

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 889**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/123** (2006.01)  
**A23C 9/13** (2006.01)  
**A23C 11/10** (2006.01)  
**C07D 311/60** (2006.01)  
**C12P 17/06** (2006.01)  
**A23L 29/00** (2006.01)  
**A23L 11/00** (2006.01)  
**A23L 33/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2009 PCT/JP2009/066413**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10032838**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009 E 09814682 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2335500**

54 Título: **Producto de fermentación que contiene un microorganismo que produce ecuol que tiene capacidad de producción de ecuol mantenida, y método para producir el mismo**

30 Prioridad:

**19.09.2008 JP 2008240937**

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

**14.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ISONO, YOSHIKAZU;  
MORI, HISAKO;  
UENO, TOMOMI;  
ENDO, RIEKO;  
KUMEMURA, MEGUMI;  
ABIRU, YASUHIRO y  
UCHIYAMA, SHIGETO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 753 889 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 que contiene un microorganismo que produce ecuol que tiene capacidad de producción de ecuol mantenida, y método para producir el mismo

## [Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición que contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, en la que la capacidad de producción de ecuol del microorganismo puede mantenerse de manera estable, incluso después del almacenamiento.

## [Técnica anterior]

Las isoflavonas contenidas en la soja (por ejemplo, isoflavonas de soja tales como daidzeína, genisteína y gliciteína) tienen estructuras similares al estradiol, y una acción antiestrogénica y una acción similar a la de los estrógenos asociada con la unión a un receptor de estrógenos (denominado a continuación en el presente documento, ER). Los estudios epidemiológicos y los estudios de intervención sobre las isoflavonas de soja realizados hasta la fecha sugieren que las isoflavonas de soja tienen un efecto preventivo, atribuible a la acción antiestrogénica, sobre cánceres dependientes de hormonas tales como el cáncer de mama y el cáncer de próstata; y un efecto de mejora, atribuible a la acción similar a la de los estrógenos, sobre trastornos menopáusicos, osteoporosis posmenopáusica e hiperlipidemia.

Recientemente, se ha informado que el principio activo de los efectos fisiológicos de estas isoflavonas de soja puede ser el ecuol, un metabolito de la daidzeína. Más específicamente, se ha informado que el ecuol tiene una mayor capacidad para unirse al ER (especialmente al ER $\beta$ ) que las isoflavonas de soja, y que tiene una capacidad de transición notablemente alta para seleccionar como diana órganos tales como tejidos de mama y próstata (véanse los documentos no de patente 1-4). Además, un estudio de casos y controles informa que hay significativamente pocos pacientes con cáncer de mama y cáncer de próstata que puedan producir ecuol. Se examinaron los efectos de mejora de la densidad ósea y el metabolismo de lípidos de las isoflavonas de soja en mujeres posmenopáusicas clasificadas en dos grupos: las que podían producir ecuol y las que no. Se observó una mejora significativa en aquellas que podían producir ecuol.

El ecuol se produce por el metabolismo de la daidzeína por bacterias entéricas. La capacidad de producir ecuol varía entre individuos y según informes, el porcentaje de japoneses que pueden producir ecuol es de aproximadamente el 50%. Es decir, aproximadamente el 50% de los japoneses no pueden producir ecuol (no productores de ecuol). Tales individuos no pueden disfrutar de los beneficios fisiológicos útiles proporcionados por la acción del ecuol, aunque ingieran soja y alimentos de soja procesados. Por tanto, con el fin de que un no productor de ecuol logre los beneficios fisiológicos útiles proporcionados por la acción del ecuol, se cree que resulta beneficiosa la ingestión de ecuol en sí mismo.

Ya se conocen microorganismos que producen ecuol; por ejemplo, los presentes inventores han aislado *Bacteroides* E-23-15 (FERM BP-6435), *Streptococcus* E-23-17 (FERM BP-6436), *Streptococcus* A6G225 (FERM BP-6437) y *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036) del interior del intestino humano (véanse los documentos de patente 1 y 2).

Por consiguiente, se cree que si se pudiera proporcionar un producto fermentado que contenga microorganismos que producen ecuol en el estado de células vivas, podría ser posible la ingestión de un microorganismo que produce ecuol, permitiendo que los individuos se beneficien de los efectos útiles de los microorganismos que producen ecuol. Sin embargo, si un producto fermentado se produce usando un microorganismo que produce ecuol según métodos comunes, se pierde de manera problemática la capacidad de producción de ecuol del microorganismo; y por tanto, no puede obtenerse un producto fermentado que contenga microorganismos que producen ecuol en el estado de células vivas. Además, dado que los microorganismos que producen ecuol tienen una fuerte tendencia a perder su capacidad de producción de ecuol debido a condiciones de pH bajo o almacenamiento aerobio, aunque se pudiera producir un producto fermentado a la vez que se mantiene la capacidad de producción de ecuol del microorganismo, en la etapa de distribución se perdería la capacidad de producción de ecuol, al no poder soportar el almacenamiento.

Con la técnica anterior como trasfondo, se desea el desarrollo de un producto fermentado que contenga microorganismos en el estado de células vivas mediante el cual pueda mantenerse la capacidad de producción de ecuol.

## [Documentos anteriores]

## [Documentos de patente]

[Documento de patente1] WO99/007392

[Documento de patente 2] WO2005/000042

El documento JP 2006 296434 A se refiere a una composición que contiene bacterias del ácido láctico y tiene capacidad para producir eculol. La composición que contiene bacterias del ácido láctico para producir eculol comprende, como componente esencial de la misma, una cepa bacteriana del ácido láctico que pertenece al género *Lactococcus* que tiene capacidad para utilizar al menos un compuesto de daidzeína seleccionado del grupo que consiste en glucósidos de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína para producir eculol.

El documento US 2004 235758 A1 se refiere a una composición para su uso en la elaboración de alimentos y productos para la piel comerciales que comprenden S-eculol o mezclas, incluyendo tanto una mezcla no racémica como una mezcla racémica, de S-eculol y R-eculol. El enantiómero S-eculol puede producirse en una síntesis biológica a partir del metabolismo de una isoflavona por un organismo.

El documento EP 1 025 850 A1 se refiere a una composición que comprende un sustrato que contiene daidzeína y una cepa de microorganismos capaces de metabolizar daidzeína para dar eculol como componentes esenciales.

[Documento no de patente 1] Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  y  $\beta$ . Biol Pharm Bull 24(4):351-356, 2001

[Documento no de patente 2] Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, Depypere HT, Serreyn RF, Mareel MM, Keukeleire DD. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. J Chromatography B 784:137-144, 2003

[Documento no de patente 3] Morton MS, Chan PSF, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, Abranches-Monteiro L, Correia R, Lloyd S, Griffiths K. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: Samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. Prostate 32:122-128, 1997

[Documento no de patente 4] Tammy EH, Paul DM, Paul GF, Robert D, Stefen B, Kennet J, Ray M, Lorraine GO, Kristiina W, Holly MS, Karen JG. Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in Caucasian men. J Nutr 135:1400-1406, 2005

## **[Sumario de la invención]**

### **[Problema técnico]**

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un producto fermentado que contiene un microorganismo que produce eculol en el estado de una célula viva mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de eculol. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que contiene microorganismos que producen eculol que contiene un microorganismo que produce eculol en el estado de una célula viva mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de eculol, y que además permita que la capacidad de producción de eculol se mantenga de manera estable incluso después del almacenamiento.

### **[Solución al problema]**

Los presentes inventores llevaron a cabo una intensa investigación para lograr los objetos anteriores y encontraron, sorprendentemente, que es posible obtener, a una escala aplicable industrialmente, un material fermentado que contiene microorganismos que producen eculol en el estado de células vivas mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de eculol, aportando ideas inventivas particulares en la selección de la atmósfera, el pH y similares de la fermentación, según las materias primas usadas en cada etapa, desde la preparación de un iniciador madre hasta la fermentación principal usando un microorganismo que produce eculol. Los presentes inventores también encontraron que añadiendo ácido ascórbico y/o un derivado del mismo a la composición que contiene microorganismos que producen eculol en el estado de células vivas, la capacidad de producción de eculol de los microorganismos que producen eculol podía mantenerse de manera estable, permitiendo que se obtenga una composición que contiene microorganismos que producen eculol con excelente estabilidad en almacenamiento. Específicamente, los presentes inventores encontraron lo siguiente.

(i) Primer método para preparar un material fermentado

Cuando se produce un material fermentado usando un microorganismo que produce eculol con polvo de soja o leche de soja como materia prima, puede prepararse un material fermentado que contiene microorganismos en el estado de células vivas mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de eculol: (1) realizando fermentación en condiciones anaerobias usando un microorganismo que produce eculol en presencia de una especie de daidzeína a pH 5,0 o superior para preparar un iniciador madre; (2) realizando fermentación en condiciones anaerobias usando el iniciador madre anterior en presencia de una especie de daidzeína a pH 5,0 o superior para preparar un iniciador a granel; y (3) realizando fermentación usando el iniciador a granel anterior en un medio que contiene polvo de soja

o leche de soja para preparar un material fermentado.

(ii) Segundo método para preparar un material fermentado

5 Cuando se prepara un material fermentado usando microorganismos que producen ecuol con leche como materia  
 10 prima, puede prepararse un material fermentado que contiene microorganismos en el estado de células vivas  
 mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de ecuol: preparando un iniciador madre realizando  
 fermentación en presencia de una especie de daidzeína en condiciones anaerobias; y, cuando la materia prima de  
 15 leche se fermenta usando el iniciador madre, realizando la fermentación en presencia de una especie de daidzeína  
 en condiciones de pH 4,6 o superior. El material fermentado puede conservar la capacidad de producción de ecuol  
 del microorganismo que produce ecuol a lo largo de un período de tiempo prolongado y muestra estabilidad en  
 almacenamiento excelente. Además, mediante la realización de todas las etapas de fermentación, es decir, desde la  
 preparación del iniciador madre hasta la fermentación de la materia prima de leche, en presencia de un extracto de  
 levadura, puede mejorarse aún más la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol y la  
 estabilidad en almacenamiento.

(iii) Composición que contiene microorganismos que producen ecuol

20 Puede obtenerse una composición mediante la cual no se pierda la capacidad de producción de ecuol del  
 microorganismo que produce ecuol, ni siquiera después del almacenamiento, añadiendo ácido ascórbico y/o un  
 derivado del mismo al producto fermentado que contiene microorganismos que producen ecuol en el estado de  
 células vivas.

25 La presente invención se ha logrado basándose en estos hallazgos y en mejoras adicionales de estos hallazgos.

Específicamente, la presente invención proporciona las siguientes invenciones.

