena y, con independencia del tamaño de inóculo utilizado, la etapa estacionaria de crecimiento se alcanzó invariablemente en 8 horas de incubación en todos los medios: medio de base suplementado con daidzeína, leche de soja y leche de vaca. Se encontró que el recuento de células viables se estabilizaba en $10^{9,1-9,4}$ UFC/ml en el medio de base suplementado con daidzeína, en $10^{8,5-8,7}$ UFC/ml en leche de soja y en $10^{8,0-8,4}$ UFC/ml en leche de vaca.

(2-2) Los valores de capacidad (actividad) de producción de ecuol encontrados se presentan en la figura 2.

En la figura 2, (1) representa el resultado obtenido en el caso en que se utilizó medio de base suplementado con daidzeína, (2) representa el resultado obtenido en el caso en que se utilizó leche de soja, y (3) representa el resultado obtenido en el caso en que se utilizó leche de vaca. En cada diagrama, el eje horizontal representa el tiempo de incubación (h) y el eje vertical representa la puntuación de actividad.

Resulta evidente a partir de los resultados presentados en la figura 2 que la capacidad (actividad) de producción de ecuol tiende a incrementarse con el tiempo en cualquiera de los medios: medio de base suplementado con daidzeína, leche de soja y leche de vaca. También pudo confirmarse que, incluso en los casos en que se utilizó leche de vaca y leche de soja, existía una capacidad (actividad) sostenida de producción de ecuol de la cepa de la invención.

(2-3) Resultados de la determinación de la cantidad de ecuol producida

Las cantidades de ecuol producidas en el medio de base suplementado con daidzeína y en leche de soja (aproximadamente 80 µg/ml calculados como daidzeína) fueron las mostradas en la figura 3.

En referencia a la figura 3, (1) representa el resultado obtenido en el caso en que se utilizó el medio de base suplementado con daidzeína, y (2) representa el resultado obtenido en el caso en que se utilizó leche de soja. En cada diagrama, el eje horizontal representa el tiempo de incubación (h) y el eje vertical representa la concentración de ecuol (µg/ml).

En ambos medios, empezó a notarse la producción de ecuol en la hora 48 tras el inicio de la incubación. En el caso en que se utilizó leche de soja, la cantidad de ecuol producida variaba según el tamaño del inóculo y particularmente al nivel de inoculación de 4,00%, la producción de ecuol fueron de incluso 57,0 µg/ml alcanzada la hora 96 de incubación.

Aunque en la leche de soja no menos de 90% de la daidzeína que actúa como precursor del ecuol se encuentra presente en forma de glucósido (en forma de glucosa unida), ya no se observó el pico correspondiente al glucósido en el cromatograma posterior a la incubación y este hecho sugiere que la cepa de la invención descompone el glucósido (actividad de β-glucosidasa), proporcionando daidzeína y metabolizando adicionalmente esta daidzeína en ecuol.

Ejemplo de ensayo 2Ruta de producción de ecual en *Lactococcus* 20-92(1) Protocolo de ensayo

Se cultivó aeróbicamente *Lactococcus* 20-92 (10^7 células/ml) en 5 ml de caldo BRI (un medio líquido de cultivo, medio de base) a 37°C durante 24 horas y se mezclaron 0,2 ml del cultivo resultante con 5 ml de medio de base suplementado con daidzeína y la mezcla se incubó anaeróbicamente a 37°C. Se fijó el tiempo de incubación en 8, 24, 30, 36, 48, 51, 54, 60, 84 y 96 horas.

Antes de iniciar la incubación y al final de cada periodo de incubación, se extrajeron muestras de 0,5 ml y se determinaron las concentraciones de daidzeína, dihidrodaidzeína (producto intermedio) y ecual en cada muestra.

(2) Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.

La figura 4 es una representación esquemática de los cambios durante el tiempo de la concentración de daidzeína (izquierda), la dihidrodaidzeína (centro) y el ecual (derecha). En cada diagrama, el eje horizontal representa el tiempo de incubación (h) y el eje vertical representa la concentración (µg/ml) de la sustancia correspondiente.

Resultará evidente a partir de los datos presentados en la figura 4 que la concentración de daidzeína empezó a caer en la hora 48 de incubación, que se formó el compuesto intermediario dihidrodaidzeína durante el periodo entre la hora 48 y la hora 60, y que la producción de ecual se inició en la hora 48. También pudo confirmarse que el metabolismo de la daidzeína en ecual se había completado sustancialmente en la hora 60.

Aunque los resultados proporcionados anteriormente indican que el metabolismo de la daidzeína en ecual se producía pasando por dicho compuesto intermediario, dihidrodaidzeína, los resultados también sugieren que la formación de dihidrodaidzeína y el metabolismo de la misma en ecual tienen lugar en paralelo.

Ejemplo de ensayo 3Estabilidad a baja temperatura de leches fermentadas que contienen la cepa *Lactococcus* 20-92(1) Protocolo de ensayo

Se cultivó *Lactococcus* 20-92 en 5 ml de un medio líquido de cultivo (medio de base) anaeróbicamente a 37°C durante 24 horas; se utilizó el cultivo resultante para inocular 1 l y 2 l de leche de vaca y 1 l de leche desnatada comercial (10% de sólidos), respectivamente, al nivel de 4% y se cultivó aeróbicamente bajo condiciones fijas a 37°C durante 48 horas. Los cultivos se almacenaron a 4°C.

En el caso de la leche de vaca, se llevó a cabo un seguimiento de la capacidad (actividad) de producción de ecual semanalmente tras completar el cultivo hasta la semana 4 de almacenamiento a baja temperatura (4°C). Además, se reservaron dos de los tubos y se almacenaron hasta el día 42 y 51, respectivamente, y se determinó la actividad en cada caso.

