

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 607**

21 Número de solicitud: 201230152

51 Int. Cl.:

A23L 1/05 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.02.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.09.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**DELGADO PALACIO, Susana y
MAYO PÉREZ, Baltasar**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Bacterias ácido-lácticas que se desarrollan en leche de soja y activan las isoflavonas, producto que las contiene y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

La presente invención hace referencia a una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus*, caracterizada porque presenta actividad -galactosidasa y actividad -glucosidasa, para la producción de isoflavonas activas. Así mismo, la presente invención hace referencia al uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* para la elaboración de un producto fermentado funcional a base de leche de soja con un alto contenido en isoflavonas activas, para la elaboración de un suplemento alimenticio, y para la elaboración de un nutraceútico a base de concentrado o liofilizado bacteriano. Por último, la presente invención protege un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos.

ES 2 421 607 A1

DESCRIPCIÓN

Bacterias ácido-lácticas que se desarrollan en leche de soja y activan las isoflavonas, producto que las contiene y sus aplicaciones

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 Los microorganismos que se pretenden proteger son potencialmente útiles para la elaboración de alimentos, de manera que la patente se centra dentro del sector de la alimentación. También pudieran servir para la formulación de suplementos alimenticios, con lo que, en un segundo lugar, podría dirigirse al sector farmacéutico.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 Los fitoestrógenos son polifenoles de las plantas con estructura y propiedades químicas similares a las de las hormonas estrogénicas (Crozier et al., 2009). Las moléculas con actividad estrogénica están presentes en una gran variedad de plantas, aunque los principales fitoestrógenos de la dieta humana están restringidos a un pequeño número de flavonoides, lignanos, comestanos y estilbenos. Todos estos compuestos tienen en común que necesitan ser activados por el metabolismo de la microbiota intestinal para alcanzar su actividad biológica (Kemperman et al., 2010). El consumo de fitoestrógenos se asocia con diversos beneficios para la salud, como una mayor actividad intestinal, reducido riesgo de enfermedades cardiovasculares, y la prevención de cáncer de próstata y pecho, entre otros (Bhupathy et al., 2010; Virk-Baker et al., 2010).

15 Las isoflavonas son una clase de fitoestrógenos no esteroideos capaces de unirse de manera conformacional a los receptores de los estrógenos, de manera que pudieran considerarse moduladores estrogénicos. Las isoflavonas presentan actividad estrogénica o antiestrogénica dependiendo de la concentración de estrógenos endógenos y la cantidad y tipo de los receptores celulares (Crozier et al., 2009). Parece que actúan a través de la inhibición de las tiroxín quinazinas y ADN topoisomerasas, lo que podría contribuir a sus actividades anticancerígenas. De manera más reciente, se le atribuyen también actividades antioxidantes y la capacidad de quelar metales.

20 Las isoflavonas están presentes en altas concentraciones en las habas de soja y en los productos derivados de la soja. De hecho, el elevado consumo de soja en los países asiáticos se ha asociado tradicionalmente con una menor incidencia de muchas enfermedades estrógeno-dependientes, en comparación con la frecuencia en las que se encuentran en las sociedades occidentales.

25 Como otros fitoestrógenos, las isoflavonas están mayoritariamente (>80%) conjugadas con azúcares en forma de daidzeína, genistina y glicitina (Figura 1). Estos glucósidos apenas se absorben en el intestino y tienen baja actividad estrogénica, requiriendo su hidrólisis para una mejor biodisponibilidad, plena actividad biológica y para su transformación en derivados estrogénicos más potentes (Crozier et al., 2009). La hidrólisis la llevan a cabo enzimas endógenas, pero sobre todo enzimas de los microorganismos de la microbiota intestinal. Los glucósidos flavonoides se hidrolizan parcialmente en el intestino por β -glucosidasas intestinales, y las agliconas resultantes se absorben a través del epitelio. Las isoflavonas no absorbidas y las que se excretan por la circulación entero-hepática como conjugados con ácido glucurónico o sulfatos llegan al colon, donde son desconjugadas de nuevo por enzimas bacterianas y reabsorbidos o metabolizados por acción microbiana (Yuang et al., 2007). Las transformaciones microbianas incluyen la dehidroxilación, la reducción, la rotura del anillo C y la desmetilación (Figura 1). En estas transformaciones algunos de los compuestos que se forman son inactivos, mientras que otros presentan más actividad biológica (Figura 1). Sin embargo, el conocimiento de los microorganismos intestinales y sus actividades es tan limitado que no se conocen con precisión ni las rutas de activación ni las de degradación.

30 Los estudios moleculares más recientes indican que en las poblaciones intestinales humanas hay una gran diversidad microbiana con grandes diferencias interindividuales. La diversidad influye de manera decisiva en el metabolismo de las isoflavonas. Por ejemplo, parece claro que solo entre el 30 y el 50% de los humanos son capaces de producir equol de la daidzeína, mientras que entre el 80 y el 90% de los sujetos producen el derivado inactivo O-DMA (Yuang et al., 2007). El equol es el metabolito con actividad estrogénica y antioxidante más potente, y con un mayor efecto antiandrogénico. Además, químicamente es más estable y se absorbe mejor en el colon que la daidzeína. Por tanto, la biodisponibilidad de las isoflavonas y la formación de los metabolitos adecuados por las poblaciones microbianas intestinales es esencial para obtener todos sus efectos beneficiosos (de Cremoux et al., 2010).

35 Durante la menopausia, la mujer asiática sufre menos incidencias de sofoco que las mujeres occidentales, lo que se asocia con su mayor consumo de soja (Molla et al., 2011). Sin embargo, el tratamiento de los síntomas de la menopausia con isoflavonas de soja se popularizó en todo el mundo tras los resultados de la Women's Health Initiative (Prentice, 2008) que mostraron una incidencia mayor de enfermedades cardiovasculares y cáncer de útero y pecho en mujeres menopáusicas tratadas con un reemplazamiento hormonal (Molla et al., 2011). En la actualidad en España, cerca del 35% de las mujeres climatéricas utilizan isoflavonas para el tratamiento de los sofocos (Palacios y col., 2003). Sin embargo, la efectividad de este tratamiento, según los últimos estudios, no parece ser muy concluyente (Bolaños et al., 2010; Messina, 2010; Taku et al., 2010), lo que podría estar relacionado con la gran

variabilidad interpersonal de la microbiota intestinal. Para aumentar la efectividad de las isoflavonas modulando la microbiota intestinal, desde la asociación española para el estudio de la menopausia (AEEM), se ha sugerido la administración de probióticos. Sin embargo, los probióticos actuales no se han seleccionado ni por sus actividades glucosídicas ni por su capacidad activadora de isoflavonas (Gareau et al., 2010).

5 La presencia en soja de proteínas biológicamente activas y de isoflavonas hace que los productos derivados de la soja se consideren alimentos funcionales (Food and Drug Administration, 1999). La combinación de la soja con probióticos resultaría presumiblemente en cantidades mayores de agliconas, lo que contribuiría a una mayor biodisponibilidad de éstas (Wei et al., 2007), además de conferir los beneficios para la salud que proveerían los probióticos. Los alimentos funcionales derivados de la soja podrían servir para el tratamiento de los síntomas de la menopausia en mujeres, pero podrían mejorar también los marcadores de salud en los consumidores en general.

