

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 871**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97	(2007.01)
A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 8/49	(2006.01)
A61Q 19/10	(2006.01)
A61Q 19/02	(2006.01)
A23L 11/00	(2006.01)
A23L 33/105	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2006 E 12160323 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2474237**

54 Título: **Producto de fermentación del eje embrionario de soja que contiene equol y método de obtención del mismo**

30 Prioridad:

06.12.2005 JP 2005352337
11.10.2006 JP 2006277934

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2018

73 Titular/es:

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, Kanda-Tsukasa-machi, 2-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP

72 Inventor/es:

KIMURA, HIROYUKI;
YAMAUCHI, TAKESHI;
UENO, TOMOMI;
SUZUKI, TOSHIMI;
TADANO, KENTARO;
SATO, IKUTARO;
UCHIYAMA, SHIGETO;
OONO, MASAHIRO y
MIZUNO, MASATOSHI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 672 871 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

Producto de fermentación del eje embrionario de soja que contiene equol y método de obtención del mismo.

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a hipocótilos de soja fermentados que contienen equol y ornitina.

5 Antecedentes de la técnica

Las isoflavonas (isoflavonas de soja: daidzeína, genisteína, gliciteína) contenidas en las semillas de soja presentan estructuras similares a las del estradiol, y muestran acciones anti-estrógeno asociadas a la unión con los receptores del estrógeno (en lo sucesivo denominados RE) y unas acciones similares a las del estrógeno. Los estudios epidemiológicos y los estudios de intervención de las isoflavonas de soja que se han realizado con anterioridad sugieren que sus efectos preventivos se deben a sus acciones anti-estrógenos en el cáncer de mama, el cáncer de próstata y otros cánceres hormonodependientes y mejoran los efectos debidos a acciones similares a las del estrógeno en trastornos menopáusicos, postmenopáusicos, osteoporosis e hiperlipidemia.

Recientemente, se ha señalado que el principio activo de los efectos fisiológicos de estas isoflavonas de soja puede ser un metabolito de la daidzeína, el equol. Más específicamente, se ha descrito que el equol tiene capacidad de unirse a los RE (especialmente al RE β) más que a las isoflavonas de soja y que presenta una considerablemente elevada capacidad de transición hacia órganos diana como tejidos de mama y próstata. Además, un estudio caso-control informa que existen significativamente menos pacientes que producen equol en los pacientes con cáncer de mama y cáncer de próstata. Los efectos de las isoflavonas de soja para mejorar la densidad ósea y el metabolismo de los lípidos se examinaron sobre mujeres postmenopáusicas clasificadas en dos grupos: las que producían equol y las que no lo producían. Se observó una mejora significativa en las pacientes que producían equol.

El equol se produce por el metabolismo de la daidzeína por una bacteria entérica. Las capacidades para producir equol varían según los individuos y se ha informado que el porcentaje de japonesas que dan como resultado la generación de equol es de aproximadamente un 50%. Es decir, aproximadamente un 50% de las japonesas no pueden producir equol (individuos que no producen equol). Este tipo de individuos no pueden disfrutar de los útiles beneficios fisiológicos basados en la acción del equol incluso si ingieren semillas de soja y alimentos de soja procesados. Por consiguiente, para obtener los útiles beneficios fisiológicos basados en la acción del equol en un individuo que no produce equol, se piensa que la ingesta de equol será eficaz.

Un procedimiento conocido de producción del equol es someter una materia prima que contiene compuestos de daidzeína a un tratamiento de fermentación por microorganismos (en lo sucesivo denominados bacterias productoras de equol) que metabolizan la daidzeína para producir equol. Conocidos materiales de partida que contienen daidzeína para su uso en este procedimiento de producción incluyen semillas de soja, GeGen Tang (remedio tradicional chino, también conocido como Kakkonto), uvas Globo Rojo, alfalfa u otros. Además, las bacterias productoras de equol son ya conocidas. Por ejemplo, los autores de la presente invención han aislado bacteroides E-23-15 (FERM BP-6435), estreptococos E-23-17 (FERM BP-6436), estreptococos A6G225 (FERM BP-6437) y lactococos 20-92 (FERM BP-10036) a partir de heces humanas (véanse los documentos de patente 1 y 2).

Sin embargo, simplemente sometiendo los materiales de partida indicados anteriormente que contienen compuestos de daidzeína a un tratamiento de fermentación utilizando bacterias productoras de equol no pueden producir una cantidad suficiente de equol en el producto fermentado, y ha existido el problema de que los útiles beneficios deseados basados en la acción del equol no son los suficientemente esperados de la ingesta del producto fermentado tal cual es.

Por el contrario, se ha sabido que las partes de hipocótilo de semillas de soja contienen isoflavonas, saponinas y otros útiles componentes en una proporción más elevada que en las partes del cotiledón que se utilizan como alimentos de soja procesados, y se han desarrollado varios usos para su extracto (p. ej., el documento de patente 3). Sin embargo, el extracto de hipocótilo de soja de por sí es por desgracia caro. Además, cuando el extracto del hipocótilo de soja se usa como material de partida para producir equol, es necesario añadir otros nutrientes para permitir la fermentación por la bacteria productora de equol, lo que puede representar otro problema. Por estas razones, el extracto del hipocótilo de soja no se puede usar en la actualidad como material de partida para una producción industrial de equol.

Por otra parte, dado que el hipocótilo de soja de por sí presenta características de amargor, existe una tendencia de evitar el uso de la propia sustancia tal cual es y actualmente gran parte del hipocótilo de la soja se desecha. Además, de la misma forma que las partes del cotiledón, los hipocótilos de soja contienen alérgenos, por consiguiente, el hipocótilo de soja no se pueden ingerir por, ni se pueden administrar a, personas que padecen alergia a la soja. Por consiguiente, para usar eficazmente el hipocótilo de soja por sí mismo, es importante aportar valores añadidos para incrementar su utilidad.

55 Documento de patente 1. Publicación internacional WO99/007392.

Documento de patente 2. Publicación internacional WO2005/000042.

Documento de patente 3. Publicación de patente japonesa sin examinar No. 2002-234844.

5 Nam Ju Kim y col., Food Sci. Biotechnol. Vol. 12(2), 2003, pág. 178-179 investigan el efecto de complementos dietéticos de hipocótilos de soja fermentados con Bifidobacterium (BFSH) en la composición de bacterias del intestino grueso de las personas ancianas. El examen de la composición de las bacterias intestinales reveló que la administración de BFSH dio como resultado un notable aumento de Bifidobacterium y una disminución de Bacteroides sin afectar de forma significativa a la frecuencia de deposición de heces, el pH y el contenido de agua de las muestras fecales.