30 Punto 1. Una composición que contiene microorganismos que producen ecuol que contiene (A) un microorganismo  
 que produce ecuol en un estado de una célula viva, y (B) al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste  
 en ácido ascórbico, derivados del mismo y sales del mismo, en la que el componente (B) está contenido en una  
 proporción de mezclado del 0,05 al 5% en peso, en la que la composición que contiene microorganismos que  
 producen ecuol comprende un material fermentado que se fermentó usando un microorganismo que produce ecuol  
 como el microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, y en la que el derivado de ácido  
 35 ascórbico es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en 2,6-dipalmitato de ascorbilo, 6-estearato  
 de ascorbilo, 2-fosfato de ascorbilo, 2-sulfato de ascorbilo, 2-glucósido de ascorbilo, ascorbil-glucosamina, 6-  
 palmitato de ascorbilo, tetra-isopalmitato de L-ascorbilo y tetra-2-hexildecanoato de ascorbilo.

Punto 2. La composición según el punto 1, en la que el pH de la misma es de 5,0 o menor.

40 Punto 3. La composición según el punto 1, que es una bebida de soja fermentada o una leche de soja fermentada.

Punto 4. La composición según el punto 1, en la que el microorganismo que produce ecuol es una bacteria del ácido  
 láctico.

45 Punto 5. La composición según el punto 1, en la que el microorganismo que produce ecuol es *Lactococcus garvieae*.

50 Punto 6. Un método para mantener la capacidad de producción de ecuol de un microorganismo que produce ecuol,  
 comprendiendo el método: añadir al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico,  
 derivados del mismo, y sales del mismo a una composición que contiene un microorganismo que produce ecuol, en  
 el estado de una célula viva, en el que la composición que contiene un microorganismo que produce ecuol  
 comprende un material fermentado que se fermentó usando un microorganismo que produce ecuol como el  
 microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, y en el que el derivado de ácido ascórbico es al  
 menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en 2,6-dipalmitato de ascorbilo, 6-estearato de ascorbilo, 2-  
 fosfato de ascorbilo, 2-sulfato de ascorbilo, 2-glucósido de ascorbilo, ascorbil-glucosamina, 6-palmitato de ascorbilo,  
 55 tetra-isopalmitato de L-ascorbilo y tetra-2-hexildecanoato de ascorbilo.

**[Efectos ventajosos de la invención]**

60 Según el procedimiento de producción, dado que puede prepararse un producto fermentado que contiene  
 microorganismos que producen ecuol en el estado de célula vivas mediante lo cual se mantiene la capacidad de  
 producción de ecuol, por primera vez pueden obtenerse bebidas y alimentos que contienen un microorganismo que  
 produce ecuol en el estado de una célula viva.

65 Además, el procedimiento de producción permite el procesamiento de fermentación a la vez que se mantiene la  
 capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, aunque se aplique en un procedimiento  
 de producción en masa aplicable industrialmente. Esto hace que la presente invención sea sumamente práctica

desde el punto de vista comercial, y extremadamente útil.

Cuando se proporcionan bebidas y alimentos que contienen microorganismos que producen ecuol en el estado de una célula viva mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de ecuol a seres humanos que no pueden producir ecuol (no productores de ecuol), los no productores de ecuol pueden adquirir la capacidad de producción de ecuol, y por tanto beneficiarse de las actividades biológicas eficaces atribuibles al ecuol.

Además, según la composición que contiene microorganismos que producen ecuol de la presente invención, la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol puede mantenerse de manera estable durante un periodo de tiempo prolongado; es decir, se proporciona estabilidad en almacenamiento, lo que puede permitir que el microorganismo que produce ecuol soporte suficientemente la distribución y las ventas. En particular, si la composición que contiene microorganismos que producen ecuol de la presente invención está en forma de una bebida de soja fermentada o una leche de soja fermentada, dado que el microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva está contenido junto con constituyentes derivados de soja útiles tales como especies de daidzeína, es ventajosamente más fácil que el microorganismo que produce ecuol genere ecuol en el intestino.

#### [Breve descripción de los dibujos]

La figura 1 muestra los resultados de mediciones del recuento de células viables de la cepa de *Lactococcus* contenida en cada bebida en el ejemplo 4.

La figura 2 muestra los resultados de mediciones de la capacidad de producción de ecuol de la cepa de *Lactococcus* contenida en cada bebida en el ejemplo 4.

#### [Descripción de realizaciones]

En la presente invención, un microorganismo que produce ecuol es un microorganismo que tiene la capacidad de utilizar al menos un tipo de especie de daidzeína seleccionada del grupo que consiste en glucósido de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína para producir ecuol (actividad metabólica). Los ejemplos específicos del glucósido de daidzeína incluyen daidzina, malonildaidzina, acetildaidzina y similares. No hay limitaciones particulares en cuanto a los microorganismos que producen ecuol usados en la presente invención, siempre que puedan ingerirse como alimento y pueda mantenerse su capacidad de producción de ecuol. Microorganismos conocidos que tienen las capacidades mencionadas anteriormente son, por ejemplo, microorganismos que pertenecen al género *Lactococcus* tal como *Lactococcus garvieae*; microorganismos que pertenecen al género *Streptococcus* tales como *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus constellatus*; microorganismos que pertenecen al género *Lactobacillus* tal como *Lactobacillus mucosae*; microorganismos que pertenecen al género *Bacteroides* tal como *Bacteroides ovatus*; microorganismos que pertenecen al género *Enterococcus* tal como *Enterococcus faecium*; microorganismos que pertenecen al género *Fingoldia* tal como *Fingoldia magna*; microorganismos que pertenecen al género *Veillonella*; microorganismos que pertenecen al género *Adlercreutzia* tal como *Adlercreutzia equolifaciens*; microorganismos que pertenecen al género *Eubacterium* tal como *Eubacterium limnosus*; microorganismos que pertenecen al género *Eggerthella* tal como *Eggerthella hongkongensis*; microorganismos que pertenecen al género *Bifidobacterium* tales como *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium breve*; microorganismos que pertenecen al género *Slackia*; microorganismos que pertenecen al género *Acinetobacter*, y similares. Entre los microorganismos que producen ecuol, pueden usarse preferiblemente bacterias del ácido láctico tales como del género *Lactococcus*, el género *Streptococcus*, el género *Lactobacillus* y el género *Bifidobacterium*, más preferiblemente bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Lactococcus*, y de manera particularmente preferible *Lactococcus garvieae*. Los microorganismos que producen ecuol pueden aislarse, por ejemplo, del interior de intestinos humanos con la presencia y ausencia de la capacidad de producción de ecuol como indicación. Con respecto a los microorganismos que producen ecuol mencionados anteriormente, se han depositado bacterias aisladas de intestinos humanos e identificadas por los presentes inventores y otros, es decir, *Lactococcus* 20-92 (FERM BP-10036), *Streptococcus* E-23-17 (FERM BP-6436), *Streptococcus* A6G225 (FERM BP-6437) y *Bacteroides* E-23-15 (FERM BP-6435), y estas bacterias depositadas pueden usarse en la presente invención. Además, como microorganismos que producen ecuol, también pueden usarse *Eubacterium limnosus* (ATCC 8486), *Eggerthella* sp. (KCC10490), *Adlercreutzia equolifaciens* (JCM14793), *Eggerthella hongkongensis* HKU10 (JCM14552), *Bifidobacterium adolescentis* TM-1 (FERM P-20325), *Bifidobacterium breve* (JCM1273), *Slackia* TM30 (FERM AP-20729), bacteria Gram positiva do03 (AHU-1763) (FERM AP-20905) y similares. Entre estas bacterias depositadas, en la presente invención se usa preferiblemente *Lactococcus* 20-92.

A continuación en el presente documento se detallarán procedimientos de producción (primer método y segundo método) para el material fermentado, el producto fermentado y la composición que contiene microorganismos que producen ecuol de la presente invención. El primer método es un método para preparar el material fermentado con polvo de soja y/o leche de soja como materias primas, y el segundo método es un método para preparar el material fermentado con leche como materia prima.

En la presente memoria descriptiva, un iniciador madre es un iniciador (inóculo) preparado a partir de un cultivo de reserva, y un iniciador a granel es un iniciador (inóculo) preparado a partir de un iniciador madre y usado en la

fermentación principal cuando se prepara una gran cantidad de material fermentado.

#### 1. Procedimiento de producción de material fermentado (primer método)

5 El presente primer método para preparar un material fermentado comprende una etapa (1) de preparación de un iniciador madre (a continuación en el presente documento puede denominarse "iniciador madre-1"), una etapa (2) de uso del iniciador madre-1 para preparar un iniciador a granel (a continuación en el presente documento puede denominarse "iniciador a granel-1") y una etapa (3) de uso del iniciador a granel-1 para preparar un material fermentado con polvo de soja o leche de soja como materia prima. A continuación en el presente documento, el presente primer método para preparar el material fermentado se explicará en detalle etapa por etapa.

#### Etapa (1)

15 En la presente invención, en primer lugar, se fermenta anaerómicamente un microorganismo que produce ecuol en un medio que contiene una especie de daidzeína (a continuación en el presente documento puede denominarse "medio de iniciador madre-1") en un estado en el que se mantiene un pH de 5,0 o superior para preparar un iniciador madre (a continuación en el presente documento puede denominarse "iniciador madre-1") (etapa (1)).

20 No hay limitación particular en cuanto al medio de iniciador madre-1 en la medida en que permita que crezca un microorganismo que produce ecuol, y sea aceptable como constituyente alimenticio; y la composición del mismo se establece de manera adecuada según los tipos del material fermentado preparado en última instancia.

25 La especie de daidzeína usada para el medio de iniciador madre-1 es una que incluye un tipo o dos o más tipos de especies de daidzeína de entre glucósido de daidzeína, daidzeína y dihidrodaidzeína. Los ejemplos específicos de glucósido de daidzeína incluyen daidzina, malonildaizina, acetildaizina, y similares. En la presente invención, puede usarse cualquiera de un producto puro de especie de daidzeína, un producto purificado en bruto de especie de daidzeína y una sustancia que contiene especie de daidzeína como la especie de daidzeína. Los ejemplos específicos de sustancias que contienen especie de daidzeína incluyen soja, leche de soja, germen de soja, kudzu, raíz de kudzu, trébol rojo, alfalfa y extractos de los mismos (extractos de disolventes polares tales como agua y alcohol hidratado) y similares. Desde el punto de vista de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, la especie de daidzeína usada en la presente invención es preferiblemente soja, leche de soja, germen de soja o extractos de los mismos, y de manera particularmente preferible soja.

35 En este caso, la soja que va a usarse como la especie de daidzeína es preferiblemente soja que se ha convertido en polvo, más preferiblemente soja que se ha cocido al vapor o hervido y convertido en polvo, y de manera particularmente preferible soja que se ha cocido al vapor o hervido a de 65 a 105°C durante de 30 segundos a 30 minutos, y se ha convertido en polvo. Además, aunque no hay limitación particular sobre el diámetro de partícula promedio de la soja convertida en polvo, desde el punto de vista de proporcionar el material fermentado preparado con textura satisfactoria, generalmente es deseable que el diámetro medio sea del orden de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  o más pequeño. Además, es deseable que haya el 10% o menos de partículas con diámetros de partícula de 150  $\mu\text{m}$  o más grande. Obsérvese que el diámetro de partícula se mide usando un medidor de distribución del tamaño de partícula de tipo difracción/difusión láser.