En el caso de la leche desnatada, se determinó la actividad tras completarse el cultivo y en la semana 1 y día 34 de almacenamiento a baja temperatura (4°C).

Las puntuaciones de actividad antes del almacenamiento y al final de cada periodo de almacenamiento se generaron mediante el método anteriormente indicado, que comprendía inocular 5 ml de medio de base suplementado con 10 µg/ml de daidzeína al nivel del 4% (0,2 ml) por triplicado, cultivando el microorganismo anaeróbicamente a 37°C durante 96 horas y determinando las concentraciones de daidzeína, dihidrodaidzeína (producto intermedio) y ecual para las puntuaciones de actividad.

(2) Resultados

Se presentan los resultados en la figura 5. En la figura 5, el eje horizontal representa el periodo de almacenamiento (días) y el eje vertical representa la puntuación de actividad.

Resulta evidente a partir de dicha representación esquemática de los resultados que, en cuanto a la leche de vaca, se mantiene la capacidad (actividad) de producción de ecual hasta la semana 4 de almacenamiento a baja temperatura (4°C) tras haberse completado el cultivo en ambos casos (1 l y 2 l). Además, en el caso de los 2 l de leche de vaca, se encontró una actividad sostenida hasta el día 51, que fue el último día de seguimiento de la

estabilidad de almacenamiento a 4°C. En el caso de 1 l de leche desnatada comercial, también se sostenía aparentemente la capacidad (actividad) de producción de ecuol hasta el día 34, el último de día de seguimiento de la estabilidad de almacenamiento a baja temperatura (4°C) tras completarse el cultivo.

5 Los resultados anteriormente proporcionados indican que la leche fermentada preparada mediante la utilización de *Lactococcus* 20-92 es capaz de conservar la actividad incluso bajo condiciones de almacenamiento a baja temperatura y, por lo tanto, también resulta adecuada para la distribución de alimento.

10 La relación entre la tasa de crecimiento de *Lactococcus* 20-92 y su capacidad (actividad) de producción de ecuol y la cantidad de ecuol producida que se deduce de los resultados obtenidos en los Ejemplos de ensayo 1 a 3 indicados anteriormente puede representarse esquemáticamente tal como se muestra en la figura 6.

15 De esta manera, aunque las condiciones de cultivo variaban según los diferentes medios de cultivo, la capacidad (actividad) de producción de ecuol puede mantenerse tanto en etapa de crecimiento como en la etapa estacionaria. Por otra parte, con respecto a la cantidad producida de ecuol, aparentemente el enzima empieza a expresarse o a activarse para producir ecuol tras un cierto tiempo de retardo en la etapa estacionaria.

Ejemplo de ensayo 4

20 Ensayo de tolerancia a los jugos gástricos de la leche fermentada preparada mediante la utilización de *Lactococcus* 20-92

(1) Protocolo de ensayo

25 Se cultivó anaeróbicamente *Lactococcus* 20-92 en 5 ml de un medio líquido para el crecimiento anaeróbico (caldo BHI, medio de base) a 37°C durante 24 horas. El cultivo resultante (10^9 células/g) se utilizó para inocular 1 l de leche de vaca al nivel de 4% y se incubó aeróbicamente bajo condiciones fijas a 37°C durante 48 horas. Tras completarse el cultivo, la leche se almacenó a 4°C y, al considerarla leche fermentada, se sometió al ensayo siguiente.

30 A modo de jugos gástricos artificiales, se prepararon tampones de glicina 50 mM-HCl suplementados con pepsina al 0,045% (pH 2,5 y pH 3,0). A modo de control se preparó tampón de glicina 50 mM-HCl (pH 6,0).

35 A 9 ml de cada jugo gástrico artificial se añadió 1 ml de la leche fermentada almacenada a temperatura baja y la mezcla se incubó (se cultivó) aeróbicamente bajo condiciones fijas en un incubador a 37°C.

Se fijó el tiempo de incubación en 1 h, 2 h y 3h, y se muestrearon alícuotas de 0,1 ml y 0,2 ml de cada cultivo antes del inicio de la incubación y al final de cada periodo de incubación, y se sometieron a la determinación del recuento de células viables (en el caso de 0,1 ml) y de capacidad (actividad) de producción de ecuol (en el caso de 0,2 ml).

40 La determinación del recuento de células viables se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo de ensayo 1-(1), que comprendía muestrear 0,1 ml de cada cultivo, diluir la muestra 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 veces con PBS(-) de Nissui, utilizando 0,1 ml de cada dilución para recubrir medio agar GAM, incubando el medio inoculado aeróbicamente a 37°C durante 24 horas y realizando un recuento de las colonias formadas sobre el agar GAM.

45 La determinación de la capacidad (actividad) de producción de ecuol se llevó a cabo según el procedimiento descrito anteriormente, en el Ejemplo de ensayo 1-(1), que comprendía inocular 5 ml de medio de base suplementado con daidzeína con 0,2 ml (4%) de la muestra (por triplicado), incubar el medio inoculado anaeróbicamente a 37°C durante 96 horas y medir las concentraciones de daidzeína, dihidrodaidzeína (producto intermedio) y ecuol en el medio para las puntuaciones de actividad.

(2) Resultados

55 Los resultados obtenidos se presentan en la figura 7-A (recuento de células viables) y B (concentración de ecuol).

En la figura 7-A, el eje horizontal representa el tiempo de incubación (h) y el eje vertical representa el recuento de células viables (log(UFC/ml) en la leche).

60 En la figura 7-B, el eje horizontal representa el tiempo de incubación (h) y el eje vertical representa la actividad de ecuol (puntuación).