10 El documento WO 2004/009035 divulga una composición que comprende S-equol y R-equol o sus mezclas. La composición se puede utilizar para complementos alimenticios, productos farmacéuticos y medicamentos. La composición que contiene S-equol puede realizarse cultivando una primera composición que comprende una isoflavona que puede ser transformada en S-equol con un organismo seleccionado del grupo que consiste en Enterococcus faecalis, una cepa de Lactobacillus plantarum, Listeria welshimeri, un cultivo mixto de organismos aislados del tracto intestinal de un mamífero conocido por ser "productor de equol", Bacteroides fragilis, Bifidobacterium lactis, Eubacteria limosum, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilous, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus paracasei, Listeria monocytogenes, Micrococcus luteus, Propionobacterium freudenreichii, Sacharomyces boulardii, Lactococcus lactis, Enterococcus faecium y Lactobacillus salivarius y sus mezclas, incubando la composición cultivada y opcionalmente inactivando el organismo.

Descripción de la invención

20 Problemas a resolver por la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar un material fermentado de hipocótilos de soja que contiene equol y ornitina que es útil para productos alimenticios, preparados farmacéuticos, productos cosméticos, etc. En otro aspecto, el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención puede obtenerse a partir de material fermentado de hipocótilos de soja según el objetivo anterior, que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende la etapa de añadir arginina a hipocótilos de soja y después llevar a cabo una fermentación utilizando al menos un *Lactococcus garvieae* que tiene capacidad para producir ornitina y capacidad para producir equol utilizando al menos un compuesto de daidzeína seleccionado del grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína.

Medios para solucionar el problema

30 Los autores de la presente invención llevaron a cabo una exhaustiva investigación para conseguir los objetivos anteriores y descubrieron que el material fermentado de hipocótilos de soja que contiene equol y ornitina se puede obtener muy eficazmente mediante la fermentación de hipocótilos de soja utilizando al menos un *Lactococcus garvieae* que presenta la capacidad para producir un equol y ornitina utilizando al menos un compuesto de daidzeína. Los autores de la presente invención han descubierto también que el material fermentado de hipocótilos de soja que contiene equol y ornitina obtenido de este modo es útil como material menos alérgeno, ya que los alérgenos contenidos en el hipocótilo de soja se reducen. La presente invención se ha conseguido basándose en estos descubrimientos.

En otras palabras, la presente invención proporciona materiales fermentados de hipocótilo de soja que contienen equol y ornitina y sus usos como se indica a continuación:

40 Producto 1: Un material fermentado de hipocótilos de soja que contiene equol y ornitina.

Producto 2: El material fermentado de hipocótilos de soja que contiene equol y ornitina según el Producto 1, que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende la etapa de añadir arginina a hipocótilos de soja y realizar después una fermentación utilizando al menos un *Lactococcus garvieae* que tiene capacidad para producir ornitina y capacidad para producir equol utilizando al menos un compuesto de daidzeína seleccionado del grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína.

Producto 3: Un alimento que contiene el material fermentado de hipocótilos de soja según los Productos 1-2.

Efectos de la invención

50 El material fermentado de hipocótilos de soja de la invención contiene equol y ornitina y otros ingredientes activos, como isoflavonas y saponinas y, por consiguiente, puede encontrar una variedad de aplicaciones en los sectores de la alimentación, de los productos farmacéuticos, cosméticos y otros. El material fermentado de hipocótilos de soja de la invención presenta, en particular, un contenido significativamente mayor de equol que los materiales obtenidos fermentando un material de partida que contiene compuestos de daidzeína como la soja, Ge Gen Tang (remedio tradicional chino, también conocido como Kakkonto), uvas Globo Rojo, alfalfa y similares, y pueden de ese modo alcanzar efectos fisiológicos activos derivados del equol muy superiores.

Además, debido a que en el material fermentado de hipocótilos de soja obtenido de este modo se reduce la cantidad de alérgenos intrínsecamente contenidos en los hipocótilos de la semilla de soja, pueden, de forma segura, ser ingeridos por, o administrarse a, personas que presentan alergia a la soja. Es más, el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención se produce a partir de hipocótilos de soja que se descartan durante el procesamiento de alimentos de soja y, por consiguiente, tiene un potencial industrial elevado en términos de uso eficaz de los recursos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las concentraciones de equol de los líquidos fermentados obtenidos en los Ejemplos 1 a 3.

La Fig. 2 muestra los resultados de la detección de las proteínas totales contenidas en el material fermentado de hipocótilos de soja del Ejemplo 1, cotiledones de soja e hipocótilos de soja (electroforetograma).

La Fig. 3 muestra los resultados de la detección de alérgenos importantes (Gym4, Gm30K y Gm28K) contenidos en el material fermentado de hipocótilos de soja del Ejemplo 1, cotiledones de soja e hipocótilos de soja (electroforetograma).

La Fig. 4 muestra los resultados de la detección de los principales alérgenos (mezcla de globulina 7S, oleosina e inhibidor de tripsina) contenidos en el material fermentado de hipocótilos de soja del Ejemplo 1, cotiledones de soja y hipocótilos de soja (electroforetograma).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación, se describen detalladamente las realizaciones de la presente invención.

Lactococcus garvieae que presenta capacidad para producir ornitina y capacidad para producir equol (actividad metabólica) utilizando al menos un compuesto de daidzeína seleccionado del grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína se usan como una bacteria productora de equol y ornitina en el procedimiento según la presente invención. Los ejemplos específicos de glucósidos de daidzeína incluyen daidzina, malonidaidzina, acetildaizina, etc.

Dichos microorganismos (bacterias productoras de equol y ornitina) no se limitan particularmente siempre y cuando tengan capacidad para producir equol y ornitina y sean aceptables para alimentación, productos farmacéuticos o cosméticos. Se ha demostrado que los microorganismos que tienen la capacidad indicada anteriormente incluyen, por ejemplo, bacterias del género *Lactococcus*, como *Lactococcus garvieae*. Las bacterias que tienen la capacidad para producir equol y ornitina se pueden aislar a partir de heces humanas utilizando la presencia o ausencia de producción de equol y ornitina como un indicador. Las bacterias productoras de equol y ornitina aisladas a partir de heces humanas e identificadas por los autores de la presente invención, así como otras, es decir, *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036) están depositadas. Estas bacterias depositadas se pueden usar en la presente invención. Entre estas, la *Lactococcus* 20-92 es la preferida.