45 Los ejemplos de las proporciones de mezclado de la sustancia que contiene especie de daidzeína en el medio de iniciador madre-1 son proporciones de manera que la cantidad total de la especie de daidzeína llega a ser del 0,002 al 0,04% en peso, preferiblemente del 0,004 al 0,02% en peso, y más preferiblemente del 0,008 al 0,012% en peso. Más específicamente, cuando se usa polvo de soja como la especie de daidzeína, las proporciones son de manera que el polvo de soja convertido en peso seco llega a ser del 3 al 28% en peso en el medio de iniciador madre-1, preferiblemente del 5 al 28% en peso, y más preferiblemente del 7 al 17% en peso. Además, cuando se usa extracto de germen de soja como la especie de daidzeína, las proporciones son de manera que el extracto de germen de soja convertido en peso seco llega a ser del 0,005 al 0,1% en peso en el medio de iniciador madre-1, preferiblemente del 0,01 al 0,05% en peso, y más preferiblemente del 0,02 al 0,03% en peso. Al incluir la especie de daidzeína en tales proporciones de mezclado, puede hacerse crecer un microorganismo que produce ecuol sin perder la capacidad de producción de ecuol, lo que permite que se obtenga el iniciador madre-1.

60 Además, con el fin de promover el crecimiento del microorganismo que produce ecuol, el medio de iniciador madre-1 puede contener un aminoácido tal como arginina, vitaminas tales como ácido ascórbico, o un metal traza tal como pirofosfato de hierro. La adición de arginina en el medio de iniciador madre-1 es deseable para que el crecimiento del microorganismo que produce ecuol llegue a ser satisfactorio; ejemplos de las proporciones de mezclado de arginina en el medio de iniciador madre-1 son del 0,01 al 1% en peso, preferiblemente del 0,05 al 0,3% en peso.

Adicionalmente, además de los constituyentes anteriores, pueden añadirse nutrientes tales como una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono al medio de iniciador madre-1, según sea necesario.

65 Dado que el medio de iniciador madre-1 afecta en ocasiones al sabor del material fermentado, se dan como

ejemplos preferibles medios de cultivo que no afectan negativamente al sabor del material fermentado.

El medio de iniciador madre-1 se prepara mezclando, emulsionando según sea necesario y luego esterilizando cantidades dadas de constituyentes aditivos.

5 En la presente etapa (1), la fermentación anaerobia del microorganismo que produce ecuol puede realizarse mediante métodos convencionales bien conocidos que usan paquetes de gas y frascos anaerobios.

10 Además, en la presente etapa (1), la fermentación anaerobia se lleva a cabo manteniendo el pH a 5,0 o mayor, preferiblemente de 5,5 a 8,0 y más preferiblemente de 6,0 a 8,0. Al mantener el pH de este modo, puede prepararse el iniciador madre-1, en el que se ha hecho crecer un microorganismo que produce ecuol sin perder la capacidad de producción de ecuol, lo que permite que la capacidad de producción de ecuol del microorganismo se mantenga de manera estable en el material fermentado obtenido en última instancia mediante el presente primer método del procedimiento de producción. El control del pH durante tal fermentación anaerobia puede realizarse mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, en el medio usado, si la proporción de mezclado del hidrato de carbono (por ejemplo, glucosa o similar) utilizado por el microorganismo que produce ecuol se establece al 0,5% en peso o menos, preferiblemente al 0,4% en peso o menos y más preferiblemente al 0,3% en peso o menos, el pH no desciende aunque la fermentación continúe, lo que permite que el pH durante la fermentación anaerobia se mantenga en los intervalos mencionados anteriormente. Además, el control del pH durante la fermentación anaerobia también puede llevarse a cabo añadiendo de manera adecuada un regulador del pH.

20 La fermentación anaerobia en la presente etapa (1) se realiza inoculando el medio de iniciador madre-1 con el inóculo de un microorganismo que produce ecuol, y dejando que fermente anaeróbicamente en una región de temperatura que permita el crecimiento del microorganismo, preferiblemente en una región de temperatura óptima del microorganismo durante de 20 a 96 horas, más preferiblemente de 72 a 96 horas. Más específicamente, cuando se usa una bacteria del ácido láctico como microorganismo que produce ecuol, basta con fermentar anaeróbicamente a, por ejemplo, de 35 a 39°C durante de 72 a 96 horas.

25 El iniciador madre-1 obtenido de esta manera contiene un microorganismo que produce ecuol que se ha hecho crecer y que está en un estado en el que se mantiene la capacidad de producción de ecuol.

30 En iniciador madre así obtenido puede proporcionarse directamente a la etapa (2). Alternativamente, también es posible usar el iniciador madre como inóculo para producir un iniciador madre adicional, si es necesario, de la misma manera que se describió anteriormente, y entonces proporcionar el iniciador madre adicional en el procedimiento de producción posterior. El procedimiento de producción reutilizando el iniciador madre producido de la misma manera que se describió anteriormente puede repetirse una vez o más; por ejemplo, el procedimiento de producción puede repetirse de 1 a 10 veces. Aunque la fermentación se repita reutilizando el iniciador madre, siempre que puedan cumplirse las condiciones anteriores, pueden contenerse microorganismos que producen ecuol en el iniciador madre 1 a la vez que se mantiene la capacidad de producción de ecuol.

40

#### Etapa (2)

45 A continuación, usando el iniciador madre-1 obtenido en la etapa (1) anterior, la fermentación se lleva a cabo con un medio que contiene la especie de daidzeína (a continuación en el presente documento puede denominarse "medio de iniciador a granel-1") en un estado en el que se mantiene un pH de 5,0 o superior para preparar el iniciador a granel-1 (a continuación en el presente documento puede denominarse "iniciador a granel-1") (etapa (2)).

50 No hay limitación particular sobre el medio de iniciador a granel-1 en la medida en que sea uno que contenga la especie de daidzeína, permita que crezca un microorganismo que produce ecuol, y esté aceptado como constituyente alimenticio; y el medio de iniciador a granel-1 se establece de manera adecuada según el tipo del material fermentado.

55 Al contener la especie de daidzeína, el medio de iniciador a granel-1 permite el crecimiento en un estado en el que se mantiene la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol. Los tipos y las proporciones de mezclado de la especie de daidzeína mezclada en el medio de iniciador a granel-1 son los mismos que en el medio de fermentación principal-1 descrito más adelante.

60 Además, los tipos y las proporciones de mezclado de los constituyentes aditivos que pueden mezclarse además de la especie de daidzeína en el medio de iniciador a granel-1 son los mismos que en el medio de iniciador madre-1 descrito anteriormente. Además, dado que el medio de iniciador a granel-1 en ocasiones afecta al sabor del material fermentado, los ejemplos incluyen preferiblemente medios de cultivo que no afectan negativamente al sabor del material fermentado, e incluyen más preferiblemente los que tienen la misma composición que el medio de iniciador madre-1 descrito anteriormente.

65 El medio de iniciador a granel-1 se prepara mezclando, emulsionando según sea necesario y luego esterilizando cantidades dadas de constituyentes aditivos.

En la presente etapa (2), la fermentación anaerobia se lleva a cabo manteniendo el pH a 5,0 o mayor, preferiblemente de 5,5 a 8,0, y más preferiblemente de 6,0 a 8,0. Al mantener el pH de esta manera, puede prepararse el iniciador a granel-1, en el que se ha hecho crecer un microorganismo que produce ecuol sin perder la capacidad de producción de ecuol, lo que permite que la capacidad de producción de ecuol del microorganismo se mantenga de manera estable en el material fermentado obtenido en última instancia mediante el presente primer método del procedimiento de producción. El control del pH durante tal fermentación puede realizarse mediante métodos que son iguales a los de la etapa (1) anterior.

Además, en la presente etapa (2), aunque la fermentación puede llevarse a cabo en atmósfera o bien aerobia o bien anaerobia, desde los puntos de vista de disminución del coste de fabricación, la conveniencia de funcionamiento y similares, es deseable llevar a cabo la fermentación en una atmósfera aerobia. Aunque los microorganismos que producen ecuol son propensos a perder la capacidad de producción de ecuol en una atmósfera aerobia, la capacidad de producción de ecuol puede mantenerse controlando las condiciones de pH en un intervalo específico durante el cultivo, incluso en una atmósfera aerobia.

La fermentación en la presente etapa (2) se realiza añadiendo el iniciador madre-1 obtenido en la etapa (1) anterior al medio de iniciador a granel-1, por ejemplo en el orden del 0,5 al 10 por ciento en volumen, preferiblemente del orden del 1 al 5 por ciento en volumen, y dejando fermentar en una región de temperatura que permita el crecimiento del microorganismo, preferiblemente en una región de temperatura óptima del microorganismo durante de 10 a 28 horas, preferiblemente de 14 a 24 horas. Más concretamente, cuando se usa una bacteria del ácido láctico como microorganismo que produce ecuol, basta con fermentar de manera anaerobia, por ejemplo, a de 35 a 39°C durante de 14 a 24 horas.

El iniciador a granel-1 obtenido de este modo contiene un microorganismo que produce ecuol que se ha hecho crecer y está en un estado en el que se mantiene la capacidad de producción de ecuol.

Aunque el iniciador a granel-1 puede someterse en su estado actual a la siguiente etapa (3), el iniciador a granel-1 puede usarse, según sea necesario, como iniciador (iniciador a granel primario), la presente etapa (2) puede realizarse de nuevo para preparar un iniciador a granel secundario, y este iniciador a granel secundario puede someterse a la siguiente etapa (3).

### Etapa (3)

A continuación, usando el iniciador a granel-1 obtenido en la etapa (2) anterior, la fermentación se lleva a cabo con un medio que contiene un polvo de soja y/o una leche de soja (a continuación en el presente documento puede denominarse "el medio de fermentación principal-1") para preparar un material fermentado (etapa (3)).

No hay limitación particular en cuanto al medio de fermentación principal-1, en la medida en que contenga al menos uno de polvo de soja y leche de soja, permita que crezca un microorganismo que produce ecuol, y sea aceptable como constituyente alimenticio.

