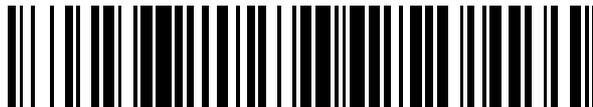


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 604**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/105** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2010 PCT/JP2010/001272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10098103**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010 E 10745988 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2402429**

54 Título: **Bacteria productora de equol y uso de la misma**

30 Prioridad:

**25.02.2009 JP 2009042867**

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

**10.11.2017**

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)  
1-19 Higashi Shimbashi 1-chome  
Minato-ku, Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**TSUJI, HIROKAZU;  
NOMOTO, KOJI;  
MORIYAMA, KAORU y  
AKAZA, HIDEYUKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 641 604 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**

Bacteria productora de equol y uso de la misma

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a una bacteria productora de equol y al uso de la misma.

**Técnica anterior**

10 Se sabe que las isoflavonas, que están contenidas en niveles altos en los alimentos de soja, son componentes funcionales eficaces para mitigar el síndrome menopáusico tal como una dolencia indefinida; prevenir la osteoporosis; prevenir la hiperlipidemia y la arterioesclerosis; prevenir el cáncer de mama y el cáncer de próstata; etc. Estudios recientes han revelado que la daidzeína, un tipo de isoflavona, se metaboliza por la mediación de enterobacterias en el cuerpo a equol, que tiene una acción similar a los estrógenos y una acción antioxidante más fuertes. Por tanto, el equol ha atraído la atención como uno de los principios activos importantes que presentan los efectos mencionados anteriormente en el cuerpo.

20 Mientras tanto, la producción de equol a partir de daidzeína no se produce por igual en todos los seres humanos, y la capacidad de producción de equol varía entre distintos seres humanos. Aproximadamente de un 30 a un 50 % de los seres humanos tienen capacidad de producción de equol (documento distinto de patente 1). Por lo tanto, se han llevado a cabo estudios exhaustivos para buscar enterobacterias que tengan capacidad de producción de equol. Hasta ahora, se ha informado de que los siguientes microorganismos tienen capacidad de producción de equol: *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* (documento de patente 1), *Lactococcus garvieae* (documento de patente 2), *Slackia* spp. cepa TM-30, *Bifidobacterium adolescentis* cepa TM-1, *Bifidobacterium breve* JCM 1273 (documento de patente 3), *Propionibacterium freudenreichii*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius* (documento de patente 4), SNU-Julong 732 (documento distinto de patente 2), y bacteria grampositiva do03 (documento distinto de patente 3).

30 Sin embargo, puesto que todos los microorganismos informados anteriormente presentan una capacidad baja de conversión de daidzeína como sustrato en equol (a continuación en el presente documento se puede denominar "capacidad de conversión de daidzeína en equol" o simplemente "capacidad de conversión en equol"), estos microorganismos no se han empleado en la producción de equol en el cuerpo humano o en la producción industrial de equol.

35 El documento de patente 5 describe una composición que contiene una bacteria del ácido láctico productora de equol. El documento de patente 6 describe una composición oral que contiene anhídrido de difructosa.

**40 Documento de la técnica anterior****Documentos de patente**

45 [Documento de patente 1] Documento WO 99/7392  
[Documento de patente 2] Documento WO 2005/42  
[Documento de patente 3] Documento JP-A-2006-204296  
[Documento de patente 4] Documento JP-A-2006-504409  
[Documento de patente 5] Documento EP 1 649 760 A1  
[Documento de patente 6] Documento EP 1 825 856 A1

**50 Documentos distintos de patente**

[Documento distinto de patente 1] Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 217, N.º 3, p. 335-339 (1998)  
[Documento distinto de patente 2] Appl. Environ. Microbiol., Vol. 71, p. 214-219 (2005)  
55 [Documento distinto de patente 3] J. Biosci. Bioeng., Vol. 102, p. 247-250 (2006)

**Sumario de la invención****60 Problemas que debe solucionar la invención**

60 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo que presenta una eficacia alta de conversión en equol. Otro objetivo es proporcionar un alimento/bebida o composición farmacéutica que contiene el microorganismo. Todavía otro objetivo es proporcionar un procedimiento para producir equol por el uso del microorganismo.

**65 Medios para solucionar los problemas**

Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios exhaustivos para alcanzar los objetivos mencionados anteriormente y han descubierto que un microorganismo que presenta una eficacia alta de conversión en equol se puede encontrar a través del subcultivo de heces de un ser humano que tiene capacidad de producción de equol en un medio de cultivo de selección para el microorganismo diana que tiene capacidad de conversión en equol, medio que se desarrolló previamente por algunos de los presentes inventores. La presente invención se ha logrado en base a este hallazgo.

En consecuencia, la presente invención proporciona un microorganismo que tiene una capacidad de convertir daidzeína en equol en 24 horas a una tasa de un 50 % o mayor.

La presente invención también proporciona un alimento/bebida o composición farmacéutica que comprende el microorganismo mencionado anteriormente que tiene una capacidad de conversión en equol.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir equol, que comprende hacer que actúe sobre la daidzeína, el microorganismo mencionado anteriormente que tiene una capacidad de conversión en equol.

También se describe un fragmento de ácido nucleico que puede detectar específicamente el microorganismo mencionado anteriormente que tiene una capacidad de conversión en equol.

### Efectos de la invención

El microorganismo de la presente invención, que presenta una eficacia muy alta de conversión en equol, se puede aplicar a productos alimenticios/bebidas y productos farmacéuticos que ayudan a la producción de equol en el cuerpo humano y se pueden usar con el propósito de tratamiento, mejora, prevención, etc., de una variedad de enfermedades y trastornos para los que equol es eficaz tales como síndrome menopáusico tal como dolencia indefinida; osteoporosis; hiperlipidemia; arterioesclerosis; cáncer de mama; cáncer de próstata; y síndrome premenstrual. Cuando la presente invención se aplica a la producción industrial de equol, el equol se puede recuperar a concentración alta. Por tanto, se puede facilitar la posoperación tal como separación/purificación, lo que da lugar a una producción notablemente eficaz de equol. Por el uso del fragmento de ácido nucleico, se puede detectar un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol en las heces y en el contenido del tubo digestivo. Cuando se cuantifica el microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol por el uso del fragmento de ácido nucleico, se puede investigar fácilmente una capacidad de producción de equol intrínseca a los individuos.

### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: un gráfico que muestra el árbol filogénico molecular de *Slackia* sp. YIT 11861 (el código en [ ] representa un número de acceso y los valores numéricos representan los valores del muestreo con reposición).

Fig. 2: un gráfico que muestra la sensibilidad de detección del cebador producido.

### Modos para llevar a cabo la invención

En la presente invención, la "capacidad de conversión en equol" se puede determinar añadiendo daidzeína (sustrato de equol) a un medio de cultivo a una concentración final de 100  $\mu$ M; inoculando un microorganismo diana en el medio a una concentración de  $10^7$  células/ml de medio; manteniendo el medio a 37 °C durante un período de tiempo específico; determinando la concentración de equol del medio; comparando la concentración de equol con la concentración de daidzeína inicial; e introduciendo los datos en la siguiente fórmula.

Capacidad de conversión en equol (%) = (concentración de equol del cultivo que contiene el microorganismo diana)/(concentración de daidzeína inicial del cultivo)  $\times$  100

El cultivo se realiza preferentemente en condiciones anaerobias para reproducir las condiciones del intestino humano. El medio de cultivo es preferentemente un medio GAM.

La concentración de equol se puede determinar a través de una técnica habitual tal como cromatografía de líquidos o CLEM.

En la presente invención, el "microorganismo que tiene una capacidad de convertir daidzeína en equol en 24 horas a una tasa de un 50 % o mayor" se refiere a un microorganismo que presenta una capacidad de conversión en equol de un 50 % o mayor después de mantenerse a una temperatura específica durante 24 horas. Preferentemente se emplea un microorganismo que presenta una capacidad de conversión en equol de un 80 % o mayor después de mantenerse a una temperatura específica durante 24 horas, más preferentemente un 100 %. De forma alternativa, también se emplea preferentemente un microorganismo que presenta una capacidad de conversión en equol de un 50 % o mayor después de mantenerse durante un período de tiempo más corto; por ejemplo, 8 horas, a una

temperatura específica. Un ejemplo de un microorganismo de este tipo es una bacteria perteneciente al género *Slackia*.