En la presente invención, los hipocótilos de soja se usan como material de fermentación. Los hipocótilos de soja son partes que se transforman en plúmulas y radículas cuando las semillas de soja germinan y se sabe que contienen grandes cantidades de compuestos de daidzeína como glucósidos de daidzeína, daidzeína, etc. Los hipocótilos de soja para su uso en la presente invención no están limitados por el origen, y pueden ser procesados o no procesados siempre y cuando los contenidos del compuesto de daidzeína no se pierdan. Los ejemplos utilizables incluyen hipocótilos crudos de soja; hipocótilos separados con calor, desecados, vaporizados o semillas de soja tratadas de otra forma; materiales obtenidos por calentamiento, desecación, vaporización o tratando de otro modo los hipocótilos separados de las semillas de soja no procesadas. Los hipocótilos de soja que se han sometido a la extracción de grasas y/o proteínas son también utilizables en la presente invención. La forma de los hipocótilos de soja para su uso en la presente invención tampoco se limita, y pueden estar pulverizados, molidos o triturados. Desde el punto de vista de una producción eficaz de equol, es preferible usar hipocótilos de soja pulverizados.

Estos hipocótilos de soja son fermentados añadiendo una cantidad adecuada de agua a los hipocótilos de soja para ajustar el contenido de agua e inocular al menos *Lactococcus garvieae* que tiene capacidad para producir ornitina y capacidad para producir equol tal como se ha mencionado anteriormente.

La cantidad de agua añadida a los hipocótilos de soja se puede seleccionar adecuadamente según el tipo de *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina, el tipo de tanque de fermentación, etc. Normalmente, es conveniente que, al inicio de la fermentación, haya presencia de agua junto con los hipocótilos de soja en una proporción de 400 a 4.000 partes en peso, preferiblemente de 500 a 2.000 partes en peso y más preferiblemente de 600 a 1.000 partes en peso, por 100 partes en peso de hipocótilos de soja (basado en peso seco).

Para mejorar la eficacia de la fermentación, el aroma y el sabor del producto fermentado, etc., se pueden añadir ingredientes nutricionales, los necesarios, a los hipocótilos de soja utilizados como material de fermentación. Los ejemplos de ingredientes nutricionales utilizables incluyen extractos de levadura, polipeptonas, extractos de carne y otras fuentes de nitrógeno; glucosa, sacarosa y otras fuentes de carbono; fosfato, carbonato, sulfato y otras sales

- minerales; vitaminas; aminoácidos; etc. Cuando se utiliza un *Lactococcus garvieae* que tiene la capacidad de transformar arginina en ornitina (en lo sucesivo denominada “microorganismo productor de ornitina/equol”) como un microorganismo productor de equol y ornitina, es posible obtener un material fermentado que contiene ornitina añadiendo arginina a los hipocótilos de soja y realizar después la fermentación. La cantidad añadida de arginina puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 partes en peso por 100 partes en peso de hipocótilos de soja (basado en peso seco). Los microorganismos productores de equol y ornitina que tienen la capacidad de transformar arginina en ornitina se pueden seleccionar de cepas de *Lactococcus garvieae* y ejemplos específicos incluyen *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036).
- El pH del material de fermentación (material de partida que se somete a la fermentación) no está limitado siempre y cuando las bacterias productoras de equol y ornitina sean viables. Desde el punto de vista de una buena proliferación del *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina, es deseable ajustar el pH del material de fermentación de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 y preferiblemente de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,8.
- Las isoflavonas (incluyendo los compuestos de daidzeína como los mencionados anteriormente) se pueden añadir al material de fermentación. La adición de isoflavonas al material de fermentación hace posible aumentar el contenido de equol del material fermentado de hipocótilos de soja resultante, mejorando la utilidad del material hipocótilo de soja fermentada.
- La fermentación de hipocótilos de soja se realiza en condiciones ambientales que son adecuadas para las características de crecimiento del *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina utilizado. Por ejemplo, cuando se usa el *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina específicamente indicado anteriormente, la fermentación (cultivo) se realiza en condiciones anaerobias.
- La temperatura de fermentación no se limita siempre y cuando sea adecuada para el crecimiento del *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina y puede ser, por ejemplo, de 20 a 40°C, preferiblemente de 35 a 40°C y más preferiblemente de 36 a 38°C.
- El tiempo de fermentación se puede seleccionar adecuadamente según la cantidad de equol y ornitina producidos, la cantidad residual de compuestos de daidzeína, el tipo de *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina, etc., y habitualmente es de 1 a 10 días, preferiblemente de 2 a 7 días y más preferiblemente de 3 a 5 días.
- Equol y ornitina se producen y acumulan en el material fermentado de hipocótilos de soja producido mediante un tratamiento de fermentación en las condiciones mencionadas anteriormente, y de este modo el material fermentado de hipocótilos de soja puede mostrar la actividad fisiológica útil de equol y ornitina. El contenido de equol y ornitina de dicho material fermentado de hipocótilos de soja varía dependiendo del *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina utilizado, las condiciones de fermentación, etc.; y el equol está contenido normalmente en una cantidad de 0,1 a 1 g, preferiblemente de 0,2 a 1 g y más preferiblemente de 0,5 a 0,8 g por 100 g, basado en peso seco, de material fermentado de hipocótilos de soja.
- El material fermentado de hipocótilos de soja contiene varias isoflavonas diferentes del equol, como daidzina, malonildaidzina, acetilmalonildaidzina, daidzeína, dihidrodaidzeína y otros compuestos de daidzeína (estos componentes se pueden denominar “compuestos de daidzeína”); genistina, malonilgenistina, acetilgenistina, genisteína, dihidrogenisteína y otros compuestos de genisteína (estos componentes se pueden denominar “compuestos de genisteína”); glicitina, malonilglicitina, acetilglicitina, gliciteína, dihidrogliciteína y otros compuestos de gliciteína (estos componentes se pueden denominar “compuestos de gliciteína”); etc. Por ello, el material fermentado también presenta útiles actividades fisiológicas de dichas isoflavonas. El contenido de isoflavonas (incluyendo equol) del material fermentado de hipocótilos de soja puede estar, por ejemplo, basado en peso seco, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 g, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 g y más preferiblemente de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 g, por 100 g del material fermentado de hipocótilos de soja.
- Las proporciones de isoflavonas diferentes de equol en el material fermentado de hipocótilos de soja son diferentes de las de los hipocótilos de soja sin fermentar. En particular, en el material fermentado de hipocótilos de soja, el contenido total de compuestos de genisteína, cuyas actividades como disruptores endocrinos genera preocupación, es tan bajo como un 14% en peso o menos, y preferiblemente un 12% en peso o menos. Por consiguiente, el material fermentado de hipocótilos de soja es también más ventajoso que los hipocótilos de soja sin fermentar desde el punto de vista de las proporciones de isoflavonas.
- Los ejemplos específicos de proporciones de isoflavonas en el material fermentado de hipocótilos de soja incluyen los siguientes, en los que “mg” indica el contenido total de cada isoflavona por 1 g de material fermentado de hipocótilos de soja basado en peso seco. Equol: de 1 a 20 mg y preferiblemente de 2 a 10 mg;
- Compuestos de daidzeína: de 0,1 a 3 mg y preferiblemente de 0,1 a 1,5 mg; compuestos de Genisteína: de 0,05 a 2,5 mg y preferiblemente de 0,05 a 2 mg; compuestos de Gliciteína: de 0,1 a 4 mg y preferiblemente de 2 a 3,5 mg.