Un ejemplo específico del medio que contiene polvo de soja usado como medio de fermentación principal-1 es una disolución acuosa que contiene polvo de soja. Desde los puntos de vista de hacer que el sabor y la textura sean satisfactorios, y suprimir además el olor a soja, es deseable usar polvo de soja que se haya sometido a tratamiento térmico cocinando al vapor o hirviendo el polvo de soja usado en el medio de fermentación principal-1. Un ejemplo específico de polvo de soja que se ha sometido a tratamiento térmico de esta manera es soja que se ha cocido al vapor o hervido a de 65 a 105°C durante de 30 segundos a 30 minutos, y se ha convertido en polvo. Además, aunque no hay limitación particular sobre el diámetro de partícula promedio del polvo de soja, desde el punto de vista de proporcionar el material fermentado preparado con una textura satisfactoria, generalmente es deseable que el diámetro medio sea del orden de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  o más pequeño. Además, es deseable que haya el 10% o menos de partículas con diámetros de partícula de 150  $\mu\text{m}$  o más grande. Obsérvese que el diámetro de partícula se mide usando un medidor de distribución del tamaño de partícula de tipo difracción/difusión láser. Cuando se usa una disolución acuosa que contiene polvo de soja como medio de fermentación principal-1, el polvo de soja se añade de manera deseable al agua y se somete a un tratamiento de homogeneización usando un homogeneizador o similar. Al realizar un tratamiento de homogeneización de este modo, puede conferirse una textura excelente, en particular suavidad, al material fermentado preparado. Además, cuando se usa una disolución acuosa que contiene polvo de soja como medio de fermentación principal-1, aunque no hay límite particular sobre la proporción de mezclado de polvo de soja en la disolución acuosa, el polvo de soja se convierte, por ejemplo, en peso seco a del 3 al 28% en peso, preferiblemente del 5 al 28% en peso, y más preferiblemente del 7 al 17% en peso.

Cuando se usa un medio que contiene leche de soja como medio de fermentación principal-1, puede usarse leche de soja en su estado actual como medio de fermentación principal-1. Los procedimientos de producción para la leche de soja se conocen bien en el campo técnico correspondiente. De manera específica, puede prepararse leche de soja moliendo soja sin cáscara como materia prima, añadiendo la soja sin cáscara a agua para la molienda en

húmedo para crear una suspensión (semillas de soja sin procesar, zumo de semillas de soja), sometiendo a tratamiento térmico esta suspensión según sea necesario, y luego retirando el contenido sólido (pulpa de soja) mediante tratamiento de separación sólido-líquido.

5 Además, el medio de fermentación principal-1 puede incluir además otros constituyentes aditivos en la composición anterior. Dado que la composición del medio de fermentación principal-1 influye en el sabor y la textura del material fermentado preparado, los otros constituyentes aditivos que van a mezclarse se determinan de manera adecuada según el tipo de material fermentado que es el objetivo de la preparación. Los constituyentes aditivos mezclados en el medio de fermentación principal-1 incluyen, por ejemplo, edulcorantes tales como sacarosa, sucralosa y estevia; 10 saborizantes tales como extracto de café y extracto de té negro; aroma; constituyentes de origen vegetal tales como zumo de frutas, fragmentos de frutas, zumo de verduras y fragmentos de verduras; acidulantes tales como ácido glucónico; metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc y hierro; vitaminas tales como ácido ascórbico; y similares. Dado que no es necesario suprimir una disminución en el pH en la fermentación de la presente etapa (3), pueden contenerse constituyentes de origen vegetal que contienen edulcorantes incluyendo sacáridos (sacarosa, glucosa, y similares) y similares utilizados por el microorganismo que produce ecuol en el medio de fermentación principal-1. 15

El medio de fermentación principal-1 se prepara mezclando cantidades dadas de constituyentes, que se emulsionan según sea necesario y luego se esterilizan.

20 Para la fermentación en la presente etapa (3), el iniciador a granel-1 obtenido en la etapa (2) anterior se añade suficientemente al medio de fermentación principal-1 en del orden, por ejemplo, del 0,5 al 10% en volumen, y preferiblemente del orden del 1 al 5% en volumen; y luego se agita o se deja reposar la mezcla en una región de temperatura que permita el crecimiento del microorganismo, preferiblemente en una región de temperatura óptima del microorganismo durante de 10 a 28 horas, más preferiblemente de 14 a 24 horas. Específicamente, cuando se 25 usa una bacteria del ácido láctico como microorganismo que produce ecuol, basta con fermentar, por ejemplo, a de 35 a 39°C durante de 14 a 24 horas.

Aunque la fermentación principal en la presente etapa (3) puede llevarse a cabo en atmósfera o bien aerobia o bien anaerobia, desde los puntos de vista de disminución del coste de fabricación, la conveniencia de funcionamiento y 30 similares, es deseable que se realice en una atmósfera aerobia.

Además, en la fermentación en la presente etapa (3), no es necesario controlar particularmente el pH durante la fermentación. En general, a medida que avanza la fermentación en la presente etapa (3), el pH en el material fermentado tiende a disminuir hasta del orden de 5,0 o menor. 35

Aunque normalmente se observa una fuerte tendencia a perder la capacidad de producción de ecuol en un microorganismo que produce ecuol en una atmósfera aerobia y del orden de pH 5,0 o menor, según el presente primer método del procedimiento de producción, el uso del iniciador a granel-1 preparado a través de las etapas (1) y (2) anteriores para llevar a cabo la fermentación de la fase final permite que se produzca un material fermentado 40 que contiene microorganismos que producen ecuol en el estado de célula vivas mediante lo cual se mantiene la capacidad de producción de ecuol.

Cuando se usa un medio que contiene polvo de soja como medio de fermentación principal-1, se obtiene en última instancia soja fermentada que va a usarse como producto de bebida o alimento, como material fermentado. Además, 45 cuando se usa un medio que contiene leche de soja como medio de fermentación principal-1, se obtiene en última instancia leche de soja fermentada que va a usarse como producto de bebida o alimento, como material fermentado. El presente primer método del procedimiento de producción es adecuado para preparar productos de bebida o alimento de soja fermentada, es decir, para la preparación de un material fermentado en el que ha fermentado un medio que contiene polvo de soja. 50

El material fermentado obtenido de esta manera contiene un microorganismo que produce ecuol como célula viva en la que todavía se mantiene la capacidad de producción de ecuol.

## 2. Procedimiento de producción de material fermentado (segundo método)

55 El presente segundo método para preparar un material fermentado comprende la etapa (I) de preparación de un iniciador madre (a continuación en el presente documento puede denominarse "iniciador madre-2") y la etapa (II) de realización de la fermentación usando el iniciador madre-2 con leche como materia prima. A continuación en el presente documento, el procedimiento de producción se describirá en detalle etapa por etapa.

### 60 Etapa (I)

En la presente invención, en primer lugar, se fermenta anaeróbicamente un microorganismo que produce ecuol en un medio que contiene una especie de daidzeína (a continuación en el presente documento denominado "medio de 65 iniciador madre-2") para preparar un iniciador madre (etapa (I)).

En la medida en que el medio de iniciador madre-2 permita que crezca un microorganismo que produce ecuol y sea aceptable como constituyente alimenticio, no hay limitación particular sobre la composición del mismo, que puede establecerse de manera adecuada según el tipo de material fermentado.

5 Con respecto a la especie de daidzeína usada en el medio de iniciador madre-2, aunque es la misma que la usada en el medio de iniciador madre-1 del primer método anterior, en el presente segundo método del procedimiento de producción, desde el punto de vista de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, es deseable hipocótilo de soja o un extracto del mismo, y es particularmente deseable un extracto de hipocótilo de soja.

10 La proporción de mezclado de la especie de daidzeína que va a mezclarse en el medio de iniciador madre-2 es igual que la del medio de iniciador madre-1 usado en el primer método anterior.

15 Adicionalmente, además de los constituyentes anteriores, el medio de iniciador madre-2 puede contener además otros constituyentes aditivos. Los tipos y las proporciones de mezclado de otro constituyente aditivo que puede mezclarse en el medio de iniciador madre-2 son los mismos que los de en el medio de iniciador madre-1 usado en el primer método anterior.

20 En particular, el medio de iniciador madre-2 contiene extracto de levadura, y de manera deseable agentes que promueven la fermentación tales como hidrolizado de suero de leche e hidrolizado de caseína. En el presente segundo método del procedimiento de producción, el extracto de levadura puede mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol. El extracto de levadura se añade al medio de iniciador madre-2 en las proporciones de mezclado del 0,1% en peso o más, preferiblemente del 0,1 al 1% en peso, y más preferiblemente del 0,1 al 0,2% en peso. Si la concentración de extracto de levadura cumple el intervalo mencionado anteriormente, puede mantenerse de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol a lo largo de un periodo de tiempo prolongado en el material fermentado preparado en última instancia.

30 Dado que el medio de iniciador madre-2 en ocasiones afecta al sabor del material fermentado preparado en última instancia, los medios de cultivo incluyen, por ejemplo, medios que no afectan negativamente al sabor del material fermentado; los ejemplos incluyen medios que contienen leche, y, según sea necesario, un constituyente que contiene grasa de leche, además de los constituyentes anteriores. Los tipos y las proporciones de mezclado de la leche y los constituyentes que contienen grasa de leche mezclados en el medio de iniciador madre-2 son los mismos que en el medio de fermentación-2 descrito a continuación. Un ejemplo deseable de un medio de iniciador madre-2 es uno con la misma composición que el medio de fermentación principal-2 usado en la etapa (II).

35 El medio de iniciador madre-2 se prepara mezclando, emulsionando según sea necesario y luego esterilizando cantidades dadas de constituyentes aditivos.

40 En la presente etapa (1), la fermentación anaerobia de un microorganismo que produce ecuol puede realizarse mediante métodos conocidos de manera convencional usando paquetes de gas y frascos anaerobios.

45 Además, en la presente etapa (I) es deseable mantener el pH durante la fermentación anaerobia a 4,6 o superior, preferiblemente de 5,0 a 7,0, y más preferiblemente de 5,5 a 6,5. Al mantener el pH de esta manera, pueden potenciarse los efectos de la presente invención de hacer crecer un microorganismo que produce ecuol sin perder la capacidad de producción de ecuol, y también de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo tras la preparación. El control del pH durante tal fermentación anaerobia puede realizarse mediante métodos que son iguales a los de la etapa (1) en el primer método anterior.

50 La fermentación anaerobia en la presente etapa (I) se realiza inoculando el medio de iniciador madre-2 con el inóculo de un microorganismo que produce ecuol, y dejando que la mezcla fermente anaeróticamente en una región de temperatura que permita el crecimiento del microorganismo, preferiblemente en una región de temperatura óptima del microorganismo durante de 20 a 28 horas, más preferiblemente de 22 a 26 horas. Específicamente, cuando se usa una bacteria del ácido láctico como microorganismo que produce ecuol, basta con fermentar anaeróticamente a, por ejemplo, de 35 a 39°C durante de 22 a 26 horas.

55 El iniciador madre-2 obtenido de esta manera contiene un microorganismo que produce ecuol que se ha hecho crecer y está en un estado en el que se mantiene la capacidad de producción de ecuol.

## 60 Etapa (II)

A continuación, usando el iniciador madre-2 obtenido en la etapa (I) anterior, se fermenta un medio que contiene la especie de daidzeína (a continuación en el presente documento denominado "el medio de fermentación principal-2") en un estado en el que se mantiene el pH de 4,6 o superior (a continuación en el presente documento puede denominarse "la fermentación principal") (etapa (II)).