65 Puede deducirse lo siguiente a partir de los resultados presentados en las figs. 7-A y 7-B. De esta manera, en la solución de tampón a pH 6,0, el recuento de células viables se sostuvo al nivel de 10^8 células/ml hasta la hora 3 y en este punto también se sostenía la capacidad (actividad) de producción de ecuol. En el jugo gástrico artificial a pH 3,0, se sostuvo el recuento de células viables hasta la hora 3 de incubación y en este punto también se sostenía la actividad. Por otra parte, en el jugo gástrico artificial a pH 2,5, se inició una caída marcada del recuento de células

viables en la hora 2 de incubación y la actividad también desapareció.

En un estudio en el mismo sistema de ensayo indicado anteriormente, los probióticos (microorganismos que pasan hasta el canal intestinal vivos y muestran actividad fisiológica ahí) presentes en el mercado se informa que no varía su recuento de células viables a pH 3,0 pero que se reduce significativamente a pH 2,5. Esto implica que la tolerancia al jugo gástrico a pH 3,0 permite que estos microorganismos pasen por el estómago vivos. Por lo tanto, la leche fermentada preparada mediante la utilización de *Lactococcus* 20-92 se espera razonablemente que lleve los organismos vivos hasta el intestino, dejando que muestren una actividad sostenida en la parte inferior del intestino delgado y en el intestino grueso.

Ejemplo de ensayo 5

Ensayo de tolerancia biliar de *Lactococcus* 20-92

Se determinó la tolerancia a la bilis con VITEK GPI Card (Nippon Biomérieux Co., Ltd.) y se evaluó mediante la utilización de las tasas de crecimiento de la cepa de la invención en bilis al 10% y al 40% como indicadores.

(1) Protocolo de ensayo

Se extendió *Lactococcus* 20-92 (10^{8-9} células) sobre agar tripticasa de soja suplementado con 5% de sangre ovina y se cultivó aeróbicamente a 37°C durante 24 horas. La colonias sobre el medio tras completarse el cultivo se levantaron con un asa de platino y se preparó una suspensión homogénea del mismo en solución salina estéril al 0,5%. Esta suspensión se aplicó a una tarjeta GPI de VITEK y, tras incubar durante 15 horas a 35°C, se evaluó la tasa de crecimiento de la cepa en presencia de bilis mediante la utilización del pigmento (indicador de pH). Se preparó la bilis mediante disolución de una cantidad predeterminada de bilis en polvo en agua destilada estéril y se aplicó a la tarjeta previamente.

(2) Resultados

Los resultados del ensayo anteriormente indicado muestran que *Lactococcus* 20-92 crece en bilis al 10% y al 40%, demostrando tolerancia a la bilis al 40%.

Ejemplo de ensayo 6

Ensayo de hemólisis de *Lactococcus* 20-92

(1) Protocolo de ensayo

Se extendió *Lactococcus* 20-92 (10^{8-9} células) sobre agar tripticasa de soja suplementado con sangre ovina al 5% y se cultivó anaeróbicamente ($N_2:CO_2:H_2=8:1:1$) a 37°C durante 24 a 48 horas. Se observó la porción circundante a la colonia formada sobre el medio tras completarse el cultivo y se evaluó el potencial hemolítico según el grado de descomposición de los componentes hemáticos (despigmentación o decoloración).

(2) Resultados

Como resultado del ensayo anteriormente indicado, no se observó despigmentación (aparición de una zona incolora transparente) en torno a la colonia, indicando que *Lactococcus* 20-92 no provoca la β -hemólisis y, en este aspecto, es un microorganismo seguro.

Ejemplo de ensayo 7

Ensayo de actividad enzimática infiltrante de células de *Lactococcus* 20-92

Con respecto a la invasión sistémica de las bacterias del ácido láctico ingeridas, una depresión en la función defensiva del mesenterio o la alteración del mesenterio mismo puede considerarse como el factor en el lado huésped. Como factor en el lado bacteria, puede indicarse su actividad enzimática (enzimas infiltrantes de células) que descomponen los proteoglicanos complejos de lípido-proteína que constituyen el mesenterio.

El presente ensayo estaba destinado a investigar si *Lactococcus* 20-92 presentaba actividades de enzima infiltrante de células, es decir actividades de colagenasa (gelatinasa), hialuronidasa y sialidasa (neuraminidasa), o no, y se llevó a cabo de la manera siguiente.

(1) Protocolo de ensayo

Se extendió *Lactococcus* 20-92 (tamaño de extensión: 10^{8-9} células) sobre medio agar suplementado con sangre y se cultivaron anaeróbicamente ($N_2:CO_2:H_2=8:1:1$) a 37°C durante 24 a 48 horas.

Las colonias sobre el medio después del cultivo se levantaron con un asa de platino y se suspendieron en agua destilada estéril para preparar una suspensión homogénea. Mediante la utilización de esta suspensión, se investigó la presencia o ausencia de colagenasa (gelatinasa) con ApiTM (Nippon Biomérieux Co., Ltd.) utilizando la degradación de la gelatina como indicador.

Además, el ensayo de si *Lactococcus* 20-92 presenta actividades de hialuronidasa y sialidasa (neuraminidasa) o no se llevó a cabo mediante un procedimiento que comprendía incubar *Lactococcus* 20-92 en solución de tampón de Tris-HCl (pH 7,0) que contenía ácido hialurónico o ácido siálico como sustrato (37°C, aeróbico, 15 minutos para la actividad de sialidasa y 24 horas para la actividad de hialuronidasa) y medir los grados de reducción de las concentraciones de los sustratos respectivos.

(2) Resultados

Lactococcus 20-92 no mostraba actividades de colagenasa (gelatinasa), hialuronidasa y sialidasa (neuraminidasa).