Las proporciones de estas isoflavonas contenidas en el material fermentado de hipocótilos de soja son, por ejemplo, como se indica a continuación, en los que “% en peso” indica el porcentaje en relación con la cantidad total de isoflavonas contenida en el material fermentado de hipocótilos de soja.

Equol: de 30 a 75% en peso, preferiblemente de 40 a 70% en peso y más preferiblemente de 45 a 65% en peso;

- 5 Compuestos de daidzeína: de 1 a 20% en peso, preferiblemente de 2 a 15% en peso y más preferiblemente de 4 a 8% en peso;

Compuestos de genisteína: de 0,1 a 20% en peso, preferiblemente de 1 a 15% en peso y más preferiblemente de 1 a 10% en peso;

- 10 Compuestos de gliciteína: de 10 a 50% en peso, preferiblemente de 15 a 35% en peso y más preferiblemente de 25 a 30% en peso.

El material fermentado de hipocótilos de soja de la presente invención contiene isoflavonas en unas proporciones que no se pueden conseguir mediante procedimientos conocidos. Por consiguiente, el material fermentado de hipocótilos de soja de la presente invención se puede denominar como material que contiene isoflavonas que comprende isoflavonas en las proporciones anteriores.

- 15 Para producir un material fermentado de hipocótilos de soja que tenga proporciones de isoflavonas como las anteriores se puede usar, de forma particularmente ventajosa, *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036).

- 20 Además, dado que el material fermentado de hipocótilos de soja también contiene saponinas derivadas de los hipocótilos de soja, también es posible conseguir útil actividad fisiológica basada en dichas saponinas (por ejemplo, actividad antivírica). El contenido de saponina del material fermentado de hipocótilos de soja es habitualmente de 1 a 8 g, preferiblemente de 2 a 5 g y más preferiblemente de 3 a 4 g, por 100 g, basado en peso seco, del material fermentado de hipocótilos de soja.

- 25 Además, tal como se ha indicado anteriormente, la ornitina está contenida en el material fermentado de hipocótilos de soja obtenido añadiendo arginina a los hipocótilos de soja y realizando la fermentación utilizando *Lactococcus garvieae* productor de ornitina/euol. Específicamente, la ornitina puede estar contenida en dicho material fermentado de hipocótilos de soja en una cantidad, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,0 g, preferiblemente de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 g y más preferiblemente de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,2 g por 100 g, basado en peso seco, del material fermentado de hipocótilos de soja.

- 30 El material fermentado de hipocótilos de soja obtenidos mediante fermentación en las condiciones descritas anteriormente puede estar en su estado de post-fermentación sin tratamiento adicional, o se puede secar lo necesario para formar un producto sólido seco, para su uso como ingrediente para alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, etc. Para mejorar su estabilidad en almacenamiento, el material fermentado de hipocótilos de soja, es preferiblemente desecado a la forma sólida. El material fermentado de hipocótilos de soja calentado y desecado se puede ser pulverizado cuanto se necesite.

- 35 Tal como se ha descrito anteriormente, debido a que el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención contiene una variedad de sustancias eficaces fisiológicamente activas como euol y ornitina, expresa una variedad de actividades fisiológicas y farmacológicas. Por ejemplo, el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención es útil para la prevención o reducción de síntomas o enfermedades como, por ejemplo, trastornos menopáusicos, osteoporosis, hipertrofia prostática, síndrome metabólico y para disminuir el nivel de colesterol en sangre, blanqueamiento de la piel, tratamiento del acné, tratamientos de trastornos intestinales, obesidad, trastornos urinarios, etc. Entre estos usos, el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención es especialmente útil para la prevención o reducción quejas por malestar general y síntomas menopáusicos (por ejemplo, osteoporosis, trastornos menopáusicos, etc.) en mujeres de mediana edad. El material fermentado de hipocótilos de soja producido por fermentación del material de fermentación que contiene arginina utilizando *Lactococcus garvieae* productor de euol/ornitina también se forma y almacena en dicho lugar. Este material fermentado de hipocótilos de soja también puede presentar efectos fisiológicos activos derivados de ornitina, como una función hepática mejorada, una secreción mejorada de la hormona del crecimiento, aumento de la inmunoestimulación, aumento de la cantidad de músculos, aumento del metabolismo basal, etc.

- 50 Cuando el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención se usa como ingrediente alimentario, se puede preparar en forma de, por ejemplo, una bebida, gránulos, granos finos, cápsulas, comprimidos, polvos, producto lácteo, goma de mascar, gominolas, pudín, barritas u otros alimentos sólidos. Un alimento que contiene el material fermentado de hipocótilos de soja no sólo presenta las actividades fisiológicas derivadas de euol y ornitina, sino también actividades fisiológicas derivadas de isoflavonas, saponinas y otros materiales similares. Estos alimentos, por consiguiente, proporcionan unos excelentes efectos para mantener una buena salud y son muy útiles. El material fermentado de hipocótilos de soja producido por fermentación de un material de fermentación que contiene arginina utilizando *Lactococcus garvieae* productor de ornitina/euol se usa en un alimento y este alimento también contiene ornitina y, por consiguiente, tiene una mayor utilidad.

Los alimentos que contienen el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención son utilizables no sólo como alimentos, en general, sino también como alimentos para usos específicamente saludables, complementos dietéticos, alimentos funcionales, alimentos para inválidos, etc. Los alimentos que contienen el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención se utilizan particularmente como complementos dietéticos.

5 La proporción de material fermentado de hipocótilos de soja de la invención en un alimento se puede determinar de forma adecuada según tipo de alimento, contenido de equol y ornitina, edad y sexo del sujeto, resultados esperados y otros factores. Por ejemplo, la cantidad total de material fermentado de hipocótilos de soja por 100 g de un alimento puede ser normalmente de 0,1 a 90 g, preferiblemente de 0,1 a 10 g y más preferiblemente de 0,5 a 2 g basado en peso seco.

10 La dosis diaria de un alimento que contiene el material fermentado de hipocótilos de soja depende del contenido de equol y ornitina del material fermentado de hipocótilos de soja, de la edad y peso del sujeto, número de dosis diarias y otros factores; pero, por ejemplo, un adulto puede tomar una dosis diaria de 0,1 a 10 g de material fermentado de hipocótilos de soja.