10 En la actualidad, hay descritas algunas cepas de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias capaces de liberar agliconas (Tsangalis et al., 2002; Champagne et al., 2010; Rekha and Vijayalakshmi, 2010). Esta actividad parece estar relacionada con las actividades β -glucosidásicas.

15 En el estado de la técnica las cepas *Lactobacillus rhamnosus* G92 y *L. plantarum* E112 han sido identificadas como posibles bacterias con actividad probiótica (Ruas-Madiedo P. et al., 2007).

20 CN101792779 (UNIV JILIN AGRICULTURAL, 2010), describe un método de preparación de isoflavonas, preferentemente mediante la fermentación ácido láctica de una bacteria *Galactococcus* manipulada genéticamente. Este método proporciona un nuevo enfoque sobre la fuente de las isoflavonas al añadir al sustrato de fermentación una bacteria manipulada genéticamente para producir isoflavonas. Se emplea como bacteria hospedadora *Lactococcus lactis* NZ3900 en la que se ha reemplazado los genes de resistencia a antibiótico mediante el plásmido pNZ8149.

25 JP2001340059 (YAKULT HONSHA KK, 2001), describe un producto basado en leche fermentada de soja que contiene altos niveles de agliconas, obtenido mediante un proceso donde interviene un microorganismo con la capacidad de dividir los glucósidos de isoflavonas para obtener agliconas. Entre los microorganismos que cita este documento de patente, se encuentran especies de *Lactobacillus*: *L. casei*, *L. rhamnosus*, y *L. plantarum*, así como distintas especies de *Bifidobacterium*.

30 KR20080102773 (EROM CO LTD, 2008), describe el uso de una cepa de *Lactobacillus plantarum* para la producción de un producto fermentado a base de soja caracterizado por un alto contenido en isoflavonas activas o agliconas. La citada cepa de *Lactobacillus plantarum* capaz de crecer y desarrollarse en la leche de soja (actividad α -galactosidasa), y capaz de activar las isoflavonas de la soja (actividad β -glucosidasa), es *Lactobacillus plantarum* YS 712.

35 KR20030097264 (HWANG IN KYEONG & JEON KI SUK, 2003) describe un producto funcional a base de leche fermentada de soja en el que los glucósidos de isoflavonas (genistina y la daidcina) que contiene la leche de soja se convierten totalmente en sus formas derivadas activas o agliconas. Este documento también divulga el método de producción de dicho producto funcional, en el que participan bacterias del ácido láctico y bifidobacterias, obteniéndose isoflavonas activas con alta actividad fisiológica. Sin embargo, en este documento de patente, no se identifican las bacterias del ácido láctico que se emplean, sólo las bifidobacterias.

40 En la actualidad, existe la necesidad de la identificar nuevas bacterias del ácido láctico capaces de crecer y desarrollarse en la leche de soja (actividad α -galactosidasa), además de ser capaces de desconjugar las isoflavonas glicosiladas de la soja (actividad β -glucosidasa) para asegurar la alta producción de isoflavonas activas con efectos beneficiosos para la salud, incluyendo una mejor biodisponibilidad, capacidad de absorción y mayor efecto estrogénico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 La presente invención hace referencia a tres cepas bacterianas del grupo del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus*, caracterizadas por que presenta actividad α -galactosidasa y actividad β -glucosidasa con un porcentaje de desconjugación de las isoflavonas-glucósidos comprendido entre un 50% y un 95%, para la producción de isoflavonas activas.

50 Así mismo, la presente invención hace referencia al uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente, para la elaboración de un alimento fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas seleccionado de entre el siguiente grupo: leche, yogur, queso, miso, tempeh, y tofu.

Otra realización de la presente invención hace referencia al uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente, para la elaboración de un suplemento alimenticio que puede encontrarse en formato de píldoras.

Otra realización de la presente invención hace referencia al uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente, para la elaboración de un nutraceútico a base de concentrado o liofilizado bacteriano.

5 Otra realización de la presente invención hace referencia al uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos.

10 Por último, la presente invención protege un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos, caracterizado porque dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Las isoflavonas de la soja son los fitoestrógenos más comunes en la dieta tradicional de las comunidades asiáticas, y cada vez más en las dietas occidentales. Su consumo se ha asociado con diversos efectos beneficiosos para la salud, incluyendo una mejor salud intestinal y una tasa menor de enfermedades mediadas por estrógenos, incluyendo distintos tipos de cáncer. En la naturaleza, las isoflavonas se encuentran en su mayor parte (más del >80%) unidas a residuos de azúcares, dando lugar a los compuestos daidceína, genistina y glicitina. Estos β -glucósidos tienen poca absorción y muy baja actividad estrogénica. Las enzimas intestinales endógenas, y sobre todo las de la microbiota intestinal, se encargan de su activación. Sin embargo, solo un 30% de los individuos que consumen soja producen equol, compuesto derivado de la daidceína con potente actividad y, por tanto, con una mayor influencia sobre la salud. La incapacidad de producir equol puede resultar de la ausencia de la maquinaria bioquímica necesaria pero también de una escasa o nula actividad de transformación de las isoflavonas conjugadas a sus derivados activos (agliconas).

20 Hemos analizado el perfil glucosídico de una serie de cepas de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus* y aisladas del tracto gastrointestinal humano. Las bacterias que se desean proteger presentan elevados niveles de actividad β -glucosidasa, tanto en medio de cultivo como en leches de soja comerciales comprendidos entre 5-75mU/ml en bebidas de soja fermentadas, y 7-20 mU de actividad en lisados celulares. Estos niveles son necesarios para llevar a cabo la desconjugación de las isoflavonas glicosiladas y son de especial interés para asegurar la producción de isoflavonas activas con mejor biodisponibilidad, capacidad de absorción y mayor efecto estrogénico que los precursores conjugados o glicosilados de la dieta. Estas propiedades no son propias de un género o especie determinada, sino que son privativas de cepa. En concreto, las cepas que se quieren proteger son las siguientes:

- *Lactobacillus plantarum* E112
- *Lactobacillus casei* BA3
- *Lactobacillus rhamnosus* G92

35 **Cepa *Lactobacillus plantarum* E112 (CECT 8083)**

40 La siguiente cepa ha sido depositada el 17 de Enero de 2012, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por Baltasar Mayo Pérez, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), Carretera de Infesto, s/n, 33300-Villaviciosa, (Asturias) ESPAÑA.

El depósito de la cepa depositada cuya referencia es ***Lactobacillus plantarum* E112**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8083** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

Cepa *Lactobacillus casei* BA3 (CECT 8084)

45 La siguiente cepa ha sido depositada el 17 de Enero de 2012, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por Baltasar Mayo Pérez, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), Carretera de Infesto, s/n, 33300-Villaviciosa, (Asturias) ESPAÑA.

50 El depósito de la cepa depositada cuya referencia es ***Lactobacillus casei* BA3**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8084** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

Cepa *Lactobacillus rhamnosus* G92 (CECT 8085)

La siguiente cepa ha sido depositada el 17 de Enero de 2012, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por Baltasar Mayo Pérez, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, (Asturias) ESPAÑA.