65

5 En la presente etapa (II), aunque el iniciador madre-2 obtenido en la etapa (I) anterior puede añadirse al medio de fermentación principal-2 para llevar a cabo la fermentación principal, cuando se prepara una gran cantidad de producto de leche fermentada, el iniciador madre-2 puede usarse para preparar además un iniciador a granel (a continuación en el presente documento puede denominarse "iniciador a granel-2"), y el iniciador a granel-2 se añade al medio de fermentación principal para realizar la fermentación principal.

10 Para el medio usado en la preparación del iniciador a granel-2 (a continuación en el presente documento indicado como "medio de iniciador a granel-2"), se usa un medio que contiene la especie de daidzeína. Al mezclar la especie de daidzeína de esta manera, es posible el crecimiento en un estado que mantiene la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol. Los tipos y las proporciones de mezclado de la especie de daidzeína que va a mezclarse en el medio de iniciador a granel-2 son los mismos que los de en el medio de iniciador madre-2 anterior.

15 No hay limitación particular sobre el medio de iniciador a granel-2, en la medida en que contenga la especie de daidzeína, permita que crezca un microorganismo que produce ecuol, y sea aceptable como constituyente alimenticio; y el medio de iniciador a granel-2 se establece de manera adecuada según el tipo del material fermentado. Los tipos y las proporciones de mezclado de los constituyentes aditivos que pueden mezclarse además de la especie de daidzeína en el medio de iniciador a granel-2 son los mismos que los de en el medio de iniciador madre-2 descrito anteriormente. Obsérvese que, con el fin de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, el medio de iniciador a granel-2 también contiene extracto de levadura. Además, dado que el medio de iniciador a granel-2 en ocasiones afecta al sabor del material fermentado, el medio de iniciador a granel-2 contiene de manera deseable leche, y, según sea necesario, un constituyente que contiene grasa de leche.

25 Los ejemplos del medio de iniciador a granel-2 incluyen preferiblemente un medio que no influye negativamente en el sabor del material fermentado, y, más preferiblemente, es uno con la misma composición que el medio de fermentación principal-2.

30 El medio de iniciador a granel-2 se prepara mezclando, emulsionando según sea necesario, y luego esterilizando cantidades dadas de constituyentes de mezclado.

35 Con el fin de preparar el iniciador a granel-2, el iniciador madre-2 obtenido en la etapa (I) anterior se añade al medio de iniciador a granel-2 en del orden, por ejemplo, del 1 al 10% en volumen, preferiblemente del orden del 1 al 5% en volumen; y se deja que fermente en una región de temperatura que permita el crecimiento del microorganismo, preferiblemente en una región de temperatura óptima del microorganismo durante de 20 a 28 horas, más preferiblemente de 22 a 26 horas. Específicamente, cuando se usa una bacteria del ácido láctico como microorganismo que produce ecuol, basta con que fermente a, por ejemplo, de 35 a 39°C durante de 22 a 26 horas.

40 En la preparación del iniciador a granel-2, aunque la fermentación puede llevarse a cabo en atmósfera o bien aerobia o bien anaerobia, desde el punto de vista de disminución del coste de fabricación, la conveniencia de funcionamiento y similares, es deseable que se realice en una atmósfera aerobia.

45 Además, en la preparación del iniciador a granel-2, aunque no hay limitación particular con respecto al pH durante la fermentación, es deseable mantener un pH de 4,6 o superior, preferiblemente de 5,0 a 7,0, y más preferiblemente de 5,5 a 6,5. Al mantener el pH de esta manera, el microorganismo que produce ecuol puede hacerse crecer sin perder la capacidad de producción de ecuol. Tal control del pH durante la fermentación puede llevarse a cabo mediante métodos que son iguales a los de la etapa (I) anterior.

50 Aunque el iniciador a granel-2 puede someterse en su estado actual a la siguiente fermentación principal, el iniciador a granel-2 puede usarse, según sea necesario, como iniciador (iniciador a granel primario), llevándose a cabo la fermentación de nuevo en las mismas condiciones que para el iniciador a granel-2 para preparar un iniciador a granel secundario, y luego el iniciador a granel secundario se somete a la siguiente fermentación principal.

55 No hay limitación particular con respecto al medio de fermentación principal-2 usado en la presente etapa (II), en la medida en que el medio de fermentación principal-2 contenga la especie de daidzeína y leche, permita que crezca un microorganismo que produce ecuol, y sea aceptable como constituyente alimenticio.

60 La especie de daidzeína usada en el medio de fermentación principal-2 es la misma que la usada en el medio de iniciador madre-1 del primer método anterior. Sin embargo, desde el punto de vista de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, en el presente segundo método del procedimiento de producción, es deseable hipocótilo de soja o un extracto del mismo, y es particularmente deseable extracto de hipocótilo de soja.

65 Las proporciones de mezclado de la especie de daidzeína que va a mezclarse en el medio de fermentación principal-2 son las mismas que las de en el medio de iniciador madre-2 anterior.

Además, como leche usada en el medio de fermentación principal-2, basta una leche aceptable como alimento. Los ejemplos de tal leche incluyen leches de origen animal tales como leche de vaca, leche de cabra y leche de oveja; leche desnatada; leche reconstituida obtenida disolviendo leche desnatada en polvo o leche entera en polvo; y similares.

Además, en el medio de fermentación principal-2, con el fin de mejorar el sabor del material fermentado preparado, el medio de fermentación principal-2 puede contener constituyentes que contienen grasa de leche tales como mantequilla y nata fresca. Los ejemplos generales de las proporciones de mezclado de estos constituyentes que contienen grasa de leche convertidos en la cantidad de grasa de leche son del 0,1 al 4,5% en peso, preferiblemente del 0,5 al 4,2% en peso, y más preferiblemente del 1,0 al 3,5% en peso.

Además, los tipos y las proporciones de mezclado de los constituyentes aditivos que pueden mezclarse en el medio de fermentación principal-2 además de los constituyentes anteriores son los mismos que los de en el medio de iniciador madre-2 anterior. Obsérvese que, con el fin de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, el medio de fermentación principal-2 también contiene extracto de levadura.

El medio de fermentación principal-2 se prepara mezclando, emulsionando según sea necesario y luego esterilizando respectivamente una cantidad dada de leche, la especie de daidzeína, y, según sea necesario, otros constituyentes aditivos.

Para la fermentación principal en la presente etapa (II), basta con añadir el iniciador madre-2 obtenido en la etapa (I) anterior o el iniciador a granel-2 anterior al medio de fermentación principal-2 en del orden, por ejemplo, del 1 al 10% en volumen, preferiblemente del 1 al 5% en volumen; y agitar o dejar reposar la mezcla en una región de temperatura que permita el crecimiento del microorganismo, preferiblemente en una región de temperatura óptima del microorganismo durante de 20 a 28 horas, más preferiblemente de 22 a 26 horas. Específicamente, cuando se usa una bacteria del ácido láctico como microorganismo que produce ecuol, basta con fermentar a, por ejemplo, de 35 a 39°C durante de 22 a 26 horas.

Aunque la fermentación principal en la presente etapa (II) puede llevarse a cabo en atmósfera o bien aerobia o bien anaerobia, desde los puntos de vista de disminución del coste de fabricación, la conveniencia de funcionamiento y similares, es deseable que se realice en una atmósfera aerobia.

Además, en la fermentación principal en la presente etapa (II), el pH durante la fermentación se mantiene a 4,6 o superior, preferiblemente de 5,0 a 7,0, y más preferiblemente de 5,5 a 6,5. Al mantener el pH de esta manera, un microorganismo que produce ecuol puede hacerse crecer sin perder la capacidad de producción de ecuol, y la capacidad de producción de ecuol del microorganismo puede mantenerse de manera estable incluso tras la preparación. El control del pH durante tal fermentación anaerobia puede realizarse mediante métodos que son iguales a los de la etapa (I).

En el presente segundo método del procedimiento de producción, se prepara leche fermentada como material fermentado. El material fermentado contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva sin perder la capacidad de producción de ecuol.

### 3. Producto fermentado

Además, la presente invención proporciona un producto fermentado que contiene el material fermentado obtenido en el primer método y el segundo método anteriores. Es decir, los materiales fermentados obtenidos en el primer método y el segundo método anteriores pueden proporcionarse como productos fermentados en su estado actual; o, según sea necesario, mezclando constituyentes aditivos tales como, por ejemplo, edulcorantes tales como sacarosa, sucralosa y estevia; saborizantes tales como extracto de café y extracto de té negro; aroma; constituyentes de origen vegetal tales como polvo de soja, fragmentos de soja, zumo de frutas, fragmentos de frutas, zumo de verduras y fragmentos de verduras; metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc y hierro; vitaminas tales como ácido ascórbico; agentes de gelificación; estabilizadores tales como ácido glucónico; y diluyentes tales como agua. Sobre todo, el material fermentado obtenido mediante el primer método descrito anteriormente se proporciona de manera deseable como un producto fermentado mezclado con una disolución acuosa que contiene polvo de soja.

En el presente producto fermentado, no hay límite particular con respecto a las proporciones de mezclado de los materiales fermentados obtenidos en el primer método y el segundo método anteriores; por ejemplo, las proporciones de mezclado pueden ser del 5 al 100% en peso, preferiblemente del 10 al 100% en peso.

No hay limitación particular con respecto al pH del presente producto fermentado. Por ejemplo, si la atención se centra en mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol dentro del producto fermentado durante un periodo de tiempo prolongado, es deseable que el pH se ajuste a 4,6 o superior, preferiblemente de 5,0 a 7,0, y más preferiblemente de 5,5 a 6,5. Por otra parte, siendo preocupante la proliferación de bacterias contaminantes en la región neutra, si la atención se centra en suprimir la proliferación de

bacterias contaminantes, es deseable que el pH se ajuste a 5,0 o menor, preferiblemente de 4,0 a 4,8, y más preferiblemente de 4,2 a 4,6.

5 La morfología del presente producto fermentado se determina por el tipo del medio de fermentación principal usado en el momento de la preparación, el tipo del material fermentado obtenido en el primer método o el segundo método anteriores, el tipo de constituyente aditivo mezclado en el material fermentado, y similares; y puede ser cualquiera de una forma líquida, forma semisólida, forma sólida o forma de gel. Los ejemplos deseables de la morfología del presente producto fermentado incluyen bebidas y alimentos de soja fermentada, bebidas y alimentos de leche de soja fermentada, y leche fermentada y similares. En este caso, la leche fermentada incluye yogur (de tipo duro, tipo blando, tipo bebible), bebidas con bacterias del ácido láctico, y similares.

Dado que el presente producto fermentado contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, es deseable su distribución y venta a baja temperatura.

15 Dado que el presente producto fermentado contiene un microorganismo que produce ecuol que mantiene la capacidad de producción de ecuol incluso en el estado de una célula viva, pueden expresarse diversas actividades biológicas y actividades farmacológicas basándose en el microorganismo. Por consiguiente, el presente producto fermentado puede usarse específicamente en bebidas y alimentos saludables, bebidas y alimentos como suplemento dietético, bebidas y alimentos funcionales, bebidas y alimentos para enfermos, y similares, además de bebidas y alimentos generales.