15 Cuando el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención se usa como un ingrediente farmacéutico, el material fermentado de hipocótilos de soja se prepara en forma de, por ejemplo, comprimidos, píldoras, polvos, un medicamento líquido, una suspensión, una emulsión, gránulos, cápsulas, un supositorio o similares. Un preparado farmacéutico que contiene el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención es útil para la prevención o alivio de síntomas o enfermedades, por ejemplo, dolencias menopáusicas (incluyendo malestares menopáusicos, osteoporosis e hiperlipidemia), osteoporosis, hipertrofia prostática, síndrome metabólico, y para la reducción del nivel de colesterol en sangre, tratamiento de trastornos intestinales, obesidad, trastornos urinarios, etc. Este preparado farmacéutico es especialmente adecuado para su uso en la prevención o tratamiento de las quejas por malestar general y síntomas menopáusicos (por ejemplo, osteoporosis, trastornos menopáusicos, etc.) en mujeres de mediana edad.

20 La dosis de un preparado farmacéutico que contiene el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención depende del contenido de equol y ornitina del material fermentado de hipocótilos de soja, de la edad y del peso corporal del sujeto, síntomas, número de dosis diaria y otros factores; pero, por ejemplo, un adulto puede tomar una dosis diaria de 0,5 a 6 g del material fermentado de hipocótilos de soja, basada en peso seco.

25 Cuando el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención se usa como un ingrediente cosmético, el material fermentado de hipocótilos de soja se puede preparar de cualquier forma deseada, como, por ejemplo, a modo de pasta, mousse, gel, líquido, emulsión, suspensión, crema, pomada, lámina o formas similares. Estos productos cosméticos se pueden usar de muchas maneras: por ejemplo, productos básicos para el cuidado de la piel como emulsiones, cremas, lociones, aceites y compresas; productos limpiadores como lavados faciales, limpiadores faciales y limpiadores corporales; toallitas de limpieza; agentes purificantes; etc. Los productos cosméticos que contienen el material fermentado de hipocótilos de soja de la invención se usan para el blanqueamiento de la piel y la limpieza del acné.

30 La proporción del material fermentado de hipocótilos de soja de la invención en un producto cosmético se puede determinar de forma adecuada según el tipo de producto cosmético, el contenido de equol y ornitina, y similares. Por ejemplo, la cantidad total del material fermentado de hipocótilos de soja por 100 g de alimento puede ser de 0,1 a 10 g y preferiblemente de 0,5 a 5 g, basada en peso seco.

40 Ejemplos

La presente invención se describe en detalle haciendo referencia a los Ejemplos de Prueba, Ejemplos, etc. siguientes:

Ejemplos 1 a 3

45 Hipocótilos de soja pulverizados, arginina y agua se mezclaron de tal manera que las composiciones de la mezcla fueron como se muestra en la Tabla 1 para preparar soluciones de hipocótilos de soja. En muestras de 5 ml de solución de hipocótilo de soja se inocularon *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036; *Lactococcus garvieae*) y se sometieron a un cultivo estático a 37°C durante 96 horas en condiciones anaerobias. Después del cultivo, el cultivo resultante (líquidos fermentados) se esterilizó por calentamiento a 100 °C durante un minuto y posteriormente se secaron a 80 °C, y se pulverizaron adicionalmente utilizando un homogeneizador, obteniéndose de este modo materiales fermentados de hipocótilos de soja pulverizados.

50 La Tabla 1 muestra las concentraciones de equol en los cultivos 96 horas después de la plantación. La Tabla 1 muestra también el recuento de bacterias viables y el pH de los medios de cultivo 96 horas después del cultivo, los rendimientos de materiales fermentados de hipocótilos de soja pulverizados, y las concentraciones de equol en 10 materiales fermentados de hipocótilos de soja pulverizados. Los resultados probaron que la fermentación de los hipocótilos de soja pulverizados utilizando *Lactococcus garvieae* productores de equol y ornitina pueden producir equol y ornitina muy eficientemente.

Tabla 1

		Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3
Composición de solución de hipocótilo de soja	Hipocótilos de soja pulverizados (peso desecado)	0,25 g	0,5 g	0,75 g
	Arginina	0,005 g	0,005	0,005 g
	Agua	Cantidad adecuada	Cantidad adecuada	Cantidad adecuada
	Cantidad total	5 ml	5 ml	5 ml
	pH	6,75 ± 0,03	6,54 ± 0,02	6,39 ± 0,03
Resultados analíticos del líquido fermentado	Recuento de bacterias viables del líquido fermentado (log ufc/ml)	7,9 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,3 ± 0,2
	pH del líquido fermentado	7,00 ± 0,03	6,88 ± 0,01	6,76 ± 0,02
Resultados analíticos de los hipocótilos de soja fermentados pulverizados	Concentración de equol en el material de hipocótilo de soja pulverizado (mg/100 g)	385,6 ± 101,5	344,6 ± 62,1	417,5 ± 68,0

5 Nota: Cada ejemplo se llevó a cabo utilizando hipocótilos de soja pulverizados de tres lotes diferentes (N =3). Los resultados analíticos en la tabla son promedios ± SD (desviación estándar).

Ejemplo 4

10 Se inoculó *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036; *Lactococcus garvieae*) en 5 ml de una solución de hipocótilo de soja que contenía 10% en peso de hipocótilos de soja pulverizados y 0,1% en peso de L-arginina, y se sometió a un cultivo estático a 37°C durante 96 horas en condiciones anaerobias. Después del cultivo, el cultivo resultante (líquido fermentado) se esterilizó por calentamiento a 100 °C durante un minuto, después se secó a 80 °C y se pulverizó adicionalmente utilizando un homogeneizador, obteniéndose de este modo un material fermentado de hipocótilos de soja pulverizado.

15 Los hipocótilos de soja pulverizados utilizados como materiales de partida (referenciados como “pre-fermentación” en las Tablas 2 y 3) y el material fermentado de hipocótilos de soja pulverizados (referenciado como “post-fermentación en las Tabla 2 y 3) se analizaron en cuanto a los componentes de la composición. La Tabla 2 muestra los resultados analíticos de las isoflavonas de soja, y la Tabla 3 muestra los resultados analíticos de los componentes nutricionales. Estos resultados también establecieron que los materiales de hipocótilos de soja fermentados que contienen altos niveles de equol y ornitina pueden ser producidos fermentando hipocótilos de soja con *Lactococcus garvieae* productor de equol y ornitina. Los resultados mostraron además que los contenidos de oligosacáridos como rafinosa, estaquiosa y similares después de la fermentación permanecen casi iguales que antes, lo que indica que son escasamente influenciados por la fermentación. Sin embargo, se descubrió que la arginina se transforma en ornitina por fermentación. Por consiguiente, se estableció que cuando los hipocótilos de soja con arginina se fermentan con *Lactococcus* 20-92, no sólo se puede producir equol sino también ornitina.