El depósito de la cepa depositada cuya referencia es ***Lactobacillus rhamnosus* G92**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8085** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

Todas ellas han sido identificadas a nivel molecular por medio de la secuenciación y análisis del gen que codifica el ARNr 16S, y han sido caracterizadas a nivel fenotípico y genético. Su participación en la activación de isoflavonas de la soja se ha comprobado utilizando precursores glicosilados como sustrato por medio de cromatografía en capa fina (TLC) (Figura 2) y mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), tal y como se describe en el Ejemplo 1. Las cepas se cultivaron posteriormente en leches de soja comerciales, en las que se evaluó y se cuantificó el crecimiento (unidades formadoras de colonia/ml) y la capacidad activadora (porcentaje de desconjugación de las isoflavona-glucósido) (Figura 3 y 4). En occidente la leche de haba de soja no se consume de manera directa, sino en forma de preparados alimenticios. Es importante, pues, que los fermentos que se añaden a la leche de soja comercial para su transformación se desarrollen y tengan actividad en esos preparados alimenticios que consisten en leche de soja con aditivos como lactosa, sacarosa, correctores de la acidez y otros. Además de la activación de las isoflavonas, las cepas se desarrollan en la leche de soja y acidifican el producto disminuyendo el pH de la leche hasta 5,5-3,5 (Figura 5), dando lugar a una leche acidificada tipo yogur con buen aspecto y sin defectos visuales o aromáticos. Al cabo de 24 h de incubación en este tipo de producto, las isoflavonas se transforman entre un 50 y un 95% en sus derivados activos (Figura 6). La viscosidad de las leches de soja fermentada presenta un valor de 150-450 mPa.s (Figura 7), similar a la del yogur. Las cepas referidas no inhiben el crecimiento de cepas de los fermentos clásicos de yogur (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), por lo que podrían utilizarse en combinación con éstas. Por otro lado, la activación de las isoflavonas se produce también sin que sea necesario el crecimiento de las cepas; probablemente debido a la lisis de una parte de la población, con la consiguiente liberación del o de los enzimas implicados en la activación. En este caso, sería necesario añadir al producto de soja una gran densidad celular. Las tres cepas presentan resistencia a la acidez y a la presencia de sales biliares, siendo capaces de crecer en presencia de un 2% de bilis y a pH 3,5; condiciones que influyen en la supervivencia y colonización del tracto gastrointestinal. Su consumo podría facilitar la presencia de cepas con actividades enzimáticas deseables para activar las isoflavonas de la dieta.

Los alimentos o suplementos alimenticios formulados con estos lactobacilos podrían considerarse funcionales, dado que aportarían una ventaja adicional para la salud más allá de su función nutritiva. La producción de β -glucosidasa por estas cepas podría considerarse una actividad probiótica, ya que la actividad de este enzima aumenta la disponibilidad de isoflavonas. En particular, alimentos y suplementos podrían ser especialmente beneficiosos para el tratamiento y la prevención de los síntomas de la menopausia, dado que de forma general se tratan con preparados comerciales de isoflavonas inactivas.

Las bacterias que se pretenden proteger pueden utilizarse para la elaboración de productos fermentados a base de leche de soja con propiedades funcionales mejoradas respecto del producto de partida. En concreto, con un mayor contenido en isoflavonas activas. De esta forma, dichas cepas podrían emplearse para:

- La elaboración de leches de soja fermentadas funcionales, en las que las isoflavonas glucósido se han transformado en sus compuestos activos.
- La manufactura de yogures de soja elaborados con fermentos de yogur, en las que participarían, sin perturbar la actuación de los fermentos, en la acidificación y concomitante activación de las isoflavonas.
- Elaboración de derivados fermentados de leche de soja, como el queso de soja(tofu, tempeh).
- La manufactura de nutraceúticos a base de concentrados o liofilizados microbianos de las cepas activadoras de isoflavonas que puedan adicionarse o no a productos a base de soja con gran proporción de glicósidos de isoflavonas y proveer las actividades activadoras durante el tránsito intestinal.

Una realización preferente de la presente invención hace referencia a la cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente, que presenta actividad α -galactosidasa y actividad β -glucosidasa con un porcentaje de desconjugación de las isoflavonas-glucósidos comprendido entre un 50% y un 95%, para la producción de isoflavonas activas, que preferentemente se caracteriza por que las isoflavonas-glucósidos se seleccionan entre genistina, daidcina y glicitina, y las isoflavonas activas se seleccionan entre genisteína, daidceína y gliciteína.

Preferentemente dicha cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* se caracteriza por ser la cepa *Lactobacillus plantarum* E112, depositada el 17 de Enero de 2012, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 8083.

5 Preferentemente dicha cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* se caracteriza por ser la cepa *Lactobacillus casei* BA3, depositada el 17 de Enero de 2012, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 8084.

Preferentemente dicha cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* se caracteriza por ser la cepa *Lactobacillus rhamnosus* G92, depositada el 17 de Enero de 2012, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 8085.

10 En otra realización de la presente invención, se hace referencia a las cepas bacterianas del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definidas anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos. Preferentemente la enfermedad mediada por estrógenos es menopausia. Alternativamente, en una realización preferentemente dicha enfermedad mediada por estrógenos es cáncer.

15 En otra realización de la presente invención, se hace referencia al uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente para la elaboración de un producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas seleccionado de entre el siguiente grupo: leche, yogur, queso, miso, tempeh, y tofu. Preferentemente dicho producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas es una leche de soja fermentada. Alternativamente, dicho producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas es un yogur de soja. Más preferentemente el yogur de soja es elaborado mediante la adición de un fermento de yogur junto con al menos una de las cepas de lactobacilos activadoras de isoflavonas.

20 Alternativamente, dicho producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas es un queso de leche de soja. Más preferentemente dicho queso de leche de soja es elaborado mediante la adición de al menos una cepa de lactobacilos activadora de isoflavonas como cultivo adjunto.

25 En otra realización de la presente invención, se hace referencia al uso al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente para la elaboración de un suplemento alimenticio, que puede ser en formato de píldora, que comprende un concentrado o liofilizado bacteriano.

30 En otra realización de la presente invención, se hace referencia al uso al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente para la elaboración de un nutraceútico a base de concentrado o liofilizado bacteriano, caracterizado por que el concentrado o liofilizado bacteriano puede adicionarse a un producto a base de leche de soja con isoflavonas-glucósidos. Preferentemente, dicho producto a base de leche de soja con isoflavonas-glucósidos es un batido de leche de soja. Alternativamente, dicho concentrado o liofilizado bacteriano se adiciona a una galleta o barrita de harina de soja.

35 En otra realización de la presente invención, se hace referencia al uso de las cepas bacterianas del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus* definidas anteriormente en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos, caracterizado porque preferentemente la enfermedad mediada por estrógenos es menopausia.

Alternativamente, la enfermedad mediada por estrógenos es cáncer.