De esta manera, en vista del hecho de que la cepa de la invención no presentaba enzimas infiltrantes de células que constituyesen un factor de infectividad, se confirmó que la cepa también era un microorganismo altamente seguro desde el punto de vista de la infectividad.

Ejemplo de ensayo 8

Ensayo de resistencia a vancomicina

La adquisición de resistencia a antibióticos (mutación) por las bacterias ha sido una cuestión de grave preocupación en los últimos años. No es raro que pacientes infectados por bacterias que han adquirido resistencia a antibióticos mueran porque no responden a los antibióticos. En particular, la aparición de bacterias resistentes a la vancomicina (REV) es una cuestión gravemente preocupante en el campo de la medicina clínica actual. Además, existe la preocupación de que si los organismos ingeridos que contienen el gen de resistencia a la vancomicina alcanzan y se establecen en el intestino, en donde entrarán en contacto con microorganismos virulentos o infecciosos (bacterias patógenas), el gen de resistencia a la vancomicina podría transferirse a las bacterias patógenas, resultando en que estas bacterias también adquieran la resistencia a la vancomicina. Por lo tanto, resulta necesario, como mínimo, que los microorganismos que se utilizan como probióticos no sean organismos resistentes a la vancomicina.

El presente ensayo estaba destinado a investigar la susceptibilidad de *Lactococcus* 20-92 a la vancomicina y se llevó a cabo de la manera siguiente.

(1) Protocolo de ensayo

Se llevó a cabo el ensayo de susceptibilidad a la vancomicina utilizando Sensi-Disk (producto de Nippon Becton-Dickinson Company, Ltd.). Se extendieron *Lactococcus* 20-92 (tamaño de extensión: 10^{8-9} células) sobre medio agar GAM, se aplicó un disco que contenía 30 µg de vancomicina sobre el medio y se llevó a cabo un cultivo aeróbico a 37°C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación indicado, se midió el diámetro de la zona de inhibición formada en torno al disco y se evaluó según una tabla de evaluación.

(2) Resultados

El diámetro de la zona de inhibición para *Lactococcus* 20-92 fue de $11,9 \pm 0,2$ mm y la evaluación de la susceptibilidad según la tabla de evaluación fue positiva (susceptible=10 mm). Este resultado indica que la cepa de la invención no es una cepa resistente a la vancomicina y, por lo tanto, se considera segura.

En el Ejemplo 2, a continuación, se proporciona un ejemplo de producción de ecuol a partir de daidzeína mediante la utilización de la cepa de bacteria del ácido láctico de la invención.

Ejemplo 2

Producción de ecuol

Se preparó un ml de suspensión que contenía 10^7 a 10^9 células de *Lactococcus* 20-92 (n° FERM BP-10036) en medio GAM para el cultivo de bacterias anaeróbicas y esta suspensión se añadió a 100 g de leche de soja (concentración de sólidos: aproximadamente 2,2%). La mezcla se incubó anaeróbicamente a 37°C durante 72 a 96 horas y se realizó un seguimiento mediante HPLC del ecuol producido en el cultivo. El contenido de compuesto daidzeína de dicha leche de soja era de 95 µg/ml calculado como daidzeína.

El resultado indica la formación de $10,7 \pm 6,3$ µg/ml (media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos) de ecuol en el cultivo de leche de soja anteriormente indicado.

Los resultados anteriores demuestran claramente que mediante la explotación del microorganismo de la invención puede producirse ecual a partir de compuestos de daidzeína contenidos en materiales alimentarios con una buena eficiencia y a bajo coste.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene *Lactococcus garvieae* productor de ecuol que comprende, como componente esencial de la misma, un *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad de utilizar por lo menos un compuesto de daidzeína seleccionado de entre el grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína, para producir ecuol.
5
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho *Lactococcus garvieae* es *Lactococcus* 20-92 depositado como FERM BP-10036.
10
3. Composición según la reivindicación 1, que comprende además harina de soja o leche de soja.
4. Composición según la reivindicación 1, que se encuentra en forma de una bebida o de un producto lácteo.
5. Composición según la reivindicación 1, que se encuentra en forma de un producto de fermentación de leche de soja.
15
6. *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad de utilizar por lo menos un compuesto de daidzeína seleccionado de entre el grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína, para producir ecuol.
20
7. *Lactococcus garvieae* según la reivindicación 6, como se ha depositado como FERM BP-10036.
8. Utilización de una composición que contiene *Lactococcus garvieae* productor de ecuol que comprende como componente esencial de la misma *Lactococcus garvieae* para la producción de ecuol utilizando por lo menos un compuesto de daidzeína seleccionado de entre el grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína.
25
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que dicho *Lactococcus garvieae* es *Lactococcus* 20-92, depositado con el nº FERM BP-10036.
30
10. Utilización según la reivindicación 8, en la que la composición comprende además harina de soja o leche de soja.
11. Utilización según la reivindicación 8, en la que la composición se encuentra en forma de una bebida o de un producto lácteo.
35