Tabla 2

Isoflavonas de soja

Por 100 g

Componente	Pre-fermentación	Post-fermentación
Equol	N.D.	632,0 mg

ES 2 672 871 T3

Isoflavonas de soja		Por 100 g	
Componente	Pre-fermentación	Post-fermentación	
Daidzina	566,4 mg	29,7 mg	
Malonildaidzina	124,9 mg	N.D.	
Acetildaidzina	364,8 mg	25,4 mg	
Daidzeína	7,1 mg	24,4 mg	
Dihidrodaidzeína	N.D.	49,4 mg	
Genistina	111,7 mg	3,2 mg	
Malonilgenistina	35,1 mg	N.D.	
Acetilgenistina	146,1 mg	3,7 mg	
Genisteína	0,9 mg	22,5 mg	
Dihidrogenisteína	N.D.	112,0 mg	
Glicitina	331,7 mg	53,6 mg	
Malonilglicitina	65,0 mg	N.D.	
Acetilglicitina	169,2 mg	34,8 mg	
Gliciteína	19,1 mg	292,3 mg	
Dihidrogliciteína	N.D.	8,2 mg	
Isoflavonas totales	1.942,0 mg	1.291,2 mg	

N.D. se refiere a "No Detectado"

Tabla 3

Componente nutricional		Por 100 g	
Componente	Pre-fermentación	Post-fermentación	
Humedad	3,2 g	6,2 g	
Proteína	38,1 g	38,3 g	
Grasa	13,0 g	14,5 g	
Cenizas	4,3 g	4,0 g	
Sacárido	30,9 g	26,8 g	
Fibra dietética	10,0 g	10,2 g	
Energía	414 kcal	411 kcal	

ES 2 672 871 T3

Componente nutricional	Por 100 g	
Componente	Pre-fermentación	Post-fermentación
Sacarosa	7,95 g	7,42 g
Rafinosa	1,37 g	1,34 g
Estaquiosa	9,04 g	8,38 g
Ácidos grasos Trans-	N.D.	N.D.
Fosfolípidos (como estear-, ole-, y lecitina)	3,33 g	2,92 g
Arginina libre	881 mg	12 mg
Ornitina libre	N.D.	1,06 g
Soyasapogenol A	N.D.	N.D.
Soyasapogenol B	N.D.	N.D.
Saponina de soja	3,6 g	3,8 g

N.D. se refiere a "No Detectado"

Ejemplos 5-11

5 Se produjeron hipocótilos de soja fermentados pulverizados (Ejemplos 5-11) en las mismas condiciones del Ejemplo 3, excepto que se usaron hipocótilos de soja pulverizados de siete lotes diferentes de los del Ejemplo 3. Se evaluaron las proporciones de isoflavonas contenidas en los materiales fermentados de hipocótilos de soja así obtenidos. Tal como queda claro de los resultados mostrados en la Tabla 4, los materiales fermentados de hipocótilos de soja de los Ejemplos 5-11 tienen igual contenido de equol y contiene isoflavonas en unas proporciones que no se pueden obtener mediante los procedimientos conocidos.

Tabla 4

	Proporciones de Isoflavonas			
	Equol	Compuestos de Daidzeína	Compuestos de Genisteína	Compuestos de Gliciteína
Ejemplo 5	6,51 mg (62,2 % en peso)	0,71 mg (6,8 % en peso)	0,53 mg (5,1 % en peso)	2,71 mg (25,9 % en peso)
Ejemplo 6	6,25 mg (61,3 % en peso)	0,48 mg (4,7 % en peso)	0,35 mg (3,4 % en peso)	3,12 mg (30,6 % en peso)
Ejemplo 7	5,38 mg (48,9 % en peso)	1,18 mg (10,7 % en peso)	1,45 mg (13,2 % en peso)	3,00 mg (27,2 % en peso)
Ejemplo 8	6,43 mg (63,4 % en peso)	0,61 mg (6,0 % en peso)	0,48 mg (4,7 % en peso)	2,62 mg (25,8 % en peso)
Ejemplo 9	6,05 mg	0,51 mg	0,30 mg	2,57 mg

	Proporciones de Isoflavonas			
	Equol	Compuestos de Daidzeína	Compuestos de Genisteína	Compuestos de Gliciteína
	(64,2 % en peso)	(5,4 % en peso)	(3,2 % en peso)	(27,3 % en peso)
Ejemplo 10	6,11 mg (65,6 % en peso)	0,37 mg (4,0 % en peso)	0,10 mg (1,1 % en peso)	2,74 mg (29,4 % en peso)
Ejemplo 11	6,3 mg (60,9 % en peso)	0,49 mg (4,73 % en peso)	0,37 mg (3,6 % en peso)	3,19 mg (30,8 % en peso)

En la Tabla 4, las cifras superiores indican la cantidad (mg) de cada isoflavona por 1 g de material fermentado de hipocótilos de soja, y las cifras inferiores indican el porcentaje (% en peso) de cada isoflavona respecto al peso total (100% en peso) de isoflavonas contenidas en cada material fermentado de hipocótilos de soja.

5 **Ejemplo 12**

Se produjeron hipocótilos de soja fermentados pulverizados en las mismas condiciones del Ejemplo 3 anterior, excepto que se usaron los hipocótilos de soja pulverizados de un lote diferente del Ejemplo 3 anterior. El material fermentado de hipocótilos de soja contenía 6,5 mg de equol, 0,6 mg de compuestos de daidzeína, 0,6 mg de compuestos de genisteína y 3,2 mg de compuestos de gliciteína, por gramo. La aglicona representó el 90% en peso o más del contenido total de isoflavona en el material fermentado de hipocótilos de soja.

10

Se prepararon comprimidos que tienen la siguiente fórmula (2,51 g de peso y 10,9 mg de contenido de equol por comprimido) utilizando los hipocótilos de soja fermentados obtenidos de este modo.

Material fermentado de hipocótilos de soja 66,7 % en peso

Eritritol 33,2 % en peso

Total 100,0 % en peso

Ejemplo 13

Se prepararon unos gránulos que tienen la siguiente fórmula utilizando el material fermentado de hipocótilos de soja utilizado en el Ejemplo 5 anterior.

15

Material fermentado de hipocótilos de soja 66,7 % en peso

Eritritol 33,2 % en peso

Total 100,0 % en peso

Ejemplo 14

Se preparó un producto cosmético que tiene la siguiente fórmula utilizando el material fermentado de hipocótilos de soja utilizado en el Ejemplo 1 anterior.