40 En otra realización de la presente invención, se hace referencia a un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos, caracterizado por que dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida anteriormente, preferentemente la enfermedad mediada por estrógenos es menopausia. Alternativamente, la enfermedad mediada por estrógenos es cáncer.

45 En la presente invención el término: "cepas bacterianas del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus*", hace referencia a tipos microbianos concretos caracterizados por la producción de ácido láctico de la fermentación de carbohidratos y englobados dentro del nombre taxonómico de "*Lactobacillus*".

En la presente invención el término: "actividad α -galactosidasa", hace referencia a la actividad enzimática que hidroliza galactósidos o carbohidratos que contienen residuos de galactosa.

50 En la presente invención el término: "actividad β -glucosidasa", o actividad β -glucosidasa, hace referencia a la actividad enzimática que hidroliza glucósidos de la dieta liberando de su estructura la molécula de glucosa.

En la presente invención el término: "porcentaje de desconjugación de las isoflavonas-glucósidos", hace referencia al tanto por ciento de conversión de precursores glicosilados (o unidos a residuos de azúcares) de isoflavonas a sus derivados activos, desglucosilados.

En la presente invención el término: "isoflavonas-glucósido", o isoflavonas glicósido, hace referencia a los compuestos de naturaleza flavonoide que están unidos a residuos glucídicos.

En la presente invención el término: "isoflavonas activas", hace referencia a la molécula flavonoide compuesta únicamente por la aglicona y con actividad biológica (Figura 1).

5 En la presente invención el término: "enfermedad mediada por estrógenos", hace referencia a las patologías derivadas de la carencia de hormonas estrogénicas endógenas.

En la presente invención el término: "menopausia", hace referencia al periodo de envejecimiento reproductivo en la mujer caracterizado por una disminución de la secreción de estrógenos y sintomatología derivada.

10 En la presente invención el término: "cáncer", hace referencia a la enfermedad caracterizada por el crecimiento, división y propagación de células tumorales o malignas.

En la presente invención el término: "producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas", hace referencia al producto derivado de leche de soja que ha sido fermentado por microorganismos capaces de llevar a cabo la liberación de las isoflavonas de los azúcares.

15 En la presente invención el término: "leche de soja", hace referencia a la bebida no fermentada elaborada a partir de semilla de soja procesada mediante extracción acuosa, y a los preparados comerciales con leche de soja como ingrediente principal.

En la presente invención el término: "yogur de soja", hace referencia al derivado fermentado de la leche de soja con consistencia de yogurt.

20 En la presente invención el término: "fermento de yogurt", hace referencia a los cultivos microbianos utilizados en la elaboración del yogurt y compuestos por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

En la presente invención el término: "queso de leche de soja", hace referencia al derivado fermentado a partir de leche de soja parcialmente desuerado y con consistencia de queso.

25 En la presente invención el término: "cepa de lactobacilos activadora de isoflavonas", hace referencia al tipo microbiano perteneciente al grupo taxonómico "*Lactobacillus*" con capacidad para hidrolizar las isoflavonas-glucósido transformándolas en sus correspondientes derivados activos.

En la presente invención el término: "suplemento alimenticio", hace referencia a un suplemento nutricional destinado a complementar la alimentación.

30 En la presente invención el término: "nutraceútico a base de concentrado o liofilizado bacteriano", hace referencia a un preparado bacteriano con efecto beneficioso sobre la salud compuesto por microorganismos en forma de polvo liofilizado.

En la presente invención el término: "producto a base de leche de soja con isoflavonas-glucósido", hace referencia a un alimento con leche de soja caracterizado por la presencia isoflavonas-glucósido.

35 En la presente invención el término: "batido de leche de soja", hace referencia a la bebida elaborada mezclando leche de soja con zumos o frutas variadas entre otros componentes.

En la presente invención el término: "galleta o barrita de harina de soja", hace referencia a un snack elaborado a base de harina de habas de soja.

40 En la presente invención el término: "medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos", hace referencia a los compuestos o preparados utilizados para el tratamiento de los síntomas asociados a la menopausia.

En la presente invención el término: "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz", hace referencia a la dosis mínima celular (por ejemplo 10^7 ufc g o ml de preparado) y la duración del tratamiento que será distinta para cada enfermedad o sintomatología.

45 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Rutas de conversión de las isoflavonas precursoras de la soja (genistina, daidcina y glicitina) a sus derivados activos genisteína, daidceína, gliciteína y equol, así como el metabolito inactivo O-DMA.

5 **FIGURA 2.** Cromatograma de TCL de la producción de daidceína (Control 2) a partir de daidcina (Control 1) en medio de cultivo por las cepas de lactobacilos *L. casei* BA3, *L. plantarum* E112 y *L. rhamnosus* G92. Se ve claramente que la incubación de la isoflavona glucósido con las distintas cepas da como resultado la aparición de la isoflavona activa (en este caso la daidceína).

10 **FIGURA 3.** Cuantificación por HPLC (μMol) de la producción de genisteína (barras gris oscuro, a la derecha) a partir de genistina (barras gris claro, a la izquierda) en medio de cultivo. El porcentaje de precursor e isoflavona activa depende de la cepa; en el caso de *L. rhamnosus* G92 la genistina es convertida en un 90-95% en su derivado genisteína.

15 **FIGURA 4.** Cromatogramas de isoflavonas por HPLC de una leche de soja comercial (A) y la misma leche tras inoculación e incubación con la cepa *L. casei* BA3 (B). Genistina (GTIN) y daidcina (DZIN) desaparecen para dar lugar a las isoflavonas activas genisteína (GTEN) y daidceína (DZEN). Como puede verse, la transformación ocurre también en la leche de soja comercial, de la misma manera que en el medio de cultivo.

20 **FIGURA 5.** Crecimiento y acidificación de las cepas en dos preparados comerciales de soja (VS, gris oscuro; y CL, gris claro), incluyendo la evolución del desarrollo celular (ufc/ml) (barras) y pH (líneas). Aunque el desarrollo de las distintas cepas es similar en las dos leches de soja, alcanzando niveles de entre 10^8 y 10^9 ufc/ml a las 48 h de incubación, la evolución del pH es diferente, alcanzando pHs más bajos en la leche VS (en torno a 3,5) que en la CL (entre 3,5 y 5,5), lo cual sugiere crecimiento a partir de sustratos distintos en los distintos preparados de soja.

25 **FIGURA 6.** Recuperación de las distintas isoflavonas y sus derivados en la leche de soja CL tras 24 horas de incubación de las cepas. En este gráfico se representa la recuperación de isoflavonas de leche de soja antes y después de la fermentación con las distintas cepas. Las cepas *L. casei* BA3 y *L. rhamnosus* G92 transforman más del 95% de los glucósidos en isoflavonas activas (Figura 6). Por contra, *L. plantarum* E112 transforma tan solo el 70% de la daidcina y el 60% de la genistina (Figura 6). En el caso de la genistina/genisteína hay diferencias en los porcentajes de transformación respecto de los resultados en medio de cultivo (Figura 3), lo que sugiere que la transformación puede estar influenciada por componentes del medio.