En un procedimiento más específico, el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol se puede seleccionar a través de cribado. Específicamente, una muestra (por ejemplo, heces) que contiene posiblemente un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol se subcultiva en un medio selectivo para un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol, medio que se desarrolló previamente por algunos de los autores de la presente invención (documento WO 2007/52740), mientras se realiza un seguimiento de la capacidad de conversión de daidzeína en equol. Los ejemplos de muestras preferentes que contienen posiblemente un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol comprenden heces y contenido del tubo digestivo de un sujeto humano que tiene una capacidad de producción de equol (productor de equol). Preferentemente, se lava por centrifugación una muestra de heces que se va a emplear con antelación.

Una de las bacterias que tienen una capacidad de conversión en equol y que pertenecen al género *Slackia* que se obtuvo a través del procedimiento mencionado anteriormente se depositó como *Slackia* sp. YIT 11861 (FERM ABP-11231) en el Instituto Nacional de Tecnología y Ciencia Industrial Avanzada, International Patent Organism Depositary (Central 6th, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki, 305-8566, Japón) el 3 de febrero de 2009. La sistemática filogénica y las propiedades bioquímicas de *Slackia* sp. YIT 11861 se describirán a continuación.

Se determinó la secuencia de nucleótidos de ARNr 16S de  $\geq 1400$  pb de *Slackia* sp. YIT 11861 a través de un procedimiento habitual, y se realizó la búsqueda de homología en una base de datos de ADN pública (DDBJ) por medio del programa FASTA. Como resultado, se descubrió que esta cepa bacteriana tenía una homología de ARNr 16S de un 92,4 % con respecto a una cepa bacteriana conocida de *Slackia exigua* ATCC 700122<sup>T</sup> (número de acceso: AF101240) perteneciente al género *Slackia*. Se sometió la secuencia de nucleótidos de otra bacteria obtenida a partir de la base de datos de ADN a múltiples alineaciones y se analizó la cepa bacteriana de la invención en términos de filogenia molecular a través del procedimiento NJ. Como resultado, se descubrió que la cepa pertenecía a la familia *Coriobacteriaceae*, al género *Slackia*. Se descubrió que la cepa tenía una homología de un 99 % o mayor con respecto a *Slackia* spp. TM-30 divulgada en el documento de patente 3 y con respecto a tres bacterias no cultivadas derivadas de ser humano (números de acceso: EF071271, DQ797152 y AY916234). Estas cepas bacterianas formaron un agrupamiento.

Se descubrió que las propiedades bioquímicas de la cepa bacteriana de la presente invención difieren de las de *S. exigua* ATCC 700122<sup>T</sup> en que la cepa era positiva para la fosfatasa alcalina y negativa para la arginina arilamidasa, prolina arilamidasa, fenilalanina arilamidasa, leucina arilamidasa, tirosina arilamidasa, alanina arilamidasa, glicina arilamidasa, histidina arilamidasa y serina arilamidasa; y difieren de las de *Slackia* spp. TM-30 en que la cepa utilizaba D-manosa y D-rafinosa y era positiva para la fosfatasa alcalina. Por tanto, se descubrió que la cepa *Slackia* sp. YIT 11861 difería de las cepas conocidas.

El alimento/bebida o composición farmacéutica de la presente invención que contiene un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol se puede emplear como potenciador del nivel de equol en el cuerpo, sangre, intestino (por ejemplo, intestino grueso), etc., y se puede emplear para el propósito de tratamiento, mejora, prevención, etc., de una variedad de enfermedades y trastornos para los que la isoflavona es eficaz tales como síndrome menopáusico tal como dolencia indefinida; osteoporosis; hiperlipidemia; arterioesclerosis; cáncer de mama; cáncer de próstata; y síndrome premenstrual. En particular cuando la composición se aplica a un sujeto humano que no tiene capacidad de producción de equol (no productor de equol) o un sujeto humano que tiene una capacidad baja de producción de equol, se pueden prevenir en la vida cotidiana una variedad de enfermedades y trastornos para los que la isoflavona es eficaz. Además, la composición se aplica preferentemente a sujetos humanos de mediana a tercera edad, que tienen un riesgo mayor de síndrome menopáusico tal como dolencia indefinida, osteoporosis y cáncer.

No se impone ninguna limitación particular sobre el modo de uso del microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol, y se pueden usar células viables o bien células desnaturalizadas térmicamente (células muertas). Además, se puede usar un producto liofilizado del mismo, un producto de cultivo (por ejemplo, sobrenadante de cultivo), un producto celular tratado, etc. Notablemente, puesto que se considera que la capacidad de conversión en equol se ejerce por una enzima que se origina a partir del microorganismo, el microorganismo se emplea preferentemente en un estado donde se inhibe la inactivación de la enzima.

La composición de la presente invención puede contener además adonitol, arabinosa, eritritol, galactosa, lactitol, melecitosa, trehalosa, ribosa, sorbosa, xilosa, inositol o sorbitol. Estos sacáridos pueden mantener o proliferar selectivamente el microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol o pueden potenciar la capacidad de conversión en equol del microorganismo para elevar de este modo el nivel de equol. Por lo tanto, cuando se usa dicho sacárido en combinación con el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol, la mezcla puede servir como un potenciador del nivel de equol más potente. Se pueden usar estos sacáridos solos o en combinación de dos o más especies. Se puede usar la forma D o bien la forma L de los mismos, pero se usa preferentemente la forma D. También se puede usar un anhidrato o un hidrato tal como un pentahidrato.

La trehalosa tiene los isómeros de forma  $\alpha,\alpha$ , forma  $\alpha,\beta$  y forma  $\beta,\beta$  que difieren en el modo de unión entre dos moléculas de glucosa. Entre ellos, se puede usar cualquier forma isómera, pero es preferente la forma  $\alpha,\alpha$ . El inositol comprende nueve estereoisómeros: mio-inositol, D(+)-inositol, L(-)-inositol, muco-inositol, escilo-inositol, cis-inositol, epi-inositol, alo-inositol y neo-inositol. En la naturaleza, están presentes mio-inositol, D(+)-inositol, L(-)inositol, muco-inositol y escilo-inositol. Desde el punto de vista de la disponibilidad, se usa preferentemente mio-inositol. Como es obvio, se pueden usar dos o más estereoisómeros de inositol en combinación.

El sacárido empleado en la presente invención puede ser un producto comercial tal como un producto sintético o un extracto natural. De forma alternativa, también se puede usar un material natural que contiene una gran cantidad del sacárido. Los ejemplos específicos del material que contiene una gran cantidad de adonitol comprenden raíz de planta y un material que contiene riboflavina. Los ejemplos específicos del material que contiene una gran cantidad de sorbosa comprenden frutos. Los ejemplos específicos del material que contiene una gran cantidad de melecitosa comprenden néctar y una secreción de planta. Los ejemplos específicos del material que contiene una gran cantidad de trehalosa comprenden hongos.

La composición de la presente invención puede contener además daidzeína. Puesto que la daidzeína sirve como sustrato para formar equol, el uso de daidzeína en combinación con el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol y con los sacáridos mencionados anteriormente proporciona un potenciador del nivel de equol más potente. La daidzeína usada en la presente invención puede ser un producto comercial tal como un producto sintético o un extracto natural. De forma alternativa, también se puede usar un material natural que contiene una gran cantidad de daidzeína o un producto procesado del mismo. Los ejemplos específicos del material que contiene una gran cantidad de daidzeína comprenden soja, guisantes comunes, kuzu (*Pueraria hirsuta*) y trébol. Los ejemplos del producto procesado comprenden cuajada de soja (tofu), leche de soja, tofu frito (*abura-age*), soja fermentada (*natto*), salsa de soja (*shoyu*), pasta de soja (*miso*) y tempeh. Puesto que un glucósido de isoflavona se transforma en un aglicón correspondiente por la acción de enterobacterias presentes en el cuerpo, se puede emplear daidzeína como una forma de glucósido tal como daidzina, malonildaidzina o acetildaidzina. De forma alternativa, también se puede usar un metabolito intermedio de la conversión de daidzeína en equol, por ejemplo, dihidrodaidzeína. Como se usa en el presente documento, el término "daidzeína" también se refiere a estas formas glucosídicas y metabolitos intermedios.