Por ejemplo, dado que el presente producto fermentado, cuando se consume, permite que se genere ecuol por la acción del microorganismo que produce ecuol en los intestinos, y permite que se reciban eficazmente las actividades biológicas del ecuol, el presente producto fermentado es útil en aplicaciones tales como, por ejemplo: la prevención o el tratamiento de enfermedades y síntomas tales como trastornos menopáusicos, osteoporosis, hipertrofia de próstata y síndrome metabólico; la disminución del valor de colesterol en sangre; el blanqueamiento de la piel; la mejora del acné; la regulación intestinal; la mejora de la obesidad; y la diuresis. Entre ellas, el presente producto fermentado es particularmente útil en la prevención o mejora de dolencias indefinidas, o en síntomas asociados con la menopausia (por ejemplo, osteoporosis, trastornos menopáusicos y similares) en mujeres de mediana edad y mayores.

Aunque la ingesta diaria del presente producto de leche fermentada varía según el recuento de células del microorganismo que produce ecuol en el presente producto de leche fermentada, la edad y el peso corporal del consumidor, el número de ingestiones y similares, la ingesta diaria de adultos puede ser, por ejemplo, una cantidad que corresponde a de 10 a 500 g del presente producto fermentado.

#### 4. Composición que contiene microorganismos que producen ecuol

Al añadir al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, derivados del mismo y sales del mismo a la composición que contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol puede mantenerse de manera estable incluso en condiciones de almacenamiento aerobio o pH bajo; y puede suprimirse la pérdida de la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol en la composición, aunque se almacene durante un periodo de tiempo prolongado. Por tanto, la presente invención proporciona además una composición que contiene un microorganismo que produce ecuol (a continuación en el presente documento puede denominarse simplemente "la presente composición") que contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva (a continuación en el presente documento puede denominarse simplemente "constituyente (A)"), así como al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, derivados del mismo y sales del mismo (a continuación en el presente documento puede denominarse simplemente "constituyente (B)").

En la presente composición, pueden usarse células vivas aisladas o purificadas en bruto de un microorganismo que produce ecuol como el microorganismo que produce ecuol; además, también puede usarse un material fermentado usando un microorganismo que produce ecuol.

55 Aunque no hay limitación particular con respecto a la concentración de microorganismo que produce ecuol contenido en la presente composición, los ejemplos de la concentración incluyen de  $1 \times 10^5$  a  $10^{10}$  ufc/g, preferiblemente de  $1 \times 10^6$  a  $10^{10}$  ufc/g, y más preferiblemente de  $1 \times 10^7$  a  $10^{10}$  ufc/g.

En la presente composición, el constituyente (B) se mezcla con el fin de mantener de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol. Entre los constituyentes (B), el derivado de ácido ascórbico es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en 2,6-dipalmitato de ascorbilo, 6-estearato de ascorbilo, 2-fosfato de ascorbilo, 2-sulfato de ascorbilo, 2-glucósido de ascorbilo, ascorbil-glucosamina, 6-palmitato de ascorbilo, tetra-isopalmitato de L-ascorbilo y tetra-2-hexildecanoato de ascorbilo. Además, los ejemplos de sales de ácido ascórbico y derivados del mismo, aunque no están limitados particularmente siempre que sean aceptables como constituyentes alimenticios, incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de metales alcalinos de sodio. Los ejemplos deseables entre los constituyentes (B) incluyen ácido ascórbico y sales del mismo.

En la presente composición, los constituyentes (B) pueden usarse de manera individual o en combinación.

Las proporciones de mezclado del constituyente (B) anterior en la presente composición son del 0,05 al 5% en peso, preferiblemente del 0,05 al 2% en peso, y más preferiblemente del 0,1 al 2,0% en peso. Al cumplir con tales proporciones de mezclado, puede conservarse de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol.

Tampoco hay limitación particular con respecto al pH de la presente composición, que se establece de manera adecuada según el tipo de la presente composición. Desde el punto de vista de suprimir la proliferación de bacterias contaminantes en la presente composición, es deseable que el pH se ajuste a 5,0 o menor, preferiblemente de 4,0 a 4,8, y más preferiblemente de 4,2 a 4,6. Aunque la tendencia de un microorganismo que produce ecuol a perder la capacidad de producción de ecuol se hace en general más fuerte en un entorno de pH 5,0 o menor, tras lo cual ya no puede mantenerse de manera estable la capacidad de producción de ecuol, según la presente composición, la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol puede mantenerse de manera estable incluso en condiciones en las que el pH es de 5,0 o menor, debido a la acción del ácido ascórbico y/o derivado del mismo.

La presente composición puede contener, según sea necesario, constituyentes aditivos tales como, por ejemplo, edulcorantes tales como sacarosa, sucralosa y estevia; saborizantes tales como extracto de café y extracto de té negro; aroma; constituyentes de origen vegetal tales como zumo de frutas, fragmentos de frutas, zumo de verduras y fragmentos de verduras; metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc y hierro; vitaminas tales como  $\beta$ -caroteno; agentes de gelificación; estabilizadores tales como ácido glucónico; y diluyentes tales como agua. En este caso, los constituyentes aditivos que van a mezclarse en la presente composición son preferiblemente unos que el microorganismo que produce ecuol no utiliza para no perder estabilidad en almacenamiento.

Tampoco hay limitación particular con respecto a la morfología de la presente composición, que puede ser cualquiera de una forma líquida, forma semisólida, forma sólida o forma de gel.

La presente composición es un producto fermentado obtenido añadiendo ácido ascórbico y/o un derivado del mismo, y, si es necesario, otros constituyentes aditivos a un material fermentado que se fermentó usando un microorganismo que produce ecuol. En este caso, los ejemplos del material fermentado que se ha fermentado usando un microorganismo que produce ecuol incluyen preferiblemente materiales fermentados preparados mediante el primer método y el segundo método anteriores. Además, los ejemplos específicos del producto fermentado incluyen bebidas y alimentos de soja fermentada, bebidas y alimentos de leche de soja fermentada, leche fermentada, y similares. En este caso, la leche fermentada incluye yogur (de tipo duro, tipo blando, tipo bebible), bebida con bacterias del ácido láctico, y similares. Entre estos, los productos fermentados son preferiblemente bebida y alimento de soja fermentada, bebida y alimento de leche de soja fermentada; y más preferiblemente bebida y alimento de soja fermentada.

Además, un ejemplo preferido de la morfología de la presente composición es una composición que contiene células vivas aisladas o purificadas en bruto de un microorganismo que produce ecuol, ácido ascórbico y/o un derivado del mismo, portadores comestibles, así como otros constituyentes aditivos, según sea necesario. Los ejemplos de portadores comestibles incluyen una disolución acuosa que contiene polvo de soja, leche de soja, agua, gel comestible, leche, diversas disoluciones salinas y similares.

Dado que el presente producto fermentado contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, es deseable su distribución y venta a baja temperatura.

Dado que la presente composición contiene un microorganismo que produce ecuol en un estado que mantiene la capacidad de producción de ecuol incluso como célula viva, pueden expresarse diversas actividades biológicas y actividades farmacológicas basándose en el microorganismo. Por consiguiente, la presente composición puede usarse en los campos de la medicina, o en bebidas y alimentos.

Cuando la presente composición se usa en el campo de bebidas y alimentos, la presente composición se proporciona como bebidas y alimentos saludables específicos, bebidas y alimentos como suplemento dietético, bebidas y alimentos funcionales, bebidas y alimentos para enfermos, y similares, además de bebidas y alimentos generales.

Por ejemplo, puesto que la presente composición, cuando se consume, permite que se genere ecuol por la acción del microorganismo que produce ecuol en los intestinos, y permite que los individuos se beneficien eficazmente de las actividades biológicas y las actividades farmacéuticas del ecuol, la presente composición la usan preferiblemente personas que buscan beneficiarse de la acción del ecuol en los campos de la medicina, o en bebidas y alimentos. Específicamente, la presente composición es útil en aplicaciones tales como, por ejemplo, la prevención o el tratamiento de enfermedades y síntomas tales como de trastornos menopáusicos, osteoporosis, hipertrofia de próstata y síndrome metabólico; la disminución del valor de colesterol en sangre; el blanqueamiento de la piel; la mejora del acné; la regulación intestinal; la mejora de la obesidad; y la diuresis. Entre ellas, la presente composición

es particularmente útil en la prevención o mejora de dolencias indefinidas, o síntomas asociados con la menopausia (por ejemplo, osteoporosis, trastornos menopáusicos y similares) en mujeres de mediana edad y mayores.

5 Aunque la ingesta diaria de la presente composición varía dependiendo del recuento de células del microorganismo que produce ecuol en el presente producto de leche fermentada, la edad y el peso corporal del consumidor, el número de ingestiones y similares, un ejemplo de una ingesta diaria en adultos es una cantidad que corresponde a de 10 a 500 g de la presente composición.

10 Además, tal como se describió anteriormente, al añadir (B) anterior a la composición que contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, puede conservarse de manera estable la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, y puede suprimirse la pérdida de la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol, aunque se almacene durante un periodo de tiempo prolongado. Por consiguiente, la presente invención proporciona además un método para mantener la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol que comprende añadir al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, derivados del mismo, y sales del mismo a la composición que contiene un microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva. La capacidad de producción de ecuol se mide según el método descrito en los siguientes ejemplos. Como realizaciones específicas del método de estabilización en almacenamiento, se adopta el contenido de la descripción de la composición anterior que contiene un microorganismo que produce ecuol.

## 20 Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle basándose en los ejemplos; sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

25 El polvo de soja usando en los siguientes ejemplos y ejemplos comparativos se preparó mediante el siguiente método.

### 30 Preparación de disolución de polvo de soja

Se peló soja sin cascara, se dividió en mitades y se sometió a tratamiento con vapor. El tratamiento con vapor continuó enviando vapor contra la soja sin cáscara hasta que se alcanzó una temperatura de 100°C, tras lo cual se mantuvo la temperatura a 100°C durante 140 segundos. A continuación, la soja tras el tratamiento con vapor se convirtió en copos tras hacerse pasar entre los rodillos de un molino de rodillos. Después, se secó la soja en forma de copos realizando secado con aire caliente a 80°C hasta que el contenido de humedad fue del orden del 3 al 6%; y entonces se molieron los copos con un molino neumático para obtener un polvo de soja. La molienda con el molino neumático se realizó de modo que el número de partículas molidas con un diámetro de 150 µm o más grande llegara a ser del 10% o menos.