Fig. 1

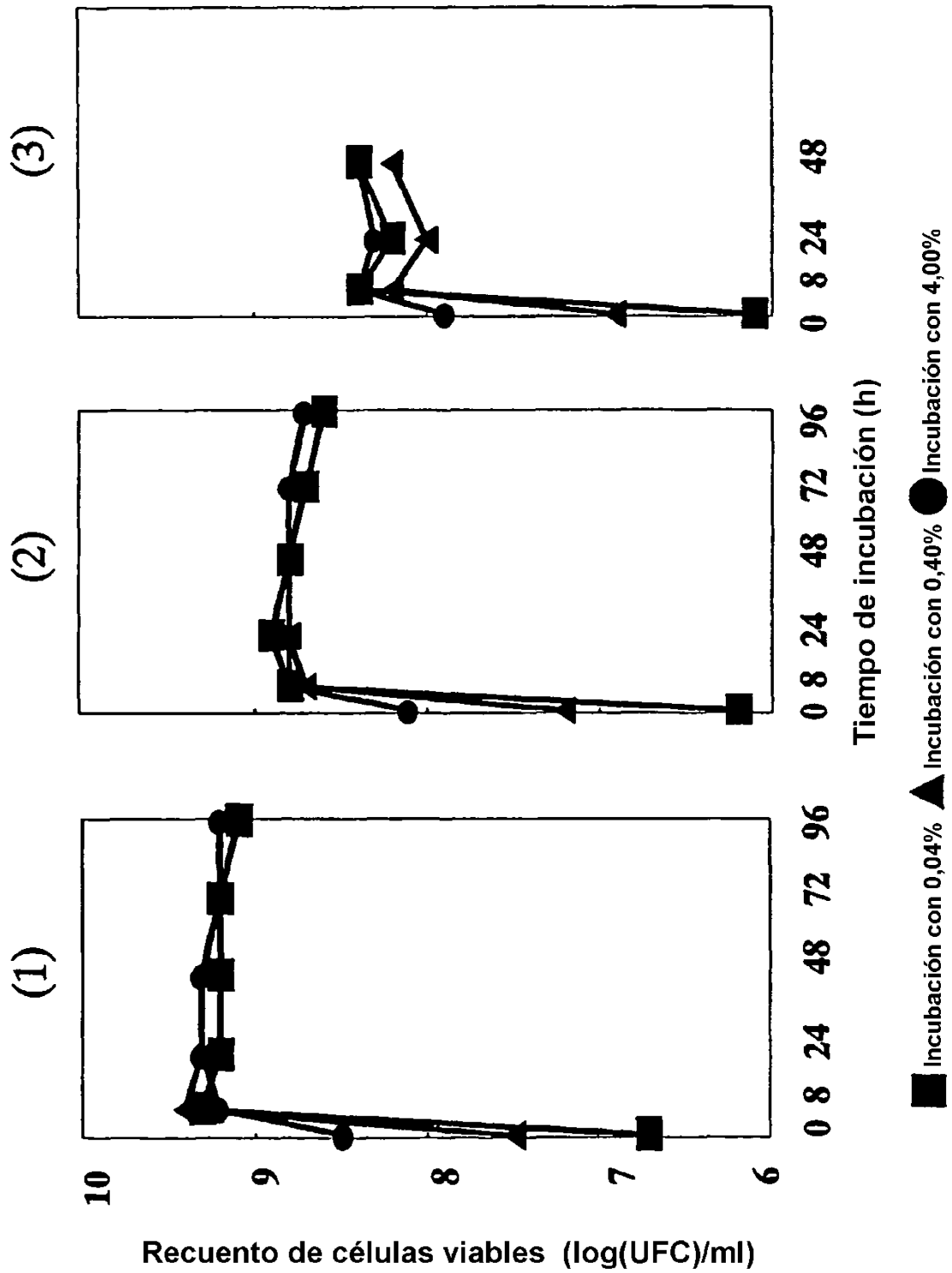


Fig. 2

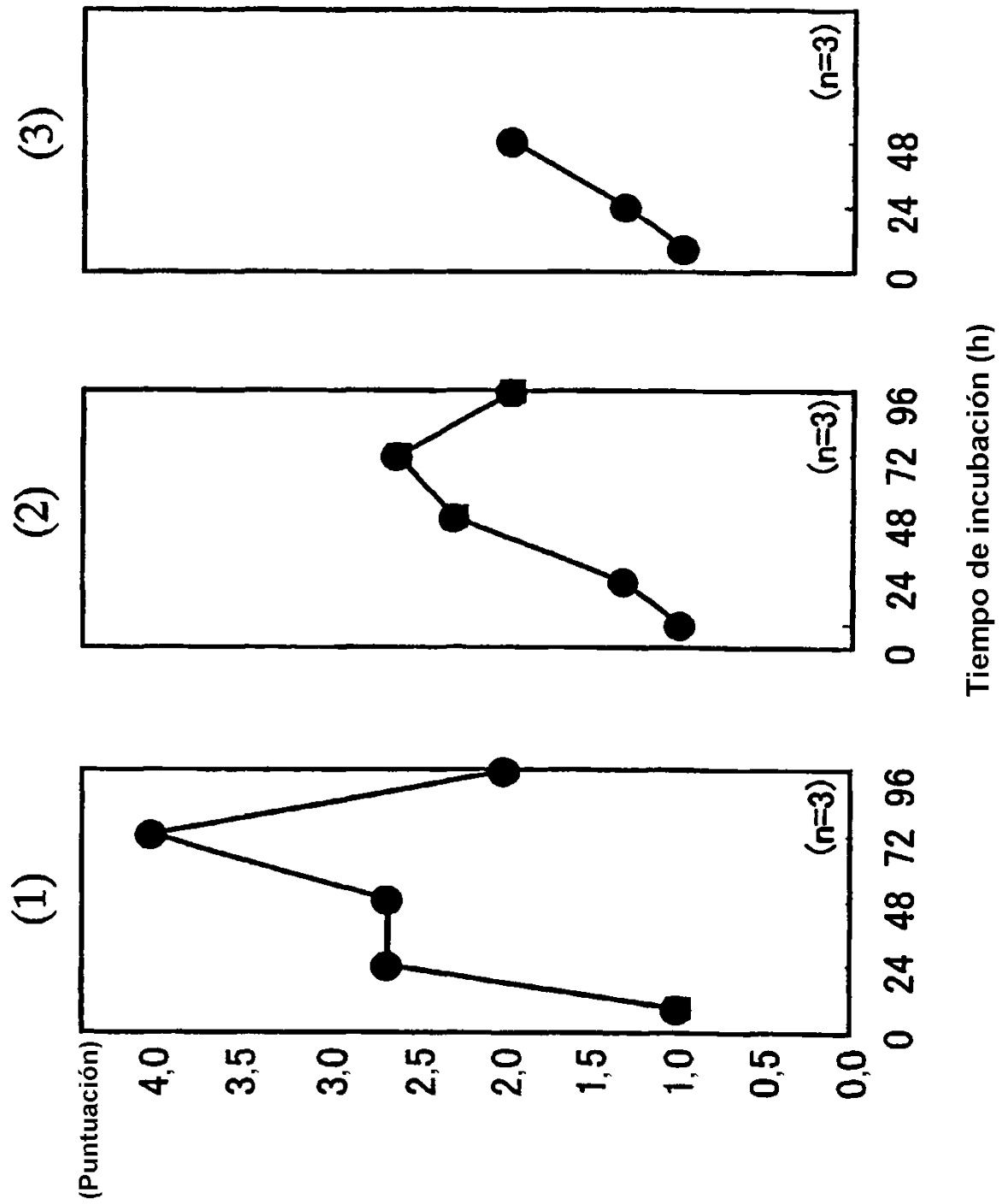