30 **FIGURA 7.** Viscosidad de las leches fermentadas comerciales de soja VS (barras grises) y CL (barras blancas) tras 24 h de incubación de las tres cepas a 30°C. Estos valores de viscosidad son similares a los que se encuentran en los yogures comerciales de leche de vaca, por lo que las leches de soja acidificadas presentan aspecto y palatabilidad parecidos a los de los yogures.

BIBLIOGRAFÍA

- Bhupathy P, Haines CD, Leinwand LA. 2010. Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women. *Womens Health* 6:77-95.
- 5 - Bolaños R, Del Castillo A, Francia J. 2010. Soy isoflavones versus placebo in the treatment of climacteric vasomotor symptoms: systematic review and meta-analysis. *Menopause* 17: 660-666.
- Champagne, C. P., Tompkins, T. A., Buckley, N. D., and Green-Johnson, J. M. 2010. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol.* 27: 968-972.
- 10 - Crozier, A., Jaganath, I. B., and Clifford, M. N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26: 1001-1043.
- de Cremoux P, This P, Leclercq G, Jacquot Y. 2010. Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: bioavailability and metabolism. *Maturitas* 65: 334-339.
- Food and Drug Administration. 1999. Food labeling, health claims, soy protein, and coronary heart disease. *Fed. Regist.* 57: 699-733.
- 15 - Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 503-514.
- Kemperman, R. A., Bolca, S., Loger, L. C., and Vaughan, E. E. 2010. Novel approaches for analyzing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology* 156: 3224-3231.
- 20 - Messina M. 2010. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J. Nutr.* 140: 1350S-1354S.
- Molla, M. D., Hidalgo-Mora. J. J., Soteras. M. G. 2011. Phytotherapy as alternative to hormone replacement therapy. *Front. Biosci.* 3: 191-204.
- Palacios, S., Calaf, J.; Cano, A., y Parrilla, J. J. 2003. Relevancia de los resultados del estudio WHI para la atención de las mujeres posmenopáusicas en España. *Med. Clin. (Barc).* 120: 146-147.
- 25 - Prentice, R. L. 2008. Women's health initiative studies of postmenopausal breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617: 151-60.
- Rekha, C. R., and Vijayalakshmi, G. 2010. Bioconversion of isoflavone glycoside to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1198-1208.
- 30 - Ruas-Madiedo, P., Moreno, J. A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. de G. 2007. Screening of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains Isolated from the Human Intestinal Microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 2007 July; 73(13): 4385–4388.
- Taku K, Melby MK, Kurzer MS, Mizuno S, Watanabe S, Ishimi Y. 2010. Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone* 47: 413-423.
- 35 - Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., and Shah, N. P. 2002. Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soy milk by β -glucosidase producing bifidobacteria. *J. Food Sci.* 67: 3104-3113.
- Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S. 2010. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Med.* 76: 1132-1142.
- 40 - Wei, Q.-K., Chen, T.-R., and Chen, J.-T. 2007. Using *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to produce the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 120-124.
- Yuang, J.-P., Wang, J.-H., and Liu, X. 2007. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microbiota. Implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 765-781.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1**Participación de las cepas objeto de la presente invención en la activación de isoflavonas de la soja**

Se ha demostrado la actividad β -glucosidasa y la participación de las cepas objeto de la presente invención en la activación de isoflavonas de la soja. Para ello se determinó la actividad glicosidasa en medio de cultivo y en leches de soja comerciales. La capacidad de transformación de isoflavonas de soja se evaluó en medio de cultivo suplementado con precursores de isoflavonas glicosilados puros cualitativa- y cuantitativamente por medio de cromatografía en capa fina (TLC) y mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Las cepas de lactobacilos presentaron entre 7 y 20 mU de actividad enzimática en lisados celulares y fueron capaces de convertir las isoflavonas glicosiladas daidcina y genistina a sus derivados activos daidceína y genisteína con un porcentaje de transformación entre un 50 y un 95% (Figura 2 y 3)

EJEMPLO 2**Cultivo de las cepas activadoras de isoflavonas objeto de la presente invención en leches de soja comerciales**

Las cepas se cultivaron posteriormente en dos leches de soja comerciales, en las que se evaluó y se cuantificó el crecimiento (unidades formadoras de colonia/ml) y la capacidad activadora (porcentaje de desconjugación de las isoflavona-glucósido) por HPCL. También se determinó el pH, la acidez y la viscosidad de las leches de soja fermentadas. Las cepas de lactobacilos mostraron buena capacidad para acidificar dos leches de soja comerciales distintas (Figura 5) además de llevar a cabo la conversión a isoflavonas activas (Figura 6), lo que indica su idoneidad para ser usadas en la fermentación de este tipo de bebidas. El producto final tiene similitudes con el yogur convencional, una acidez parecida con valores de pH entre 3,5 y 5,5 (Figura 5), y una viscosidad similar en un rango comprendido entre 150 y 450 mPa.s (Figura 7).

EJEMPLO 3**Yogur de soja con fermentos comerciales y cepas activadoras de isoflavonas.**

La compatibilidad de las cepas de lactobacilos activadores de isoflavonas con los fermentos clásicos de yogurt determinada mediante ensayos de viabilidad de co-cultivos posibilita su empleo como cultivos adjuntos en este tipo de alimentos. Su capacidad de crecimiento en este tipo de leches asegura su viabilidad en el producto final como puede observarse en la Figura 5 con niveles de entre 10^8 - 10^9 ufc/ml tras 48h de incubación, y la producción de agliconas activas de isoflavonas como daidceína y genisteína, tal y como se explica en el ejemplo anterior (Figura 6).

EJEMPLO 4**Elaboración de queso de leche de soja con cepas de lactobacilos activadoras de isoflavonas como cultivos adjuntos.**

La adición de los lactobacilos activadoras de isoflavonas como cultivos adjuntos o de maduración para la elaboración de quesos a base de leche de soja se justifica con la compatibilidad de las cepas con otras bacterias lácticas, incluyendo cepas de *Lactococcus lactis*, tal y como se comprobó en ensayos de co-cultivos en los que no se apreció interferencias o disminución de las poblaciones bacterianas, y la adecuación de las cepas para crecer en leche de soja (ver ejemplos anteriores) (Figura 5).

EJEMPLO 5**Suplemento alimenticio con cepas activadoras de isoflavonas para complementar la ingesta de glicósidos de isoflavonas.**

Este se podría realizar en formato de píldoras con concentrados bacterianos de las cepas mencionadas. La ingesta podría producirse de forma simultánea o paralela a la toma de leche soja o preparados comerciales de isoflavonas de forma que proveerían las actividades durante el tránsito intestinal. La capacidad de estas cepas para resistir condiciones que recrean las del tracto gastrointestinal (resistencia a la acidez estomacal, creciendo a pH de 3,5 y a la presencia de un 2% de sales biliares intestinales) ha sido también ensayada y demostrada.

EJEMPLO 6

Batido de leche de soja enriquecido con cepas de lactobacilos activadoras de isoflavonas.