No se impone una limitación estricta sobre la dosis del alimento/bebida o composición farmacéutica de la presente invención que contiene un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol. Preferentemente, se predetermina la dosis para lograr el efecto diana de acuerdo con diferentes modos de uso; por ejemplo, los sujetos diana y las enfermedades y trastornos diana. La dosis de microorganismos diaria (reducida a células viables) es preferentemente de  $10^5$  células a  $10^{10}$  células, de forma particularmente preferente de  $10^6$  células a  $10^9$  células. El contenido en sacárido de la composición es preferentemente de un 0,5 a un 50 % en masa, más preferentemente de un 1 a un 10 % en masa, y el contenido en daidzeína de la composición (reducido a daidzeína) es preferentemente de 5 a 2000  $\mu\text{M}$ , más preferentemente de 100 a 800  $\mu\text{M}$ .

La composición de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral. Sin embargo, es preferente la administración oral de la composición. En un modo de administración, la composición que contiene como principio activo un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol se mezcla con un vehículo farmacéutico no tóxico sólido o líquido seleccionado dependiendo del procedimiento de administración (por ejemplo, administración oral, administración rectal o inyección), para producir de este modo una preparación farmacéutica común.

Los ejemplos de la preparación farmacéutica mencionada anteriormente comprenden preparaciones sólidas tales como comprimido, gránulos, polvo y cápsula; preparaciones líquidas tales como solución, suspensión y emulsión; y preparaciones liofilizadas. Estas preparaciones se pueden producir a través de un procedimiento de fabricación común. Los ejemplos del vehículo farmacéutico no tóxico comprenden almidón, dextrina, glicérido de ácido graso, polietilenglicol, hidroxietilalmidón, etilenglicol, éster de ácido graso de polioxietilensorbitano, aminoácido, gelatina, albúmina, agua y solución salina fisiológica. Si se requiere, la preparación puede contener apropiadamente aditivos comunes tales como un estabilizante, un agente humectante, un emulsionante, un aglutinante, un agente de tonicidad y un excipiente.

La composición de alimento/bebida de la presente invención se puede usar tal cual o junto con una variedad de componentes nutricionales. La composición de alimento/bebida de la presente invención se puede usar como alimento natural o material alimenticio con el propósito de elevar el nivel de equol *in vivo* o útil para la mejora, prevención, etc., del síndrome menopáusico tal como dolencia indefinida; osteoporosis; hiperlipidemia; arterioesclerosis; cáncer de mama; cáncer de próstata; y síndrome premenstrual. Estos alimentos y bebidas, o sus envases, pueden tener una etiqueta que indique dichos efectos. Específicamente, cuando se emplea como alimento o bebida, la composición de la presente invención se mezcla apropiadamente con un aditivo que se puede usar en un alimento o bebida, y la mezcla se puede preparar, a través de medios convencionales, en una forma adecuada para comer y beber; por ejemplo, gránulos, partículas, comprimido, cápsula o pasta. La composición se puede añadir a una variedad de alimentos; por ejemplo, productos de carne procesada (por ejemplo, jamón y salchicha),

productos de pescado procesado (por ejemplo, *kamaboko* y *chikuwa*), pan, confitería, mantequilla, leche en polvo y productos lácteos fermentados, o se puede añadir a bebidas tales como agua, zumo de frutas, leche, refresco y bebida a base de té. Como se usa en el presente documento, el término "alimento o bebida" engloba piensos.

5 Al hacer que el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol actúe sobre la daidzeína, se puede producir equol con eficacia alta. No se impone ninguna limitación particular sobre la forma del microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol, y se pueden usar células viables o bien células desnaturalizadas térmicamente (células muertas). Además, se puede usar un producto liofilizado del mismo, un producto de cultivo (por ejemplo, sobrenadante de cultivo), un producto celular tratado, etc. Notablemente, puesto  
10 que se considera que la capacidad de conversión en equol se ejerce por una enzima que se origina a partir del microorganismo, el microorganismo se emplea preferentemente en un estado donde se inhibe la inactivación de la enzima. En comparación con bacterias productoras de equol conocidas, el microorganismo de la presente invención tiene una capacidad de conversión en equol notablemente alta y, por tanto, puede producir equol con alto rendimiento y bajo coste.

15 En un procedimiento de producción específico, se añade daidzeína a un medio de cultivo a una concentración de 10 a 1000  $\mu\text{M}$ , y se inocula el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol en el medio a una concentración de  $10^6$  a  $10^{10}$  células/ml de medio, seguido de cultivo anaerobio a 37 °C durante 8 horas o más, para producir de este modo equol. Al medio de cultivo se le añade preferentemente al menos un  
20 sacárido que tiene una acción potenciadora del nivel de equol seleccionado de adonitol, arabinosa, eritritol, galactosa, lactitol, melecitosa, trehalosa, ribosa, sorbosa, xilosa, inositol y sorbitol en una cantidad de un 1 a un 10 % en masa. También se pueden añadir al medio otros componentes apropiados tales como una fuente de nitrógeno. Sin embargo, no es preferente el uso de un componente que inhiba la proliferación del microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol o que inhiba la capacidad de conversión en  
25 equol. Los ejemplos del componente que se puede añadir al medio comprenden peptona, peptona Trypticase, extracto de levadura, hemina, vitamina tal como vitamina K1, clorhidrato de L-cisteína,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$ . Excepto daidzeína y el sacárido que tienen una acción potenciadora del nivel de equol, el medio de cultivo de la presente invención puede tener una composición de, por ejemplo, el medio PY, el medio GAM, el medio BHI, etc.

30 La daidzeína, que sirve como sustrato, puede ser un producto comercial tal como un producto sintético o un extracto natural. De forma alternativa, también se puede usar un material natural que contiene una gran cantidad de daidzeína o un producto procesado del mismo. Todavía de forma alternativa, se puede emplear daidzeína como una forma de glucósido tal como daidzina, malonildaidzina o acetildaidzina. En este caso, se puede usar un  
35 microorganismo conocido (por ejemplo, *Bifidobacterium*) o enzima (por ejemplo,  $\beta$ -glucosidasa) que puede transformar un glucósido de isoflavona en un aglicón correspondiente en combinación con el microorganismo de la presente invención.

40 En lugar de realizar el cultivo con el microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol, se puede usar una enzima que se origina a partir del microorganismo y que tiene una capacidad de conversión en equol. No se impone ninguna limitación particular sobre el modo de uso de la enzima, y los ejemplos específicos del modo comprenden el uso de un producto de cultivo como tal; uso de un concentrado o  
45 sedimento de un producto de cultivo obtenido a través de un procedimiento de concentración tal como centrifugación o tratamiento con membrana; uso de células en reposo; uso de células secas; uso de células rotas; uso de solución enzimática bruta; uso de solución enzimática purificada; y uso de enzima en polvo.

No se impone ninguna limitación particular sobre las condiciones de purificación y el grado de purificación de la enzima, y se puede emplear una técnica de purificación convencional. En un procedimiento de purificación, se  
50 cultiva un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol, y se separan las células del producto de cultivo por medios de separación tales como centrifugación, separación por membrana orgánica o separación por membrana inorgánica. Cuando el sobrenadante del cultivo contiene la enzima diana, el sobrenadante recuperado se puede emplear como una solución enzimática bruta. En el caso en el que las células contengan la enzima diana, las células se rompen físicamente por medio de un homogeneizador o a través de ultrasonificación. De forma alternativa,  
55 las células se tratan enzimáticamente con una enzima de lisis de pared celular, para proporcionar de este modo un endoextracto, que se puede emplear como una solución enzimática bruta. Estas soluciones enzimáticas brutas se pueden tratar, por ejemplo, a través de precipitación con sulfato de amonio, diálisis, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad, en combinación apropiada, para proporcionar de este modo una solución enzimática de alta pureza que tiene un grado de purificación mayor.