40 Entonces se añadió una cantidad predeterminada de polvo de soja obtenido tal como se describió anteriormente a cantidades adecuadas de hidrogenocarbonato de sodio y citrato de trisodio disueltos agua, se dispersó y se disolvió, y se dejó que se hinchara durante 15 minutos o más. A continuación, se calentó la disolución obtenida a 95°C durante 10 minutos para extraer los constituyentes solubles en agua en el polvo de soja, así como para inactivar enzimas tales como el inhibidor de tripsina y LOX contenido en el polvo de soja. Tras el calentamiento, mientras se mantenía una temperatura de 80°C o superior, se añadió una cantidad adecuada de ácido cítrico para invertir el pH a neutro. Después, se llevó a cabo un tratamiento de homogeneización usando un homogeneizador (LAB40 fabricado por GAULIN), en condiciones en el intervalo de 200-1.000 kgf/cm<sup>2</sup> para preparar una disolución de polvo de soja (que contenía el 14% en peso de polvo de soja en peso seco).

50 Ejemplo 1: Preparación de alimento de soja fermentada mediante el primer método, y evaluación del alimento de soja fermentada

### 1. Preparación de alimento de soja fermentada

55 Se usó *Lactococcus garvieae* (cepa 20-92 de *Lactococcus*, FERM BP-10036) que tiene capacidad de producción de ecuol, para llevar a cabo la preparación del iniciador madre, la preparación del iniciador a granel, la fermentación principal y el llenado del recipiente, en las siguientes condiciones.

#### Preparación de iniciador madre

60 Se preparó un medio de iniciador madre mediante esterilización en autoclave (121°C, 15 minutos) de 100 ml de una disolución (pH 7,48) que contenía el 80% en peso de disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco), el 0,1% en peso de glucosa, el 0,1% en peso de L-arginina, y el resto en agua purificada. Este medio de iniciador se inoculó con un inóculo de la cepa 20-92 de *Lactococcus*, y se llevó a cabo un cultivo anaerobio con un paquete de gas a 37°C durante 96 horas para obtener un iniciador madre (pH 6,64).

65

## Preparación de iniciador a granel

Se preparó un medio de iniciador a granel mediante esterilización en autoclave (121°C, 15 minutos) de 5 l de una disolución (pH 7,48) que contenía el 80% en peso de disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco), el 0,1% en peso de glucosa, el 0,1% en peso de L-arginina, y el resto en agua purificada. Este medio de iniciador se inoculó con el iniciador madre obtenido anteriormente hasta un volumen del 1%, y se llevó a cabo un cultivo estacionario a 37°C durante 15 horas en condiciones aerobias para obtener un iniciador a granel (pH 6,72).

## 10 Fermentación principal

Se preparó el medio de fermentación principal esterilizando 200 l de una disolución (pH 6,78) que contenía el 50% en peso de disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco), el 6% en peso de zumo de zanahoria (Miyazaki Nokyokaju), el 6% en peso de pasta de calabaza (Nagano Sanyo Foods), y el resto en agua purificada con un esterilizador de doble tubo a 95°C durante 30 segundos. El medio de fermentación principal recuperado tras la esterilización se inoculó con 4 l del iniciador a granel obtenido anteriormente, y se llevó a cabo un cultivo estacionario a 37°C durante 15 horas en condiciones aerobias para obtener una disolución de soja fermentada (pH 4,56).

## 20 Mezclado de materias primas secundarias y llenado de recipientes

Se obtuvo una disolución de materia prima secundaria esterilizando 800 l de una disolución que contenía el 65% en peso de disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco), el 7,4% en peso de azúcar, el 1,0% en peso de formulación de agente de gelificación FG2524 (fabricado por Nitta Gelatin), el 0,8% en peso de ácido glucónico, el 0,4% en peso de aroma, el 0,1% en peso de ácido L-ascórbico y el resto en agua purificada con un esterilizador de doble tubo a 95°C durante 30 segundos. Se mezclaron 80 partes en peso de la disolución de materia prima secundaria y 20 partes en peso de la disolución de soja fermentada obtenida anteriormente a de 37 a 40°C. Mientras se mantenía la temperatura de la disolución mezclada, se llenó una cubeta de polietileno (capacidad total de 130 ml, diámetro de boca de 71 mm) con 100 g de disolución de manera estéril, y se selló con una tapa de aluminio. Se colocó el material dentro de una nevera a 5°C y se solidificó mediante enfriamiento para obtener un alimento de soja fermentada que contenía células vivas de la cepa 20-92 de *Lactococcus garvieae*.

35 2. Diversas evaluaciones

Se almacenó el alimento de soja fermentada sellado obtenido anteriormente a 10°C durante 3 semanas. Se midió el pH del alimento de soja fermentada inmediatamente después de la preparación, 1 semana después de la preparación, 2 semanas después de la preparación y 3 semanas después de la preparación; además, se evaluó el recuento de células de *Lactococcus garvieae* contenido en el alimento de soja fermentada, y la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* contenido en el alimento de soja fermentada mediante los siguientes métodos. Además, se midió de la misma forma el recuento de células de *Lactococcus garvieae* y la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* de cada uno del iniciador madre y el iniciador a granel preparados anteriormente y el producto fermentado después de la fermentación principal.

45 Medición del recuento de células de *Lactococcus garvieae*

Se determinó la medición del recuento de células viables de *Lactococcus garvieae* realizando un cultivo de vertido usando medio de agar para recuento en placa con adición de BCP (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) a 37°C durante 72 horas, y midiendo el número de colonias crecidas.

50 Medición de la presencia o ausencia de capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae*

Se añadieron 200 µl de alimento de soja fermentada a 5 ml de caldo GAM modificado que contenía daidzeína a una concentración de 10 µg/ml (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) para llevar a cabo un cultivo anaerobio a 37°C durante 96 horas con un paquete de gas. Entonces, se sometió la disolución de cultivo obtenida a análisis de HPLC para determinar la cantidad de ecul en la disolución de cultivo. El análisis de HPLC se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, se añadieron 0,5 ml de la disolución de cultivo a 5,0 ml de acetato de etilo para realizar extracción osmótica, se centrifugó el extracto obtenido a 3.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se sometió a evaporación para solidificar el disolvente secando a presión reducida. Entonces, se volvió a disolver el sólido obtenido en 1,0 ml de disolvente (fase móvil A/fase móvil B = 50/50) para usarse como muestra de HPLC. Se usó la serie D7000 (fabricada por Hitachi) para el análisis de HPLC y se usó Capcell Pack UGL 205 µm 4,6 Φ x 250 mm (fabricada por Shiseido) como columna. Para la fase móvil, se usó una disolución que comprendía disolución de tampón fosfato al 0,05% (que contenía EDTA) y acetato de etilo-metanol (1:10) mezclada a 8:2 como la fase móvil A, y se usó metanol que contenía acetato de etilo al 2% como la fase móvil B. La velocidad de flujo fue de 1,0 ml/minuto mediante el método de gradiente. Se usó el detector de UV-Vis SPD-10AVP para la detección, y las longitudes de onda de detección fueron 254 nm y 280 nm.

Resultados de la medición del recuento de células y la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae*

5 Los resultados de la medición se muestran en la tabla 1. Los resultados revelan que si el pH del iniciador madre y el iniciador a granel era de 5 o superior, incluso si el pH del producto fermentado después de la fermentación principal y del alimento de soja fermentada era de 4,6 o menor, podía prepararse un alimento de soja fermentada que contenía *Lactococcus garvieae* que conservaba la capacidad de producción de ecul. Obsérvese que el recuento de células *per se* de *Lactococcus garvieae* en el alimento de soja fermentada permanecía constante durante un periodo de tiempo prolongado, mientras que resultaba poco afectado por el pH o por la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecul.

[Tabla 1]

		pH	Recuento de células de <i>Lactococcus garvieae</i> (UFC/ml)	Capacidad de producción de ecul*1	Evaluación sensorial
	Iniciador madre	6,64	$7,1 \times 10^8$	O	-
	Iniciador a granel	6,72	$8,0 \times 10^8$	O	-
	Producto fermentado después de la fermentación principal	4,56	$5,7 \times 10^8$	O	-
Alimento de soja fermentada	Inmediatamente después de la preparación	4,58	$1,2 \times 10^8$	O	Satisfactorio
	1 semana después de la preparación	4,38	$3,0 \times 10^7$	O	Satisfactorio
	2 semanas después de la preparación	4,37	$1,1 \times 10^7$	O	Satisfactorio
	3 semanas después de la preparación	4,32	$1,3 \times 10^7$	O	Satisfactorio
	4 semanas después de la preparación	4,24	$3,0 \times 10^7$	O	Satisfactorio

15 \*1 La capacidad de producción de ecul se midió con n=2, y la determinación fue Δ cuando sólo se observó un caso de capacidad de producción de ecul, y O cuando se observó capacidad de producción de ecul en ambos casos.

Evaluación del gusto

20 El alimento de soja fermentada inmediatamente después de la preparación y el alimento de soja fermentada después de 3 semanas de almacenamiento fueron satisfactorios como alimentos con buen sabor a soja, y ningún gusto extraño ni olor extraño.

Ejemplo comparativo 1: Preparación de alimento de soja fermentada y evaluación del alimento de soja fermentada

25 La preparación del iniciador madre, la preparación del iniciador a granel y la fermentación principal para preparar a alimento de soja fermentada (ejemplo comparativo 1-1) se realizaron en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, excepto que se modificó la cantidad de glucosa añadida desde el 0,1% en peso hasta el 1,0% en peso en la preparación del iniciador madre.

30 Además, la preparación del iniciador madre, la preparación del iniciador a granel y la fermentación principal para preparar un alimento de soja fermentada (ejemplo comparativo 1-2) se realizaron en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, excepto que se modificó la cantidad de glucosa añadida desde el 0,1% en peso hasta el 1,0% en peso en la preparación del iniciador a granel.

35 El pH, el recuento de células de la cepa 20-92 de *Lactococcus garvieae* y la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecul del alimento de soja fermentada de los ejemplos comparativos 1-1 y 1-2 se evaluaron como en el ejemplo 1. Además, el recuento de células de la cepa 20-92 de *Lactococcus garvieae*, y la presencia o ausencia de capacidad de producción de ecul también se midieron del mismo modo para el iniciador madre, el iniciador a granel y la disolución de fermentación principal.

40 Los resultados se muestran en la tabla 2. En el ejemplo comparativo 1-1, que usó un medio en el que el pH

5 disminuye en la preparación de iniciador madre, aunque no se observó diferencia en el recuento de células de la cepa 20-92 de *Lactococcus garvieae*, se perdió la capacidad de producción de ecuol. De manera similar, en el iniciador a granel, la preparación de la disolución de fermentación principal y la preparación del alimento de soja fermentada posteriores, aunque no se observaron grandes diferencias con respecto al ejemplo 1 en el recuento de células, el pH y los aspectos sensoriales, no mejoró la capacidad de producción de ecuol. Además, al igual que con el ejemplo comparativo 1-1, que usó un medio en el que el pH disminuye durante la preparación del iniciador a granel, aunque no se observó ninguna diferencia en el recuento de células de la cepa 20-92 de *Lactococcus garvieae*, se perdió la capacidad de producción de ecuol. De manera similar, en la preparación de la fermentación principal y el alimento de soja fermentada posteriores, aunque no se observaron grandes diferencias en el recuento de células, el pH y los aspectos sensoriales, no mejoró la capacidad de producción de ecuol.