5 Las cepas podrían presentarse en formato liofilizado en la tapa para mezclar con el batido tras la apertura del envase. Las cepas que se pretende patentar pertenecen a las especies de *L. casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* y realizando curvas de crecimiento se observó que presentan unas buenas tasas de crecimiento con cinéticas de $\mu \sim 3 \text{ h}^{-1}$, alcanzando una alta densidad celular de 10^{10} - 10^{11} ufc/ml. Además se ha probado su resistencia a la liofilización en condiciones experimentales de laboratorio con reducciones tras estos procesos en los preparados celulares inferiores a una unidad logarítmica.

EJEMPLO 7

10 **Elaboración de galletas o barritas de harina de soja enriquecidas con lactobacilos activadores de isoflavonas.**

Las cepas podrían incorporarse al producto en la última etapa de su elaboración, como una capa a base de liofilizado bacteriano concentrado que se podría mezclar con azúcar y secarse alrededor de la barrita o de las galletas.

15

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus*, caracterizada por que presenta actividad α -galactosidasa y actividad β -glucosidasa con un porcentaje de desconjugación de las isoflavonas-glucósidos entre 5%-95%, para la producción de isoflavonas activas.
- 5 2. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según la reivindicación 1, caracterizada por que las isoflavonas-glucósidos se seleccionan entre genistina, daidcina y glicitina, y las isoflavonas activas se seleccionan entre genisteína, daidceína y gliciteína.
3. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada por que es la cepa *Lactobacillus plantarum* E112, depositada el 17 de Enero de 2012, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 8083.
- 10 4. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada por que es la cepa *Lactobacillus casei* BA3, depositada el 17 de Enero de 2012, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 8084.
- 15 5. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada por que es la cepa *Lactobacillus rhamnosus* G92, depositada el 17 de Enero de 2012, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y cuya referencia es CECT 8085.
6. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos.
- 20 7. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según la reivindicación 6, caracterizada por que la enfermedad mediada por estrógenos es menopausia.
8. La cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* según la reivindicación 6, caracterizada por que la enfermedad mediada por estrógenos es cáncer.
9. Uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida en las reivindicaciones 1 a 5, para la elaboración de un producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas seleccionado de entre el siguiente grupo: leche, yogur, queso, miso, tempeh, y tofu.
- 25 10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado por que el producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas es una leche de soja.
11. Uso según la reivindicación 9, caracterizado por que el producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas es un yogur de soja.
- 30 12. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por que el yogur de soja es elaborado mediante la adición de un fermento de yogur junto con al menos una cepa de lactobacilos activadora de isoflavonas.
13. Uso según la reivindicación 9, caracterizado por que el producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas es un queso de leche de soja.
- 35 14. Uso según la reivindicación 13, caracterizado por que el queso de leche de soja es elaborado mediante la adición de al menos una cepa de lactobacilos activadora de isoflavonas como cultivo adjunto.
15. Uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida en las reivindicaciones 1 a 5, para la elaboración de un suplemento alimenticio en formato de píldora que comprende un concentrado o liofilizado bacteriano.
- 40 16. Uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida en las reivindicaciones 1 a 5, para la elaboración de un nutraceútico a base de concentrado o liofilizado bacteriano.
17. Uso según la reivindicación 16, caracterizado por que el nutraceútico es un producto a base de leche de soja con isoflavonas-glucósidos al que se adiciona un concentrado o liofilizado bacteriano de la(s) cepa(s).
18. Uso según la reivindicación 17, caracterizado por que el producto a base de leche de soja con isoflavonas-glucósidos es un batido de leche de soja.
- 45 19. Uso según la reivindicación 17, caracterizado por que el nutraceútico al que se adiciona un concentrado o liofilizado bacteriano de la(s) cepa(s) es una galleta o una barra de harina de soja.
20. Uso de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida en las reivindicaciones 1 a 5, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos.

21. Uso según la reivindicación 20, caracterizado por que la enfermedad mediada por estrógenos es menopausia.
22. Uso según la reivindicación 20, caracterizado por que la enfermedad mediada por estrógenos es cáncer.
- 5 23. Método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad mediada por estrógenos, caracterizado por que dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una cepa bacteriana del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* definida en las reivindicaciones 1 a 5.
24. Método según la reivindicación 23, caracterizado por que la enfermedad mediada por estrógenos es menopausia.
25. Método según la reivindicación 23, caracterizado por que la enfermedad mediada por estrógenos es cáncer.