60 El microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol o la enzima que se origina a partir del microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol pueden ser un producto inmovilizado obtenido a través de una técnica de inmovilización convencional. No se impone ninguna limitación particular sobre la técnica de inmovilización, y los ejemplos de la técnica de inmovilización comprenden unión por soporte, reticulación y  
65 atrapamiento. Los ejemplos de unión por soporte comprenden enlace covalente, unión iónica y adsorción física; los ejemplos de reticulación comprenden el procedimiento de glutaraldehído; y los ejemplos de atrapamiento

comprenden atrapamiento en forma de retículo y atrapamiento en microcápsulas. Los ejemplos más específicos comprenden adsorción sobre carbón activado, serrín, etc.; unión a CM-celulosa, P-celulosa, DEAE-celulosa, ECTEOLA-celulosa, etc.; reticulación con glutaraldehído, diisocianato de tolieno, etc.; y atrapamiento con acrilamida, κ-carragenano, ácido alginico, gelatina, acetato de celulosa, etc. La bacteria o enzima así inmovilizada se puede emplear en un procedimiento convencional (por ejemplo, modo discontinuo, con columna, etc.) y de forma individual, repetida o continua.

En la producción de equol anterior, se puede emplear un producto de cultivo que contiene equol (por ejemplo, sobrenadante de cultivo) como tal. De forma alternativa, el producto de cultivo se puede someter a un procedimiento de separación/purificación convencional tal como cromatografía en columna o extracción con disolvente orgánico, para separar de este modo equol del producto de cultivo. El producto de cultivo así obtenido se puede adsorber sobre una columna de intercambio iónico, seguido de elución con metanol, para proporcionar de este modo un producto purificado en equol.

El fragmento de ácido nucleico que se puede hibridar específicamente con el ADN y/o ARN del microorganismo de la presente invención que tiene una capacidad de conversión en equol se obtuvo comparando, con una base de datos (DDBJ, Genbank, etc.), la secuencia de nucleótidos de *Slackia* sp. YIT 11861 que los autores de la presente invención obtuvieron previamente a través de secuenciación. En la producción del fragmento de ácido nucleico, se empleó como diana un gen de ARNr 16S, que es altamente fiable para servir como índice filogenético. Puesto que el análisis del fragmento requiere PCR o medios similares, se empleó un ADN en lugar de un ARN.

En el diseño del fragmento de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr 16S de una bacteria diana perteneciente al género *Slackia* que tiene una capacidad de conversión en equol se alineó con la de una bacteria estrechamente relacionada. Específicamente, la alineación se realizó seleccionando una bacteria estrechamente relacionada perteneciente a la familia *Coriobacteriaceae* (el género *Atopobium*, *Collinsella*, etc.) en base al sistema filogenético que emplea la secuencia génica actual como índice. Como resultado, se obtuvieron fragmentos de ácido nucleico que tienen una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2. El fragmento de ácido nucleico que se puede hibridar específicamente con el ADN y/o ARN de la bacteria diana no se limita a la secuencia así diseñada, y los expertos en la técnica pueden concebir otros equivalentes en base al sentido técnico común. Los ejemplos de dichos equivalentes comprenden un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia así diseñada y un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a cualquiera de las secuencias anteriores y que es funcionalmente equivalente al fragmento de ácido nucleico anterior. Los ejemplos del fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga y que es funcionalmente equivalente comprenden los siguientes fragmentos de ácido nucleico (a) a (c):

(a) un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma, donde una o varias bases, preferentemente de 1 a 10 bases, se suprimen, se sustituyen o se añaden;

(b) un fragmento de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de un 90 % o mayor, preferentemente un 95 % o mayor, más preferentemente un 99 % o mayor, con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma; y

(c) un fragmento de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con un fragmento de ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la misma, siempre que estos ejemplos se puedan emplear en la detección, identificación y cuantificación del microorganismo diana.

La identidad de una secuencia de nucleótidos se calcula por medio de un programa de análisis de homología, GENETYX(R). El término "condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, al caso en el que la hibridación se lleva a cabo en una solución que contiene formamida al 50 %, 5xSSC, 5x solución de Denhardt y 250 mg/ml de ADN de esperma de salmón a 42 °C durante de 16 a 24 horas.

Los fragmentos de ácido nucleico así diseñados se pueden sintetizar artificialmente, según las secuencias de nucleótidos de los mismos, por medio de un sintetizador de ADN. La especificidad de los fragmentos de ácido nucleico se investigó por el uso de cada fragmento de ácido nucleico como cebador y se confirmó por el uso, como índices, de la presencia de amplicones con respecto a las siguientes 18 cepas estrechamente relacionadas *Atopobium fossor* JCM 9981<sup>T</sup>, *Atopobium minutum* JCM 1118<sup>T</sup>, *Atopobium parvulum* JCM 10300<sup>T</sup>, *Atopobium rimae* JCM 10299<sup>T</sup>, *Atopobium vaginae* DSM 15829<sup>T</sup>, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986<sup>T</sup>, *Collinsella intestinalis* JCM 10643<sup>T</sup>, *Collinsella stercoris* JCM 10641<sup>T</sup>, *Cryptobacterium curtum* DSM 15641<sup>T</sup>, *Denitrobacterium detoxificans* CCUG 47027<sup>T</sup>, *Eggerthella hongkongensis* JCM 14552<sup>T</sup>, *Eggerthella lenta* ATCC 25559<sup>T</sup>, *Eggerthella sinensis* JCM 14551<sup>T</sup>, *Olsenella profusa* JCM 14553<sup>T</sup>, *Olsenella uli* JCM 12494<sup>T</sup>, *Slackia exigua* JCM 11022<sup>T</sup>, *Slackia faecicanis* JCM 14555<sup>T</sup>, y *Slackia heliotrinireducens* JCM 14554<sup>T</sup>, y de la presencia de amplicones con respecto a 27 enterobacterias típicas y cepas de bacterias patógenas (mostradas en los ejemplos a continuación). Como resultado, se verificó una especificidad adecuada.

Puesto que el fragmento de ácido nucleico tiene especificidad para un microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol, el microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol se puede detectar, identificar y cuantificar específicamente a través de PCR con el ADN o ARN recuperado de heces o contenido del tubo digestivo de seres humanos o de animales, o a través de FISH (hibridación fluorescente *in situ*) o medios similares. A través de la cuantificación del microorganismo que tiene una capacidad de conversión en equol, se puede comprobar fácilmente la capacidad de producción de equol que un individuo posee originalmente, de este modo se puede determinar el riesgo de padecer una variedad de enfermedades y trastornos para los que equol es eficaz tales como síndrome menopáusico tal como dolencia indefinida; osteoporosis; hiperlipidemia; arterioesclerosis; cáncer de mama; cáncer de próstata; y síndrome premenstrual. Por tanto, se pueden tomar eficazmente medidas de precaución (por ejemplo, administración de la composición de la presente invención) para un ser humano que tiene poca o ninguna capacidad de producción de equol. Además, a través de, por ejemplo, la administración de la composición de la presente invención, se puede tratar o hacer que mejore un ser humano que padece una enfermedad de este tipo y que tiene poca o ninguna capacidad de producción de equol.

El análisis por PCR o por RT-PCR se puede realizar a través de, por ejemplo, las siguientes etapas: (1) una etapa de extracción de un ADN o ARN contenido en una muestra; (2) una etapa de realización de PCR o RT-PCR por el uso de uno o más de los fragmentos de ácido nucleico mencionados anteriormente; y (3) una etapa de detección de un fragmento de ADN amplificado en la etapa (2). Cuando la reacción de amplificación se realiza usando el fragmento de ácido nucleico de la presente invención en combinación con un ADN molde derivado de la muestra (ADNc en el caso en el que la plantilla sea ARN), se puede obtener un fragmento de ADN (producto de PCR) específico para una bacteria diana perteneciente al género *Slackia*. A través de la electroforesis del fragmento de ADN así obtenido, la bacteria diana perteneciente al género *Slackia* se puede detectar e identificar específicamente en base a la presencia o ausencia de una banda.