Fig. 3

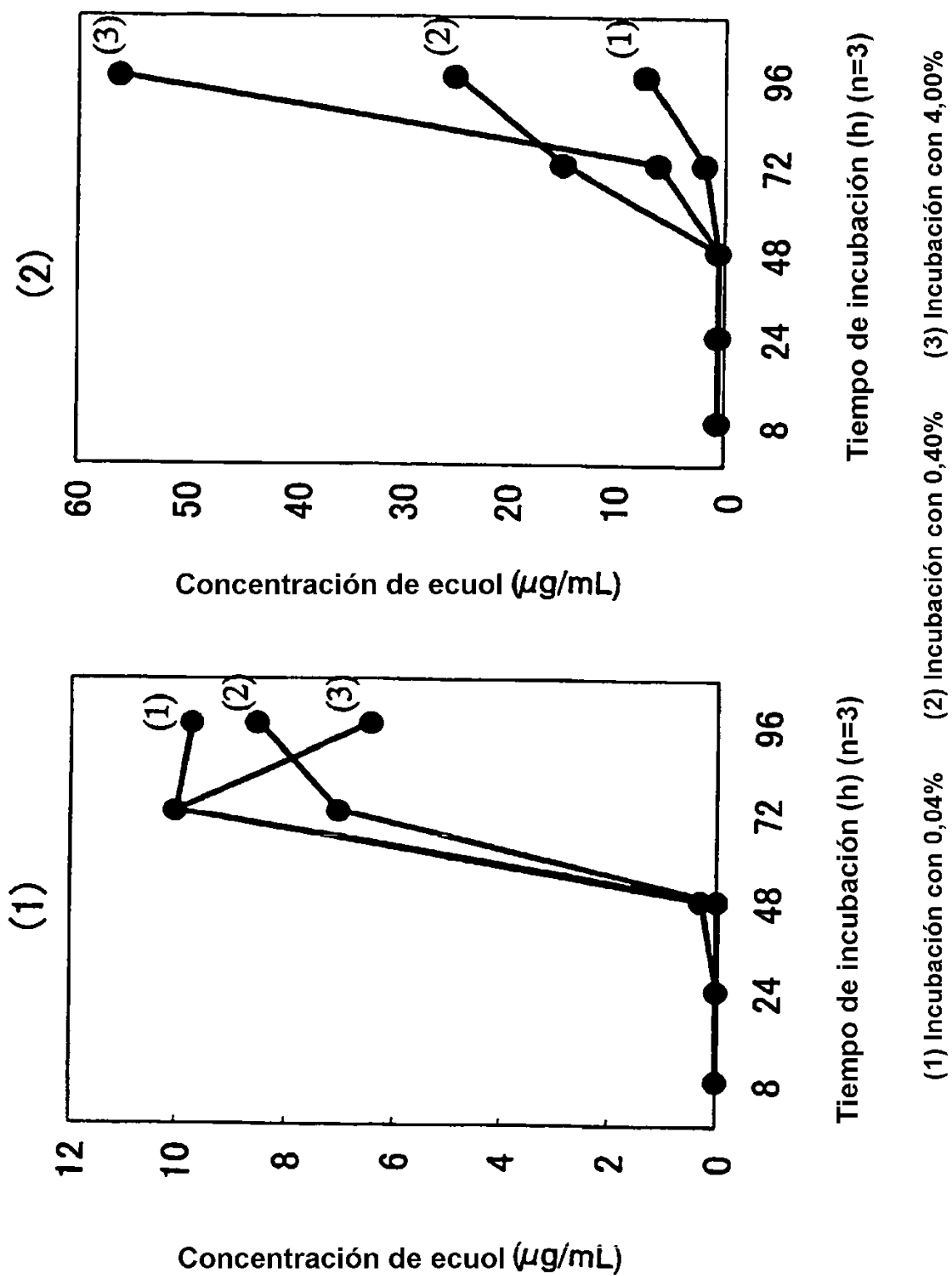


Fig. 4