Material fermentado de hipocótilos de soja 10 g

Aceite de Parafina 60 ml

Aceite de oliva 40 ml

Éster de glicerol y ácido monoesteárico 50ml

Lanolina	10 ml
Propilenglicol	30 ml
Agua	resto
<hr/>	
Total	1000 g

Ejemplo 15

Se preparó un producto cosmético que presenta la siguiente fórmula utilizando el material fermentado de hipocótilos de soja utilizado en el Ejemplo 1 anterior.

Material fermentado de hipocótilos de soja	10 g
Aceite de Parafina	30 ml
Aceite de oliva	30 ml
Éster de glicerol y ácido monoestearico	60 ml
Lanolina	20 ml
Propilenglicol	40 ml
Agua	resto
<hr/>	
Total	1.000 g

Ejemplo de Prueba 1

- 5 Se sabe que los hipocótilos de soja contienen intrínsecamente Gym4, Gm30K, Gm28K, una mezcla de globulina 7S (β -conglucina), oleosina, inhibidor de tripsina y alérgenos similares. Se detectó la presencia o ausencia de alérgenos en el material fermentado de hipocótilos de soja preparado en el Ejemplo 1 mediante el siguiente procedimiento.
- 10 En primer lugar, se añadió una cantidad adecuada del material fermentado de hipocótilos de soja preparado en el Ejemplo 1 a un tampón de extracción (Tris-HCl pH 7,5, que contiene AEDT 1M y una cantidad adecuada de inhibidor de la proteasa), seguido de agitación suficiente para extraer los componentes solubles en agua del material fermentado de hipocótilos de soja. Posteriormente, la materia sólida se eliminó del mismo por filtración, proporcionando un extracto. La proteína total en el extracto así obtenido se probó utilizando un ensayo de proteínas Bio-Rad. Los alérgenos principales (Gym4, Gm30K, Gm28K, mezcla de globulina 7S, oleosina e inhibidor de tripsina) contenidos en el extracto así obtenido se detectaron después por inmunotransferencia Western. Por
- 15 comparación, las detecciones de proteína total y alérgenos principales se llevaron a cabo de la misma manera descrita anteriormente utilizando pulverizados de cotiledones de soja e hipocótilos de soja en lugar del material fermentado de hipocótilos de soja.
- 20 Las Fig. 2 a 4 muestran los resultados. La Fig. 2 muestra los resultados de la detección de proteínas totales. La Fig. 3 muestra los resultados de las detecciones de Gym4, Gm30K y Gm28K. La Fig. 4 muestra los resultados de las detecciones de la mezcla de globulina 7S, oleosina y el inhibidor de tripsina.
- De estos resultados, se confirmó que los alérgenos principales contenidos intrínsecamente en soja o en los hipocótilos de soja se eliminan en el material fermentado de hipocótilos de soja.

REIVINDICACIONES

1. Un material fermentado de hipocótilos de soja que contiene equol y ornitina.
2. El material fermentado de hipocótilos de soja según la reivindicación 1, que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende la etapa de añadir arginina a los hipocótilos de soja y después realizar la fermentación utilizando al menos *Lactococcus garvieae* que tiene capacidad para producir ornitina y capacidad para producir equol utilizando al menos un compuesto de daidzeína seleccionado del grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína.
3. Un alimento que contiene el material fermentado de hipocótilo de soja según la reivindicación 1-2.