Cuando se realiza la PCR con dilución progresiva del ADN o ARN (ADNc) molde, se puede cuantificar una bacteria perteneciente al género *Slackia*. En la cuantificación por PCR, se puede emplear el procedimiento mencionado anteriormente, pero se emplea más preferentemente la PCR en tiempo real. A través del seguimiento del producto de PCR formado a través de la amplificación por PCR y la determinación del número de ciclos de PCR en el momento en el que el nivel de ADN ha alcanzado una determinada cantidad, se puede cuantificar una bacteria perteneciente al género *Slackia* contenida en la muestra.

El seguimiento del producto de PCR formado a través de la amplificación se puede realizar marcando el producto de PCR con un colorante fluorescente intercalante tal como SYBR(R) Green I y midiendo la intensidad de fluorescencia en cada fase de PCR. Puesto que el colorante intercalante potencia la intensidad de fluorescencia por medio de la intercalación con un ácido nucleico bicatenario, se puede someter a ensayo correctamente el producto de PCR formado a través de la PCR del ADN (ADNc en el caso en el que el molde sea ARN) de la bacteria diana. Entre los colorantes intercalantes, se emplea de forma particularmente preferente SYBR(R) Green I.

A través de la determinación del número de ciclos de PCR en el momento en el que la intensidad de fluorescencia (nivel de ADN) ha alcanzado un nivel predeterminado (a continuación en el presente documento denominado valor  $C_T$ ), la bacteria diana contenida en la muestra se puede cuantificar, detectar o identificar. Este análisis también se puede realizar por el uso de la sonda TaqMan, baliza molecular, marcada con un colorante fluorescente, etc. Una sonda TaqMan o baliza molecular es una sonda en la que un colorante fluorescente y un extintor se unen a un oligonucleótido que tiene una homología con una secuencia interna de una región que se amplifica por PCR. La sonda se emplea adicionalmente en PCR. Puesto que la fluorescencia dependiente de la reacción de amplificación por PCR se emite a través de la interacción entre el colorante fluorescente y el extintor unido a la sonda, se puede realizar el seguimiento del producto de PCR formado a través de la amplificación midiendo la intensidad de fluorescencia en cada fase de PCR.

La bacteria diana perteneciente al género *Slackia* contenida en la muestra se puede cuantificar, detectar o identificar por medio de una curva de calibración entre el valor  $C_T$  y el recuento celular logarítmico determinado por el procedimiento de cultivo o un procedimiento similar. Específicamente, los valores  $C_T$  se representan a lo largo del eje vertical y los recuentos celulares diana logarítmicos se representan a lo largo del eje horizontal, para dibujar de este modo una curva de calibración con antelación. A continuación, se aplica un valor  $C_T$  obtenido a través de PCR a la curva de calibración, de este modo la bacteria diana perteneciente al género *Slackia* contenida en la muestra se puede cuantificar, detectar o identificar.

El fragmento de ácido nucleico se emplea como cebador en PCR, y el fragmento como tal también se puede emplear como sonda y emplearse con un cebador, oligonucleótido, etc., universal conocido, en combinación.

Los ejemplos del análisis que emplea el fragmento de ácido nucleico como sonda comprenden hibridación *in situ* e hibridación de inmunotransferencia por puntos. De estos, es preferente la hibridación *in situ* como procedimiento analítico rápido, puesto que no requiere ninguna etapa de extracción del ácido nucleico contenido en una muestra. Más preferentemente, se emplea FISH, que emplea un fragmento de ácido nucleico marcado con un colorante fluorescente.

Específicamente, la FISH se puede realizar a través de las siguientes etapas: (1) una etapa de fijación de una muestra con formaldehído o formalina; (2) una etapa de aplicación de la muestra fijada sobre un portaobjetos de vidrio o filtro de membrana; (3) una etapa de realización de la hibridación con un fragmento de ácido nucleico marcado con el colorante fluorescente; (4) una etapa de lavado del fragmento de ácido nucleico que queda después de la hibridación y fragmentos de ácido nucleico no unidos específicamente; y (5) una etapa de observación visual de los resultados de hibridación bajo un microscopio de fluorescencia u obtención de una imagen de la misma por medio de una cámara CCD o un aparato similar.

Cuando la bacteria diana perteneciente al género *Slackia* está presente en la muestra, la bacteria se hibrida con el fragmento de ácido nucleico empleado y se obtiene la señal positiva después de la hibridación. En base a la señal positiva, la bacteria se puede detectar o identificar específicamente. A través del recuento de las células bacterianas, la bacteria se puede cuantificar.

La presente invención se describirá a continuación con más detalle por medio de los ejemplos de prueba y ejemplos.

### Ejemplos

Ejemplo de prueba 1: Recuperación de bacterias que tienen una capacidad de conversión en equol

Se suspendieron suficientemente heces recientes excretadas por un productor de equol sano en 10 veces el volumen de un diluyente (0,00255 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,00255 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,006 % de  $\text{NaCl}$ , 0,00255 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,000255 % de  $\text{CaCl}_2$ , 0,000255 % de  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 % de una solución de resazurina al 0,1 %, 2,2 % de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 8 %, y 0,05 % de clorhidrato de L-cisteína) en presencia de microesferas de vidrio ( $\phi$ : 3 mm) en condiciones anaerobias, y se retiró el residuo de la suspensión a través de gasa esterilizada. Se centrifugó la suspensión así purificada a 8.000xg durante 10 minutos y se suspendió el precipitado en un diluyente de volumen equivalente, y se mantuvo el resultado a -30 °C en condiciones de congelación. Se descongeló la solución diluida de heces congelada para su uso y se centrifugó a 8.000xg durante 10 minutos. Se suspendió el precipitado así recuperado en un medio PY que contenía sorbosa como fuente de azúcar (0,5 % de peptona, 0,5 % de peptona Trypticase, 1 % de extracto de levadura, 0,00005 % de hemina, 0,0001 % de vitamina K1, 0,05 % de clorhidrato de L-cisteína, 0,0006 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,0006 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,0012 % de  $\text{NaCl}$ , 0,0006 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,00006 % de  $\text{CaCl}_2$  y 0,00006 % de  $\text{MgSO}_4$ ). Se incubó la suspensión a 37 °C en una mezcla de gases ( $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2 = 88:7:5$ ) durante de 24 a 48 horas. Se repitió el cultivo seis veces (hasta la séptima generación). Se diluyó el producto de cultivo resultante con el mismo medio para preparar una solución diluida  $10^6$  veces, y se aplicó una alícuota (50  $\mu\text{l}$ ) de la solución a 20 láminas de medio de placa de GAM agar (1 % de glucosa añadida). Se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas en una cámara de bioseguridad con guantes anaerobia, para formar de este modo colonias. Se clasificaron las colonias así obtenidas en 26 tipos en términos de características de colonia (aspecto de superficie, tamaño) e imágenes de tinción de Gram. Se seleccionó una colonia típica de cada tipo y se inocularon las muestras celulares de la colonia en un medio líquido de GAM (1 % de glucosa añadida) que contenía daidzeína a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , seguido de incubación a 37 °C durante 24 horas en una mezcla de gases ( $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2 = 88:7:5$ ). Se determinó la concentración de equol de cada una de las soluciones de cultivo así obtenidas a través de HPLC, para detectar de este modo un bacilo grampositivo que tiene una capacidad de conversión de daidzeína en equol alta. Se realizó la HPLC en las siguientes condiciones.