FIG. 1

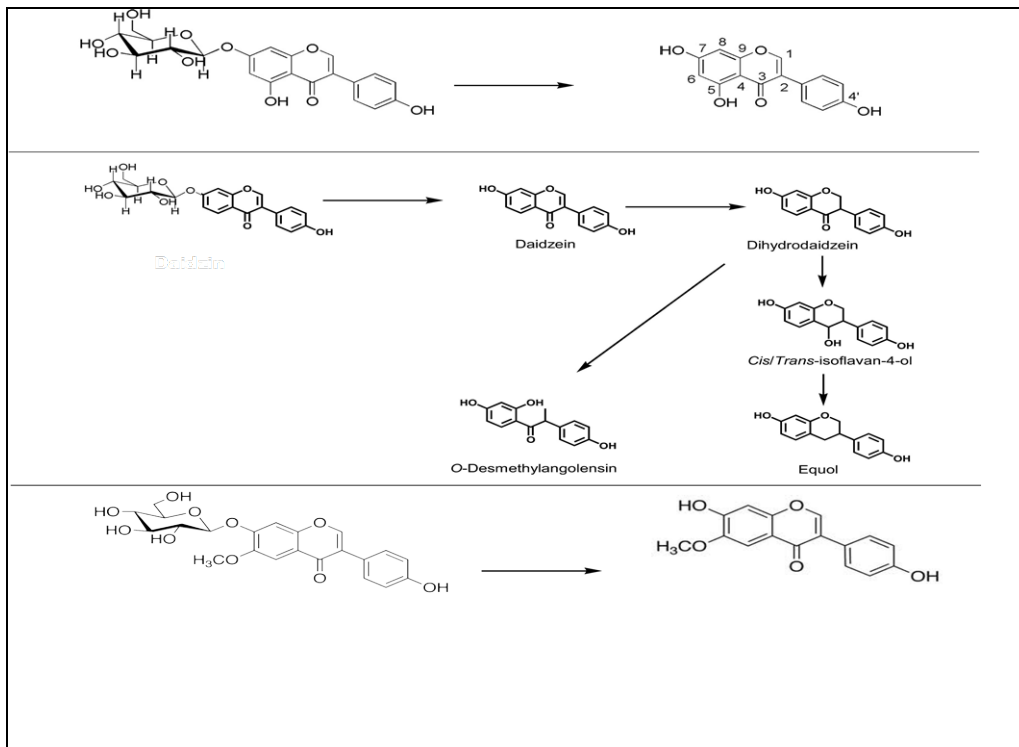


FIG. 2

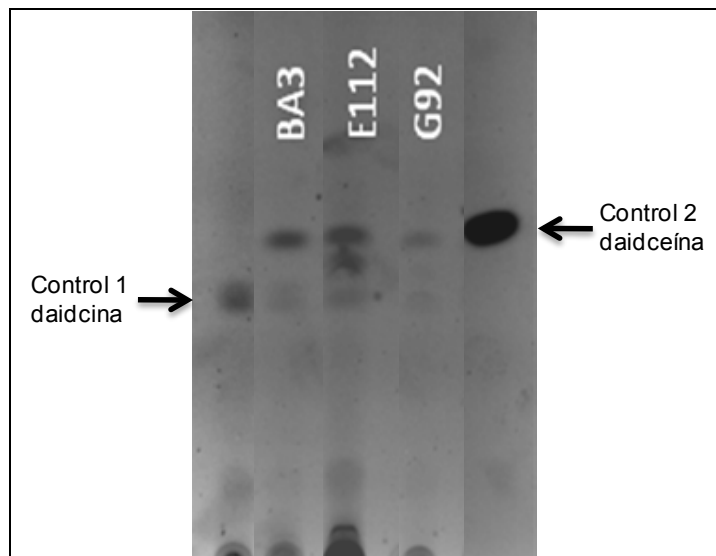


FIG. 3

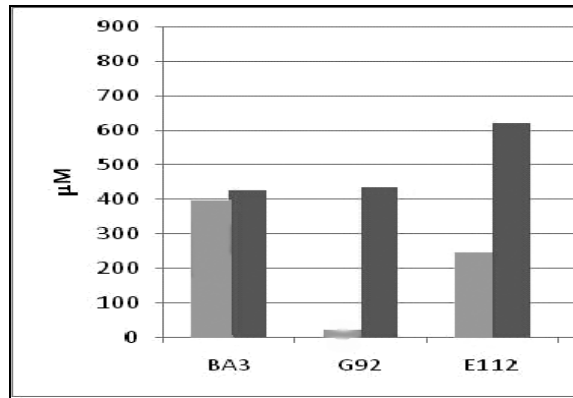


FIG. 4

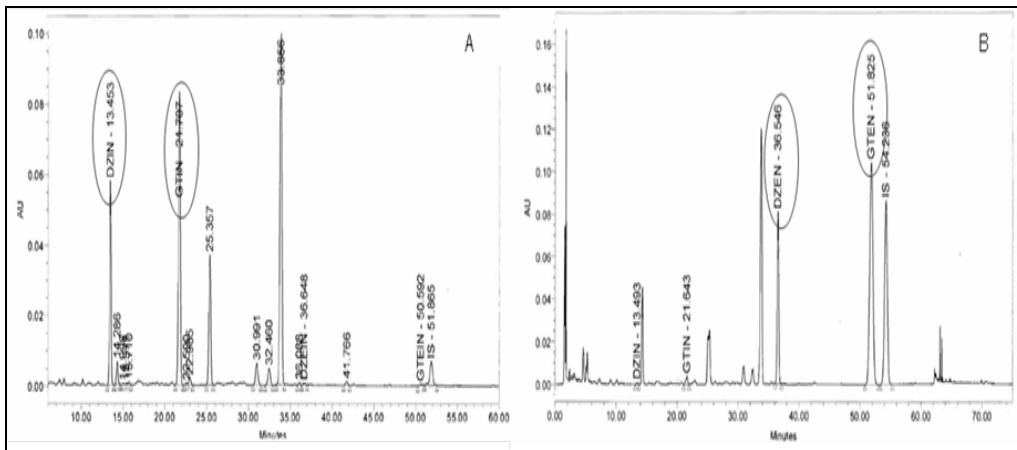


FIG. 5

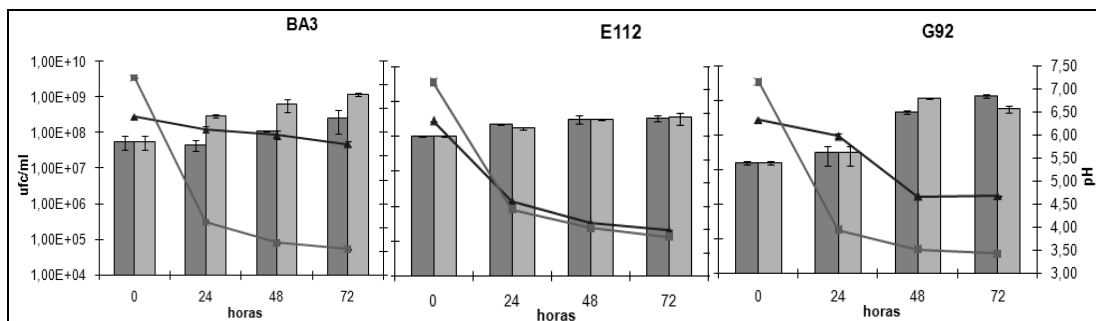


FIG. 6

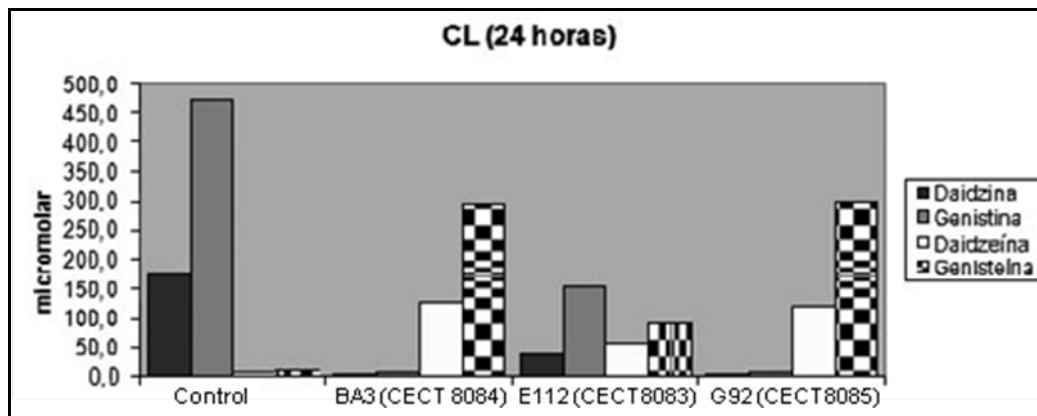
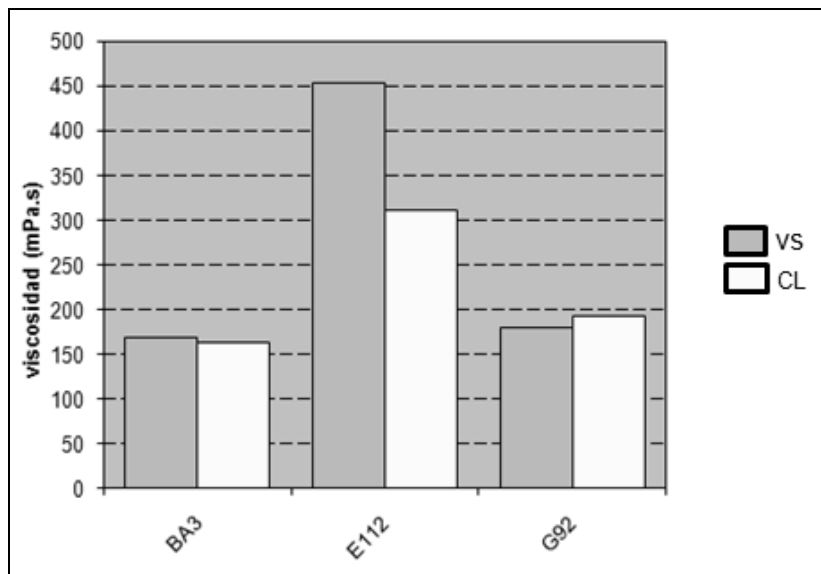