Fig. 1

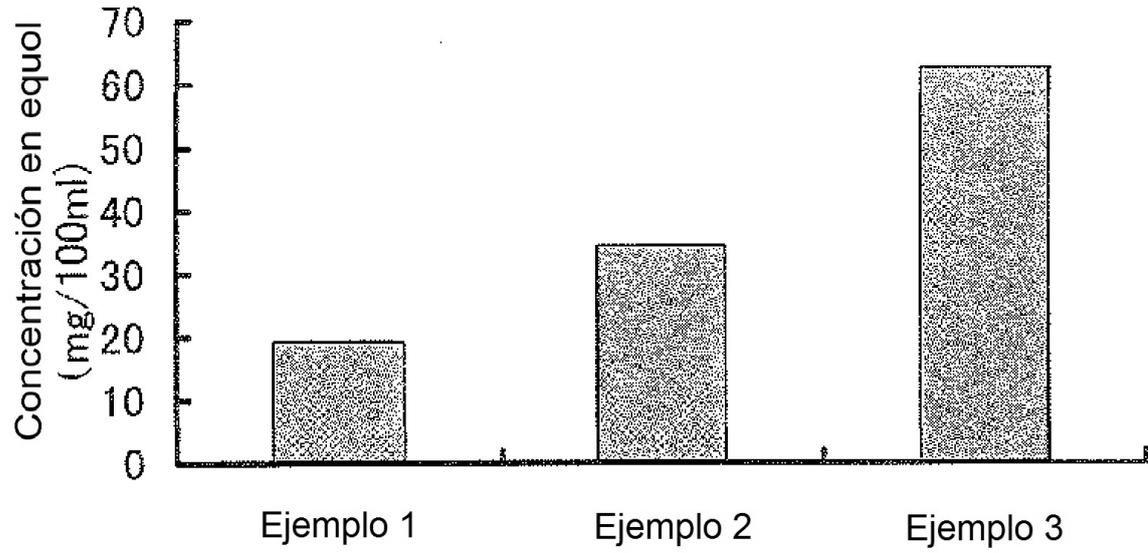


Fig. 2

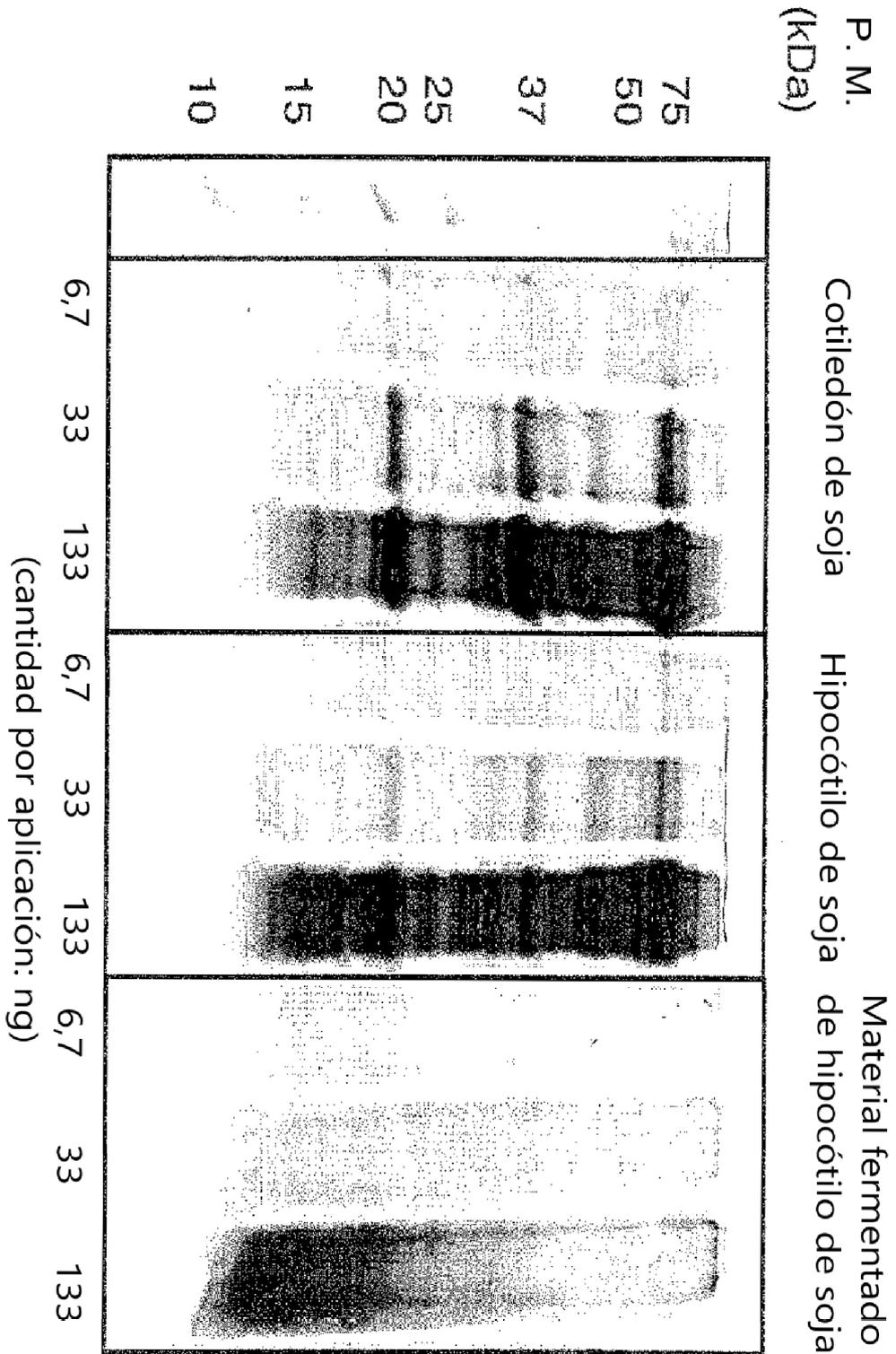


Fig. 3

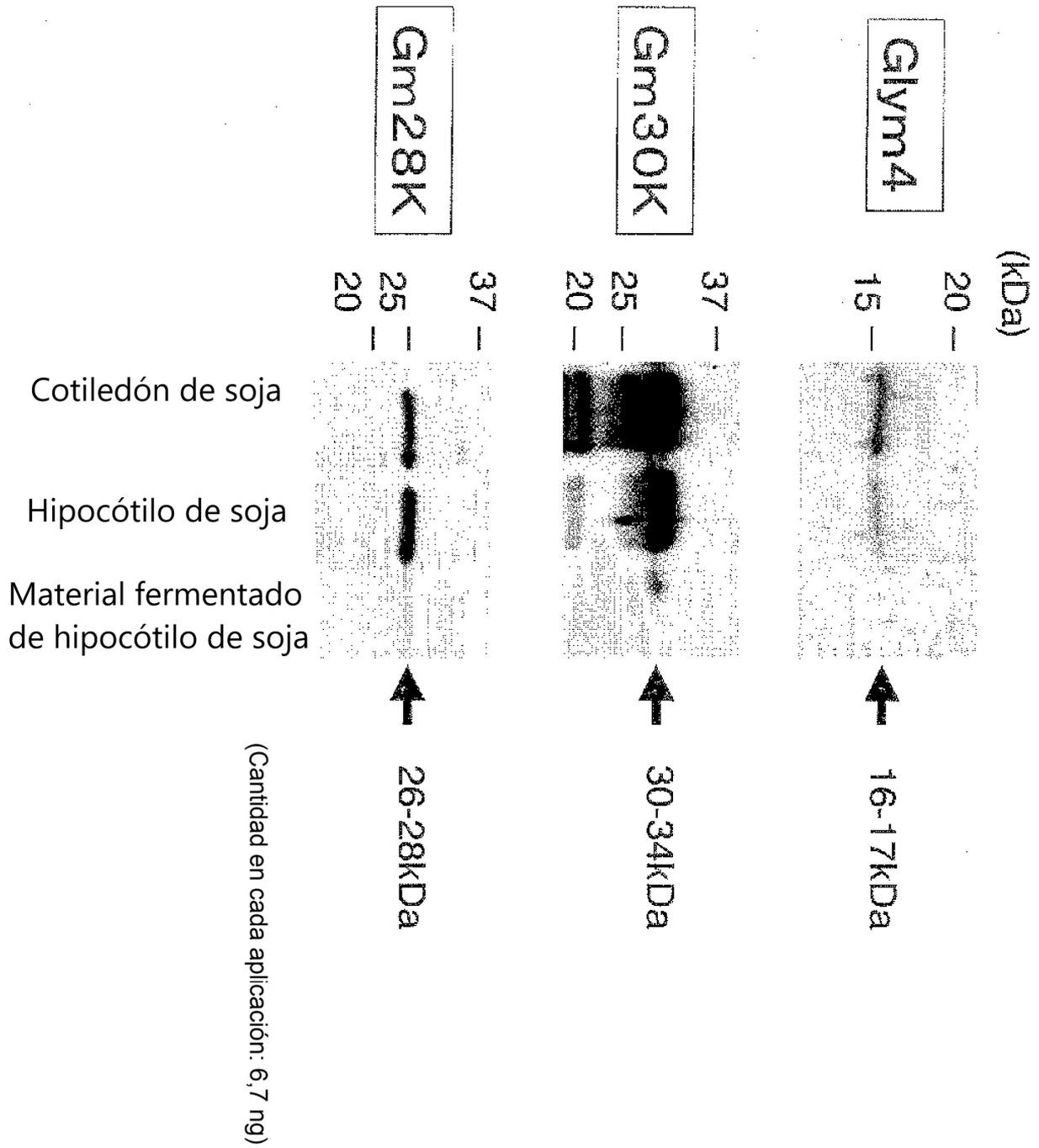


Fig. 4