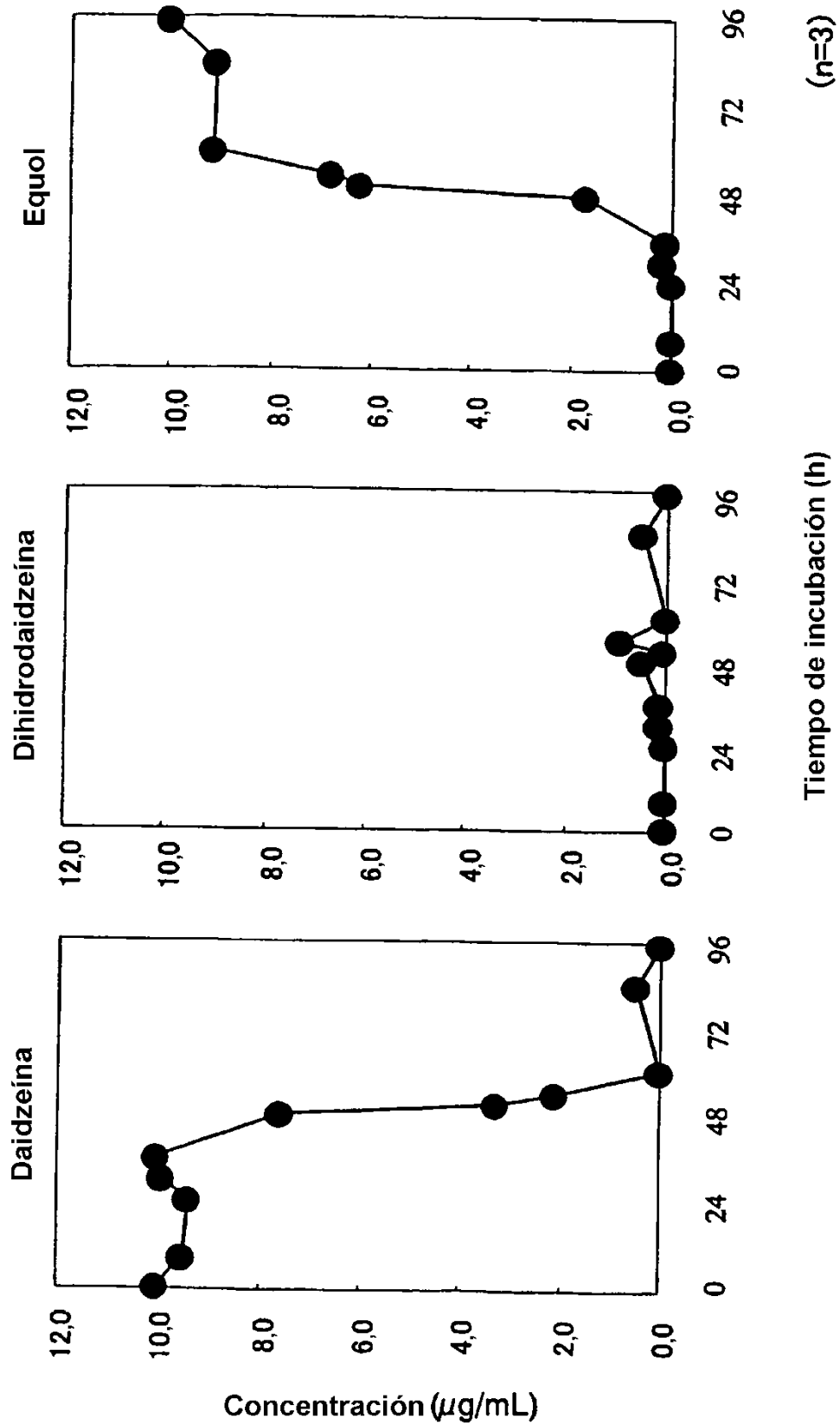
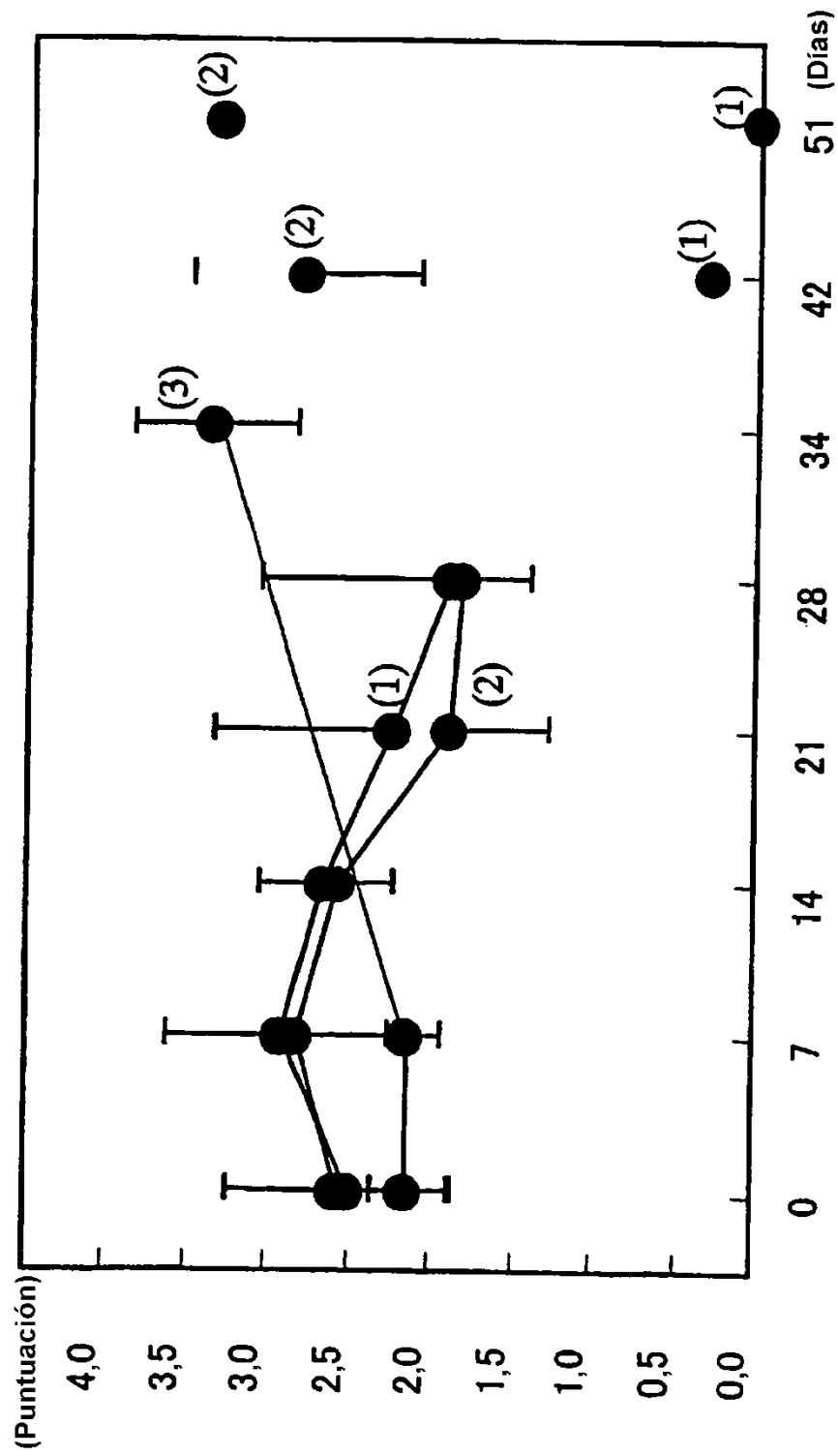