FIG. 7





- ②¹ N.º solicitud: 201230152
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 02.02.2012
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A A	OTIENO D O et al. Endogenous beta-glucosidase and beta-galactosidase activities from selected probiotic micro-organisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. Journal of applied microbiology. Oct. 2007. Vol. 103 No: 4 Págs: 910-917. ISSN 1364-5072.	1,2,6-8,20-25 3-5,9-19
A A	CHIEN H-L et al. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. FOOD MICROBIOLOGY, 01.12.2006. Vol. 23 No: 8 Págs: 772-778. ISSN 0740-0020.	3-5,9-19
A	PYO Y H et al. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with beta-glucosidase-producing lactic acid bacteria. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, 01.06.2005 Vol. 38 No: 5 Págs: 551-559. ISSN0963-9969.	3-5,9-19
A	US 2010190844 A1 (LEE KUNG-TA et al.) 29.07.2010, todo el documento.	3-5,9-19
A	WO 2008003782 A1 (ALPRO NV et al.) 10.01.2008, todo el documento.	3-5,9-19

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 20.05.2013</p>	<p>Examinador J. Manso Tomico</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L1/05 (2006.01)

A23C9/123 (2006.01)

C12P1/04 (2006.01)

C12R1/245 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23L, A23C, C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3-5, 9-19	SI
	Reivindicaciones 1,2,6-8, 20-25	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	OTIENO D O et al. Endogenous beta-glucosidase and beta-galactosidase activities from selected probiotic micro-organisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk. Journal of applied microbiology. Oct. 2007. Vol. 103 No: 4 Págs: 910-917. ISSN 1364-5072.	
D02	CHIEN H-L et al. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. FOOD MICROBIOLOGY, 01.12.2006. Vol. 23 No: 8 Págs: 772-778. ISSN 0740-0020.	
D03	PYO Y H et al. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with beta-glucosidase-producing lactic acid bacteria. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, 01.06.2005 Vol. 38 No: 5 Págs: 551-559. ISSN 0963-9969.	
D04	US 2010190844 A1 (LEE KUNG-TA et al.)	29.07.2010
D05	WO 2008003782 A1 (ALPRO NV et al.)	10.01.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga tres cepas bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus* y su uso para la elaboración de un producto fermentado funcional a base de leche de soja con isoflavonas activas.

Los documentos del estado de la técnica D01-D05 divulgan la producción de productos fermentados y con cepas con capacidad probiótica.

D01 divulga una serie de microorganismos probióticos con actividad beta-glucosidasa y beta-galactosidasa capaces de transformar las isoflavonas existentes en el medio (figura 1). Las beta-glucosidasas y beta-galactosidasas son utilizadas para la hidrólisis de los glucósidos de isoflavona predominantes y convertirla en agliconas de isoflavona, a fin de mejorar la actividad biológica de la leche de soja.

D02 divulga un estudio donde a leche de soja se fermenta con bacterias de ácido láctico (*Streptococcus thermophilus* CRCB 14085, *Lactobacillus acidophilus* BCRC 14.079) y las bifidobacterias (*Bifidobacterium infantis* BCRC 14633, *B. longum* B6) individualmente y en combinación. También se describe el cambio en el contenido de las diversas isoflavonas (agliconas, glucósido, acetyl- y malonyl-glucósidos) y la actividad de beta-glucosidasa en la leche de soja durante la fermentación.

D03 describe la posible aplicación de bacterias [beta]-glucosidasa productoras de ácido láctico como cultivos iniciadores funcionales para obtener las isoflavonas bioactivas, genisteína y daidzeína, en la leche de soja fermentada. Se seleccionaron cuatro cepas, *Lactobacillus plantarum* - KFRI 00144, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KFRI 01181, *Bifidobacterium breve* K-101 y *Bifidobacterium thermophilum* KFRI 00748, de entre 31 probadas para [beta]-actividad glucosidasa usando [rho]-nitrofenil-[beta]-D-glucopiranosido como sustrato.

D04 divulga un proceso para producir una alta concentración de isoflavonas hidrolizadas, que comprende la adición de glucono isoflavonas a un sustrato a base de soja con microorganismos que expresan o producen [beta]-glucosidasa, en el que los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste de *Actinomucor elegans*, *A. taiwanensis*, *Aspergillus awamori*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* (natto), *Bifidobacterium animalis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum*, *Candida* spp, *Debaryomyces* spp, *Ganoderma lucidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Monascus* spp, *Mucor* spp, *Rhizopus azygosporus*, *Saccharomyces* spp, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptococcus thermophilus*, y *Zygosaccharomyces* spp

D05 divulga un cultivo de bacterias que contiene bacterias del ácido láctico, y a un método para la preparación de cultivo de bacterias tales. La presente invención también se refiere a un método para preparar análogos de productos lácteos obtenidos usando dicho cultivo de bacterias. Las bacterias de ácido láctico se seleccionan preferiblemente de los géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, y *Streptococcus*.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan las cepas de las reivindicaciones 3,4,5, ni su uso en la elaboración de alimentos funcionales, ni se puede derivar de una manera obvia tomando los documentos del estado de la técnica solos o en combinación, por lo que las reivindicaciones 3-5, 9-19 son nuevas y tienen actividad inventiva tal y como se menciona en los arts.6, 8 de la Ley 11/1986.

La reivindicación 1 divulga una bacteria del género lactobacillus que presenta actividad alfa galactosidasa y beta glucosidasa capaz de desconjugar las isoflavonas en un porcentaje determinado. Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan cepas de lactobacillus con esa capacidad, por lo que las reivindicaciones 1, 2 son nuevas según lo mencionado en el art.6 de la Ley 11/1986. Dado que en la descripción sólo aparecen las bacterias de las reivindicaciones 3-5, el alcance la primera reivindicación excede sobre manera el alcance de lo divulgado por la presente solicitud no resolvería el problema técnico planteado en su totalidad por dicha reivindicación, a saber, la provisión de cualquier cepa bacteriana del género lactobacillus con capacidad de descomposición de isoflavonas glucósidos. Por tanto, no supone una contribución al estado de la técnica tal y como está reivindicada, por lo que carecería de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.

De manera similar, las reivindicaciones 6, 7, 20-25 reivindican el uso médico de las cepas reivindicadas. Ningún documento del estado de la técnica divulga el uso médico de las cepas del lactobacillus de la presente invención por lo que, este uso, sería nuevo según lo mencionado en el art. 6 de la ley 11/1986. Sin embargo, la solicitud no aporta ningún dato que permita comprobar la eficacia terapéutica de dichas cepas o composiciones de dichas cepas, por lo que no suponen realmente una contribución al estado de la técnica. Más bien son un mero deseo de que la capacidad de las cepas pueda ser utilizada para el tratamiento de algunas enfermedades. Las reivindicaciones mencionadas carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art.8 de la ley 11/1986.