Aparato: LC module 1 (Waters)

Columna: YMC-Pack CN (producto de Y.M.C)

Detección: Espectrofotómetro UV (longitud de onda de medida: 280 nm)

Temperatura de columna: 40 °C

Fase móvil: ácido fórmico al 0,1 %

mezcla de solución/acetronitrilo/metanol (87:3:10)

Caudal: 2,5 ml/min

Inyección de muestra: 10  $\mu\text{l}$

Ejemplo de prueba 2: Análisis filogénico molecular y propiedades bioquímicas de una bacteria que tiene una capacidad de conversión en equol

Se realizó la PCR, dirigida con ARN ribosómico 16S (ARNr 16S), por el uso de un genoma de la bacteria aislada en el ejemplo de prueba 1 como molde y los cebadores 27f (SEQ ID NO: 3) y 1552r (SEQ ID NO: 4), para producir de este modo un producto de amplificación de aproximadamente 1.500 pb. Se empleó el fragmento así obtenido como molde, y se realizó la PCR de secuenciación. Se realizó la PCR de secuenciación por medio del kit BigDye(R)

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) según un procedimiento divulgado en un manual de producto adjunto al mismo. Se empleó el analizador genético AB 3130 (Applied Biosystems) como secuenciador. Se llevaron a cabo el análisis filogenético molecular y el análisis de homología de la secuencia de ARNr 16S por medio de Clustal X v1.83, TreeView v1.6.6 y GENETIX(R) Ver.7 (Genetics). Como resultado, se descubrió que la cepa pertenecía a la familia *Coriobacteriaceae* (fig. 1). Aunque *Slackia exigua* ATCC 700122<sup>T</sup> fue el pariente filogenético conocido más cercano, la cepa presentó una homología baja (92,4 %). Se descubrió que la cepa obtenida en el ejemplo de prueba 1 tenía una homología de un 99 % o mayor con respecto a *Slackia* spp. TM-30 divulgada en el documento de patente 3 y estas cepas formaron un agrupamiento con cepas bacterianas no cultivadas registradas en la base de datos. Por lo tanto, se pensó que posiblemente la cepa del ejemplo de prueba 1 era de la misma especie que *Slackia* spp. TM-30.

Se investigaron las propiedades bioquímicas de la cepa del ejemplo de prueba 1 y *S. exigua* ATCC 700122<sup>T</sup>, que es el pariente filogenético conocido más cercano analizado a través del análisis de secuencia de ARNr 16S, por medio de Rapid ID 32A (SYSMEX bioMerieux Co., Ltd.). Se cultivó cada bacteria sometida a prueba en un medio de GAM agar (1 % de glucosa añadida) a 37 °C durante 24 horas en condiciones anaerobias. Se emplearon dos láminas de medio de GAM agar (1 % de glucosa añadida) con respecto a un kit de identificación. Se realizaron la preparación de la solución bacteriana aplicada al kit, la reacción y la determinación según un manual adjunto al kit. La tabla 1 muestra los resultados. En el análisis por medio de Rapid ID 32A, la bacteria que tiene una capacidad de conversión en equol presentó propiedades considerablemente diferentes de las de *S. exigua* ATCC 700122<sup>T</sup>. Además, en el análisis por medio de Rapid ID 32A, la bacteria que tiene una capacidad de conversión en equol presentó utilización de D-manosa y utilización de D-rafinosa y fue positiva para fosfatasa alcalina. Estas propiedades bioquímicas difieren de las de *Slackia* spp. TM-30 divulgada en el documento de patente 3. Por lo tanto, se descubrió que la cepa del ejemplo de prueba 1 era diferente de las cepas divulgadas. Por tanto, los estudios en biología molecular y bioquímica han revelado que se cree que la cepa es una cepa novedosa perteneciente al género *Slackia*, y los autores de la presente invención han denominado la cepa como una bacteria perteneciente al género *Slackia*, YIT 11861 (*Slackia* sp. YIT 11861).

[Tabla 1]

Comparación de propiedades bioquímicas analizadas por medio de Rapid ID 32A			
	<i>Slackia</i> sp. YIT 11861	<i>Slackia exigua</i> ATCC 700122 <sup>T</sup>	<i>Slackia</i> spp. TM-30*
Ureasa	-	-	-
Arginina dihidrolasa	+	+	+
α-Galactosidasa	-	-	-
β-Galactosidasa	-	-	-
β-Galactosidasa-6-fosfato	-	-	-
α-Glucosidasa	-	-	-
β-Glucosidasa	-	-	-
α-Arabinosidasa	-	-	-
β-Glucuronidasa	-	-	-
N-Acetil-β-glucosaminidasa	-	-	-
D-Manosa	+	+	-
D-Rafinosa	+	+	-
Glutamato descarboxilasa	+	+	+
α-Fucosidasa	-	-	-
Reducción con nitrato	-	-	-
Indol	-	-	-
Fosfatasa alcalina	+	-	-
Arginina arilamidasa	-	+	+
Prolina arilamidasa	-	+	-
Leucilglicina arilamidasa	-	-	-
Fenilalanina arilamidasa	-	+	-
Leucina arilamidasa	-	+	-
Piroglutamato arilamidasa	-	-	-
Tirosina arilamidasa	-	+	-
Alanina arilamidasa	-	+	-
Glicina arilamidasa	-	+	-

Comparación de propiedades bioquímicas analizadas por medio de Rapid ID 32A			
	<i>Slackia</i> sp. YIT 11861	<i>Slackia exigua</i> ATCC 700122 <sup>T</sup>	<i>Slackia</i> spp. TM-30*
Histidina arilamidasa	-	+	-
Glutamilglutamato arilamidasa	-	-	-
Serina arilamidasa	-	+	-

\*Divulgado en el documento de patente 3

Ejemplo de prueba 3: Actividad de conversión de daidzeína en equol de *Slackia* sp. YIT 11861

- 5 Se investigó la actividad de conversión de daidzeína en equol de *Slackia* sp. YIT 11861. Se inoculó la bacteria en un medio GAM que contenía daidzeína a una concentración de 100 o 400  $\mu\text{M}$  a la concentración celular de  $10^7$  células/ml de medio, y se mantuvo el medio a 37 °C. Se determinó la concentración de equol de la solución de cultivo a través de HPLC para una pluralidad de tiempos durante el transcurso del cultivo, para determinar de este modo la actividad de conversión de daidzeína en equol.
- 10 Los resultados se muestran en la tabla 2. También se investigaron las actividades de algunas cepas bacterianas divulgadas en memorias descriptivas de patente y en artículos y se compararon con la actividad de la bacteria de la presente invención. Como resultado, *Slackia* sp. YIT 11861 convirtió 100  $\mu\text{M}$  de daidzeína en equol en incubación durante 8 horas a un porcentaje de conversión de un 95 % y durante 24 horas al 100 %, y 400  $\mu\text{M}$  de daidzeína en equol en incubación durante 24 horas a un porcentaje de conversión de un 94 % y durante 96 horas al 100 %. Por el
- 15 contrario, una cepa do-03 de bacteria grampositiva (documento distinto de patente 3) convirtió 193  $\mu\text{M}$  de daidzeína en equol en incubación durante 48 horas a un porcentaje de conversión de un 33 % (concentración celular inicial: no divulgada, concentración celular final:  $\text{DO}_{660} = 0,277$ ; posiblemente de  $10^6$  a  $10^8$  células/ml de medio), y la cepa TM-30 convirtió 391  $\mu\text{M}$  de daidzeína en equol en incubación durante 24 horas a un porcentaje de conversión de apenas aproximadamente un 1 % (concentración celular inicial: no divulgada, concentración celular final:  $10^9$  células/ml de medio). En el caso de la cepa 92-90 de *L. gariviae*, se requirieron 72 horas para una conversión del 100 % de apenas 42  $\mu\text{M}$  de daidzeína en equol, y no se produjo conversión (0 %) en incubación durante 24 horas (concentración celular inicial:  $10^7$  células/ml de medio). Por tanto, se descubrió que *Slackia* sp. YIT 11861 tenía una
- 20 actividad de conversión de daidzeína en equol notablemente mayor que la de cepas bacterianas conocidas.