Fig. 5



(1) Leche de vaca 1 l (n=4) (2) Leche de vaca 2 l (n=4) Leche desnatada comercial 1 l (n=2)

Fig. 6

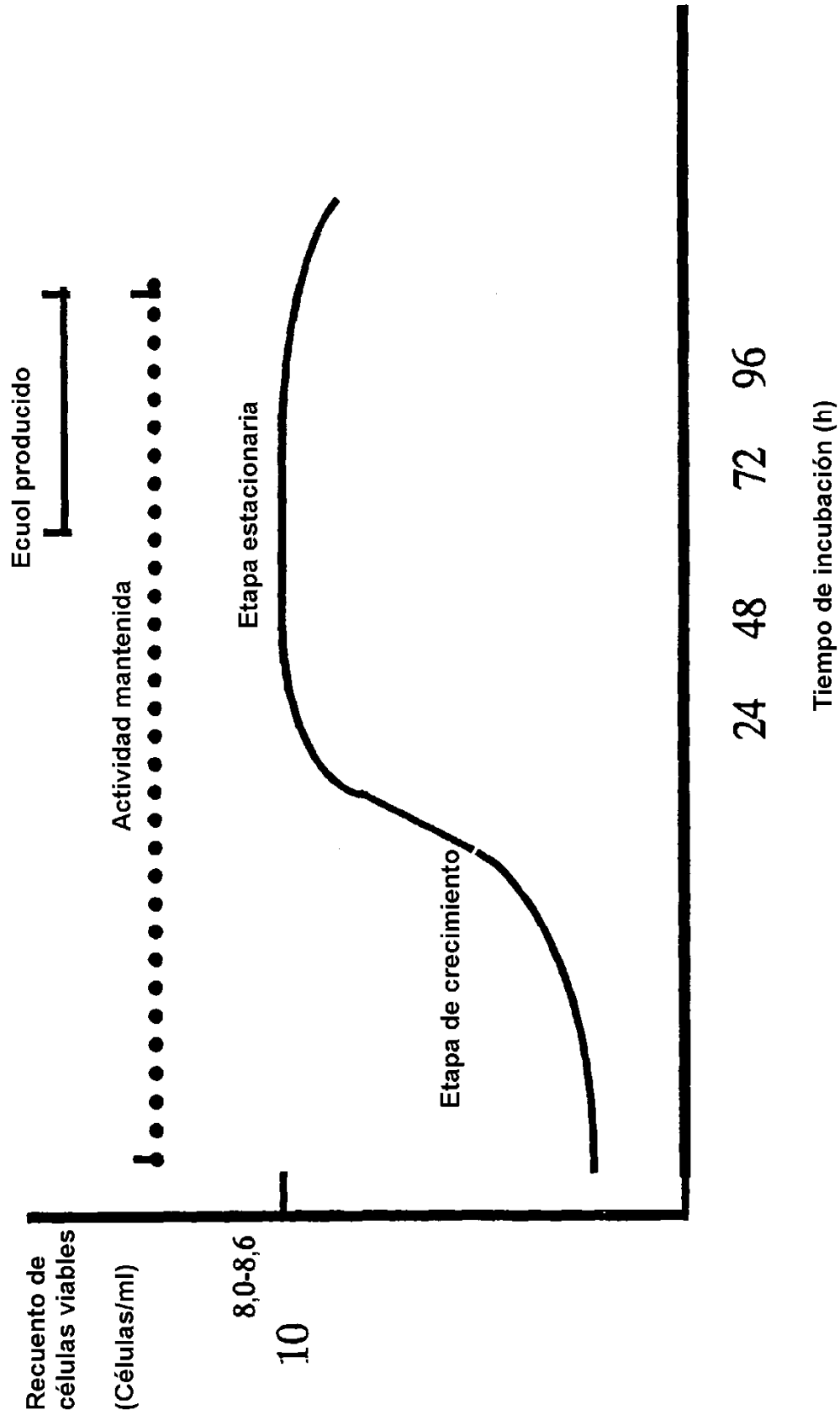


Fig. 7