25 [Tabla 2]

Actividad de conversión de daidzeína en equol de <i>Slackia</i> sp. YIT 11861 y comparación con cepas conocidas								
Cepa	Condición de reacción			Concentración de isoflavona ( $\mu\text{M}$ )			Tasa de conversión de daidzeína en equol (%)	Referencia
	Temp. (°C)	Tiempo (h)	Conc. daidzeína inicial ( $\mu\text{M}$ )	Daidzeína	Equol	DHD*		
<i>Slackia</i> sp. YIT 11861	37	6	100	49,7	44,4	1,8	44	Este estudio
	37	8	100	0,9	95	5,5	95	
	37	24	100	0,8	107	1,1	100	
	37	24	400	1,2	376	31,5	94	
	37	96	400	2,1	417	0,0	100	
Bacteria grampositiva do-03	37	48	193	62,3	64	45,3	33	Documento distinto de patente 3
	37	96	193	ND**	139	ND	72	
<i>Slackia</i> spp. TM-30	37	24	391	269	4,2	ND	1	Documento de patente 3
<i>Lactococcus gariviae</i> cepa 92-90	37	24	42	42	0	0	0	Documento de patente 2
	37	96	42	0	42	0	100	

DHD\*: dihidrodaidzeína, ND\*\*: No descrito

Ejemplo de prueba 4: Diseño del fragmento de ácido nucleico específico para *Slackia* sp. YIT 11861

- 30 Se diseñó un cebador en base a una secuencia característica de *Slackia* sp. YIT 11861. Específicamente, se obtuvo una secuencia de ARNr 16S de una bacteria perteneciente a la familia *Coriobacteriaceae* a partir de una base de

datos pública (DDBJ/GENEBANK/EMBL), y se alinearon las secuencias así obtenidas de cepas estrechamente relacionadas con una secuencia de ARNr de la cepa YIT 11861 por medio de Clustal X v1.83, de este modo se diseñaron los cebadores eq430-F/eq665-R con respecto a una región específica (SEQ ID NO: 1 y 2). Se diluyó 10 veces progresivamente el ARN extraído a partir de células de *Slackia* sp. YIT 11861 ( $2 \times 10^8$  células/ml) para ajustar la concentración (reducida a concentración celular) a de  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^{-1}$  células/ml. Se empleó una alícuota (5  $\mu$ l) del ARN diluido como molde, y se realizó una RT-PCR cuantitativa. Se realizó la RT-PCR cuantitativa por medio del kit de RT-PCR OneStep (QIAGEN). Se sometió la mezcla de reacción a transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos y a continuación se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar la transcriptasa inversa. Posteriormente, se realizó una PCR durante 45 ciclos (cada ciclo: 94 °C durante 20 s, 60 °C durante 20 s, y 72 °C durante 50 s). Como resultado, se descubrió que la amplificación por PCR por el uso de los cebadores estaba correlacionada con el recuento celular en el intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^3$  células. Esto es, se pueden cuantificar  $10^3$  células por 1 g de heces (fig. 2).

Se estudió la especificidad de los cebadores con respecto a enterobacterias típicas, bacterias causantes de infección y cepas estrechamente relacionadas pertenecientes a la familia *Coriobacteriaceae*, que se dan en la tabla 3. Específicamente, se extrajo un ARN a partir del cultivo axénico de cada cepa cuyo recuento celular se había determinado con antelación a través del procedimiento de tinción con DAPI, y se ajustó la concentración de ARN (reducida a concentración celular) a  $2 \times 10^5$  células/ml. Se suministró ARN (equivalente a  $1 \times 10^5$  células/ml) en una reacción, y se realizó una RT-PCR cuantitativa en las condiciones mencionadas anteriormente. Se investigó la reactividad del conjunto de cebadores mencionado anteriormente con enterobacterias típicas, bacterias causantes de infección y cepas estrechamente relacionadas pertenecientes a la familia *Coriobacteriaceae*. La tabla 3 muestra los resultados (+: CT $\geq$ 40, -: CT<40).

Se descubrió que el conjunto de cebadores tenía especificidad alta solo para *Slackia* sp. YIT 11861, y no se observó ninguna reacción cruzada con respecto a las otras cepas bacterianas. En la reacción que implica agua sin nucleasa en lugar de una muestra de ARN, no se observó ninguna amplificación de productos no específicos.

[Tabla 3]

Cepas de bacterias sometidas a prueba y especificidad del conjunto de cebadores

Taxón	Cepa	Cebador
		eq430F /eq665R
<i>Slackia</i> sp. YTT11861	YIT 11861	+
<i>Atopobium fosser</i>	JCM 9981 <sup>1</sup>	-
<i>Atopobium minutum</i>	JCM 1118 <sup>1</sup>	-
<i>Atopobium parvulum</i>	JCM 10300 <sup>1</sup>	-
<i>Atopobium rimae</i>	JCM 10299 <sup>1</sup>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	DSM 15829 <sup>1</sup>	-
<i>Collinsella aerofaciens</i>	ATCC 25986 <sup>1</sup>	-
<i>Collinsella intestinalis</i>	JCM 10643 <sup>1</sup>	-
<i>Collinsella stercoris</i>	JCM 10641 <sup>1</sup>	-
<i>Cryptobacterium curtum</i>	DSM 15641 <sup>1</sup>	-
<i>Denitrobacterium detoxificans</i>	CCUG 47027 <sup>T</sup>	-
<i>Eggerthella hongkongensis</i>	JCM 14552 <sup>1</sup>	-
<i>Eggerthella lenta</i>	ATCC 25559 <sup>T</sup>	-
<i>Eggerthella sinensis</i>	JCM 14551 <sup>1</sup>	-
<i>Olsenella profusa</i>	JCM 14553 <sup>1</sup>	-
<i>Olsenella uli</i>	JCM 12494 <sup>1</sup>	-
<i>Slackia exigua</i>	JCM 11022 <sup>1</sup>	-
<i>Slackia faecicanis</i>	JCM 14555 <sup>1</sup>	-
<i>Slackia heliotrinireducens</i>	JCM 14554 <sup>1</sup>	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703 <sup>1</sup>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	DSM 2151 <sup>1</sup>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 <sup>1</sup>	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 25845 <sup>T</sup>	-
<i>Veillonella parvula</i>	ATCC 10790 <sup>1</sup>	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 <sup>T</sup>	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775 <sup>1</sup>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433 <sup>1</sup>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600 <sup>1</sup>	-
<i>Streptococcus mutans</i>	IFO 13955 <sup>1</sup>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560 <sup>1</sup>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145 <sup>1</sup>	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707 <sup>1</sup>	-

Cepas de bacterias sometidas a prueba y especificidad del conjunto de cebadores

Taxón	Cepa	Cebador
		eq430F /eq665R
<i>Bacteroides vulgatus</i>	JCM 5826 <sup>1</sup>	-
<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340 <sup>1</sup>	-
<i>Ruminococcus obeum</i>	ATCC 29174 <sup>1</sup>	-
<i>Clostridium orbiscindens</i>	DSM 6740 <sup>1</sup>	-
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334 <sup>1</sup>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 13316 <sup>1</sup>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047 <sup>1</sup>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883 <sup>1</sup>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434 <sup>T</sup>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990 <sup>1</sup>	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 7073 <sup>1</sup>	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 14987 <sup>1</sup>	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 12826 <sup>1</sup>	-
<i>Pseudomonas putida</i>	JCM 5963 <sup>1</sup>	-

Ejemplo de prueba 5: Análisis de muestras derivadas de ser humano

5 Se extrajo ARN a partir de muestras de heces de 40 voluntarios sanos. Se sometió cada muestra de ARN a RT-PCR cuantitativa por el uso de los cebadores definidos por SEQ ID NO: 1 y 2. Específicamente, se muestrearon heces (20 mg) de cada voluntario, e inmediatamente después, se extrajo el ARN total a través del procedimiento AGPC. El ARN total así obtenido se diluyó apropiadamente y el producto diluido se sometió a RT-PCR cuantitativa según el procedimiento descrito en el ejemplo de prueba 4. Se calculó el recuento celular de *Slackia* sp. YIT 11861 de la muestra a partir de la reactividad del ARN extraído de células de *Slackia* sp. YIT 11861 cuyo recuento se había determinado con antelación. Como resultado, se detectó *Slackia* sp. YIT 11861 en 16 muestras de voluntarios de entre 40 muestras (40 %) a un recuento celular de  $6,4 \pm 2,4$  ( $\log_{10}$ (recuento celular)/g heces).

Ejemplo 1: Producción de equol

15 A un medio de sorbosa-PY que contenía daidzeína (0,025 % de daidzeína, 1 % de sorbosa, 0,5 % de peptona, 0,5 % de peptona Trypticase, 1 % de extracto de levadura, 0,00005 % de hemina, 0,0001 % de vitamina K1, 0,05 % de clorhidrato de L-cisteína, 0,0006 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,0006 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,0012 % de NaCl, 0,0006 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,00006 % de  $\text{CaCl}_2$ , y 0,00006 % de  $\text{MgSO}_4$ ) (10 l), se le añadió *Slackia* sp. YIT 11861 ( $10^8$  células/ml de medio), y se incubó el medio que contenía células a 37 °C en una mezcla de gases ( $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2 = 88:7:5$ ) durante 96 horas. Se centrifugó la solución de cultivo (8.000×g, 15 minutos), y al sobrenadante se le añadió un volumen equivalente de éter dietílico. Se agitó suficientemente la mezcla y se centrifugó de nuevo (1.000×g, 2 minutos), para separar de este modo la mezcla en dos capas. Solo se recuperó la capa de éter dietílico y se secó a 40 °C en un flujo de nitrógeno hasta sequedad, para proporcionar de este modo 2,4 g de equol.

25 Ejemplo 2: Producción de comprimidos

Se mezclaron los ingredientes mostrados en la tabla 4. Se granuló la mezcla, se secó, se refinó y se formaron pellas, para proporcionar de este modo comprimidos.

[Tabla 4]

Formulación	(mg)
Células secas de bacteria de la presente invención <sup>1)</sup>	10
Celulosa microcristalina	100
Trehalosa	15
Estearato de magnesio	0,5
Metilcelulosa	12
Daidzeína	25

30 1) Producido liofilizando células viables de *Slackia* sp. YIT 11861 (que contienen  $10^{10}$  células viables/g).

Ejemplo 3: Producción de refresco

Se mezclaron los ingredientes mostrados en la tabla 5 a través de un procedimiento habitual. Se homogeneizó la mezcla, para proporcionar de este modo un refresco. Se cargó la bebida en un frasco marrón protector frente a la luz, y se selló el frasco con una tapa de aluminio, seguido de tratamiento térmico.

5

[Tabla 5]

Formulación	(g)
Células secas de bacteria de la presente invención <sup>1)</sup>	0,5
Sabor	0,8
Ácido cítrico	0,2
Eritritol	2,5
Lactitol	2,5
Agua	93,5

1) Producido liofilizando células viables de *Slackia* sp. YIT 11861 (que contienen  $10^{10}$  células viables/g).

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA

<120> bacterias productoras de equol y el uso

15

<130> YK0053

<150> JP2009-042867

20

<151> 25-02-2009

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

25

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

30

<213> Artificial

<220>

35

<223> Oligonucleótido como cebador de PCR eq430-F

<400> 1

gggacgaagt cattcgtga 19

40

<210> 2

<211> 19

45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

50

<223> Oligonucleótido como cebador de PCR eq665-R

# ES 2 641 604 T3

<400> 2  
gcatccgagg ctccagtt 19

5 <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN

10 <213> Artificial  
<220>

15 <223> Oligonucleótido como cebador de PCR 27f  
<400> 3  
agagttgat cmtggctcag 20

20 <210> 4  
<211> 20  
<212> ADN

25 <213> Artificial  
<220>

30 <223> Oligonucleótido como cebador de PCR 1552r  
<400> 4  
aaggaggtga tccarccgca 20

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo que tiene una capacidad de convertir daidzeína en equol en 24 horas a una tasa de un 50 % o mayor.
2. El microorganismo según la reivindicación 1, que es una bacteria perteneciente al género *Slackia*.
3. El microorganismo según la reivindicación 1 o 2, que se deriva de heces humanas y/o del contenido del tubo digestivo humano.
4. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es *Slackia* sp. YIT 11861 (FERM ABP-11231).
5. Un alimento/bebida o composición farmacéutica, que comprende un microorganismo como se cita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La composición según la reivindicación 5, que comprende además una o más especies seleccionadas de adonitol, arabinosa, eritritol, galactosa, lactitol, melecitosa, trehalosa, ribosa, sorbosa, xilosa, inositol y sorbitol.
7. La composición según la reivindicación 5 o 6, que comprende además daidzeína.
8. Un procedimiento para producir equol, que comprende hacer que actúe sobre la daidzeína, un microorganismo como se cita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Fig. 1

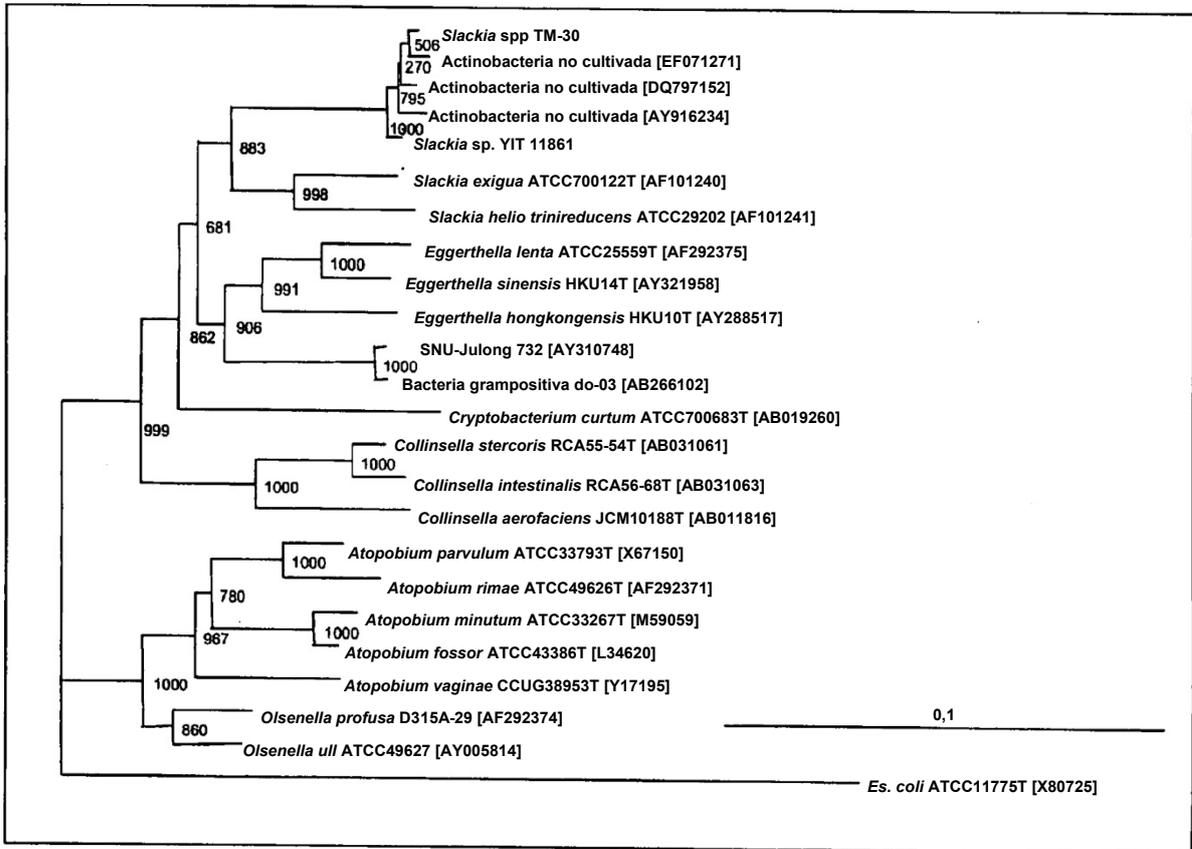


Fig. 2