[Tabla 2]

		pH	Recuento de células de <i>Lactococcus garvieae</i> (UFC/ml)	Capacidad de producción de ecuol*1	Evaluación sensorial
Ejemplo comparativo 1-1	Iniciador madre	4,51	$6,8 \times 10^8$	×	-
	Iniciador a granel	6,73	$7,2 \times 10^8$	×	-
	Producto fermentado después de la fermentación principal	4,55	$6,2 \times 10^8$	×	-
	Alimento de soja fermentada	4,56	$1,3 \times 10^8$	×	Satisfactorio
Ejemplo comparativo 1-2	Iniciador madre	6,72	$8,2 \times 10^8$	O	-
	Iniciador a granel	4,52	$7,9 \times 10^8$	×	-
	Producto fermentado después de la fermentación principal	4,54	$5,8 \times 10^8$	×	-
	Alimento de soja fermentada	4,55	$1,8 \times 10^8$	×	Satisfactorio

15 \*1 La capacidad de producción de ecuol se midió con n=2, y la determinación fue Δ cuando sólo se observó un caso de capacidad de producción de ecuol, y O cuando se observó capacidad de producción de ecuol en ambos casos y × cuando no se observó capacidad de producción de ecuol

Ejemplo 2: Preparación de leche fermentada mediante el segundo método, y evaluación de la leche fermentada

20 1. Preparación de leche fermentada

Se usó *Lactococcus garvieae* (cepa 20-92 de *Lactococcus*, FERM BP-10036), que tiene capacidad de producción de ecuol, para llevar a cabo la preparación del iniciador madre, la preparación del iniciador a granel, la fermentación principal y el llenado del recipiente, en las siguientes condiciones.

25 Preparación del iniciador madre

30 Se preparó un medio de iniciador madre mediante esterilización en autoclave (115°C, 15 minutos) de 500 ml de una disolución (pH 6,14) que contenía el 10% en peso de leche desnatada en polvo, el 6,67% en peso de nata fresca, el 0,1% en peso de extracto de levadura ("SK yeast extract Hi-K", Nippon Paper Chemicals Co., Ltd.), el 0,025% en peso de hipocótilo de soja ("Soya Flavone HG", Fuji Oil Co., Ltd.; el contenido de la especie de daidzeína en el hipocótilo de soja es de aproximadamente el 37% en peso) y el resto en agua purificada. Este medio de iniciador se inoculó con un inóculo de la cepa 20-92 de *Lactococcus*, y se llevó a cabo un cultivo anaerobio con un paquete de gas a 37°C durante 24 horas para obtener un iniciador madre.

35 Preparación de iniciador a granel

40 Se preparó un medio de iniciador a granel mediante esterilización por UHT (temperatura ultra-alta) (140°C, 4 segundos) de 10 l de una disolución que contenía el 10% en peso de leche desnatada en polvo, el 6,67% en peso de nata fresca, el 0,1% en peso de extracto de levadura ("SK yeast extract Hi-K", Nippon Paper Chemicals Co., Ltd.),

el 0,025% en peso de hipocótilo de soja ("Soya Flavone HG", Fuji Oil Co., Ltd.) y el resto en agua purificada. El medio de iniciador a granel recuperado después de la esterilización por UHT se inoculó con el iniciador madre obtenido anteriormente hasta una cantidad del 1% v/v, y se llevó a cabo un cultivo aerobio a 37°C durante 24 horas para obtener un iniciador a granel.

5 Fermentación principal

10 Se preparó el medio de fermentación principal mediante esterilización por UHT (temperatura ultra-alta) (140°C, 4 segundos) de 10 l de una disolución que contenía el 10% en peso de leche desnatada en polvo, el 6,67% en peso de nata fresca, el 0,1% en peso de extracto de levadura ("SK yeast extract Hi-K", Nippon Paper Chemicals Co., Ltd.), el 0,025% en peso de hipocótilo de soja ("Soya Flavone HG", Fuji Oil Co., Ltd.) y el resto en agua purificada. El medio de fermentación principal recuperado después de la esterilización por UHT se inoculó con el iniciador a granel obtenido anteriormente hasta una cantidad del 1% v/v, y se llevó a cabo un cultivo aerobio a 37°C durante 24 horas para obtener una leche fermentada.

15 Llenado de recipiente

20 Se introdujo la leche fermentada obtenida mediante la fermentación principal anterior en un recipiente de esterilizador de 600 ml de capacidad de manera estéril, y se introdujo además en el recipiente una cantidad dada de ácido láctico de manera estéril; tras mezclar, se selló el recipiente.

2. Evaluación de la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada

25 Se almacenó cada una de las leches fermentadas selladas obtenidas anteriormente a 10°C durante 74 semanas. Se midió el pH de la leche fermentada inmediatamente después de la preparación, 2 semanas después de la preparación, 6 semanas después de la preparación y 74 semanas después de la preparación; además, se evaluó el recuento de células de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada, y la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada mediante métodos que son iguales a los del ejemplo 1. Además, también se midió el recuento de células de *Lactococcus garvieae*, y la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada para el iniciador madre y el iniciador a granel preparados anteriormente.

35 Los resultados se muestran en la tabla 3. Estos resultados revelan que cuando el pH de la leche fermentada fue de 4,6 o superior, podía prepararse leche fermentada que contenía *Lactococcus garvieae* que conservaba la capacidad de producción de ecul. Además, se observó que la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* se conservaba de manera estable durante 2 semanas si el pH de la leche fermentada era de 5,28 o superior, 6 semanas si el pH de la leche fermentada era de 5,79 o superior, y 74 semanas si el pH de la leche fermentada era de 5,92 o superior. Por otra parte, se reveló que se perdía la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* cuando el pH de la leche fermentada era de 4,09 y 3,53, incluso inmediatamente después de la preparación. Obsérvese que el recuento de células *per se* de *Lactococcus garvieae* en la leche fermentada permanecía constante durante un periodo de tiempo prolongado mientras que resultaba poco afectado por el pH, o la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecul.

45 Tabla 3

		Cantidad de ácido láctico añadido (cantidad de ácido láctico añadido al recipiente/cantidad de leche fermentada contenida en el recipiente)	pH	Recuento de células de <i>Lactococcus garvieae</i> (ufc/ml)	Capacidad de producción de ecul #1
Iniciador madre		-	5,94	$5,9 \times 10^8$	O
Iniciador a granel		-	6,08	$4,3 \times 10^8$	O
Leche fermentada	Inmediatamente después de la preparación	0 ml/500 g	6,06	$4,1 \times 10^8$	O
		6 ml/467,1 g	5,64	$3,4 \times 10^8$	O
		18,4 ml/459,4 g	5,12	$3,9 \times 10^8$	O
		35,5 ml/474,0 g	4,60	$2,5 \times 10^8$	O
		53,3 ml/463,4 g	4,09	$2,0 \times 10^8$	×
		96,6 ml/449,1 g	3,53	$1,5 \times 10^8$	×
	2 semanas después	0 ml/500 g	6,10	$4,9 \times 10^8$	O
		6 ml/467,1 g	5,85	$3,6 \times 10^8$	O
		18,4 ml/459,4 g	5,28	$3,4 \times 10^8$	×
		35,5 ml/474,0 g	4,63	$6,1 \times 10^7$	×
	6 semanas después	0 ml/500 g	5,99	$3,7 \times 10^8$	O
		6 ml/467,1 g	5,79	$3,2 \times 10^8$	O

		18,4 ml/459,4 g	5,24	$3,4 \times 10^8$	×
		35,5 ml/474,0 g	4,62	$2,5 \times 10^8$	×
	74 semanas después	0 ml/500 g	5,92	$2,3 \times 10^8$	O
		6 ml/467,1 g	5,72	$1,2 \times 10^8$	×

#1 La capacidad de producción de ecul se midió con n=3, y la determinación fue × cuando no se observó capacidad de producción de ecul en ninguno de los tres casos, y O cuando se observó capacidad de producción de ecul en los tres casos

5 Evaluación del gusto

La leche de fermentación (sin adición de ácido láctico) inmediatamente después de la preparación y la leche de fermentación (sin adición de ácido láctico) después de 74 semanas de almacenamiento fueron ambas satisfactorias como alimentos sin sabor agrio y, además, fáciles de beber.

10

Ejemplo 3: Preparación de leche fermentada mediante el segundo método, y evaluación de la leche fermentada

15 La preparación del iniciador madre, la preparación del iniciador a granel y la fermentación principal se llevaron a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 2 anterior, excepto que como medio de iniciador madre, medio de iniciador a granel y medio de fermentación principal, se usaron los preparados añadiendo cantidades dadas de los agentes que promueven la fermentación mostrados en la tabla 4 a un medio basado en la composición descrita a continuación.

20 <Composición del medio>

Leche desnatada en polvo	el 10% en peso
Nata fresca	el 6,67% en peso
Extracto de hipocótilo de soja ("Soya Flavone HG", Fuji Oil Co., Ltd.)	el 0,025% en peso
Agente que promueve la fermentación mostrado en la tabla 2	Concentración mostrada en la tabla 2
25 Agua purificada	Resto
Total	el 100% en peso

[Tabla 4]

	Medio de iniciador madre	Medio de iniciador a granel	Medio de fermentación principal
Condición A-1	0,1% en peso de extracto de levadura	0,1% en peso de extracto de levadura	0,1% en peso de extracto de levadura
Condición A-2	0,1% en peso de extracto de levadura	0,1% en peso de extracto de levadura	0,05% en peso de extracto de levadura
Condición A-3	0,1% en peso de extracto de levadura	0,1% en peso de extracto de levadura	0,025% en peso de extracto de levadura
Condición A-4	0,1% en peso de extracto de levadura	0,1% en peso de extracto de levadura	0,0125% en peso de extracto de levadura
Condición B	0,1% en peso de hidrolizado de suero de leche	0,1% en peso de hidrolizado de suero de leche	0,1% en peso de hidrolizado de suero de leche
Condición C	0,1% en peso de hidrolizado de caseína/levadura	0,1% en peso de hidrolizado de caseína/levadura	0,1% en peso de hidrolizado de caseína/levadura

30 Se usó el producto de nombre "SK yeast extract Hi-K" (fabricado por Nippon Paper Chemicals Co., Ltd.) para el extracto de levadura. Se usó "FE135" (fabricado por DMV Japan) para el hidrolizado de suero de leche. Se usaron "FE150" y "FE135" (fabricados por DMV Japan) para el hidrolizado de caseína/levadura.

35 Se introdujeron 500 g de leche fermentada obtenida de esta manera en un recipiente esterilizado de 600 ml de capacidad, y se almacenó a 10°C durante 10 semanas.

40 Inmediatamente después de la preparación, 2 semanas después de la preparación, 4 semanas después de la preparación y 10 semanas después de la preparación, se midió el pH de la leche fermentada; además, se evaluó el recuento de células de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada, y la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada mediante métodos que son iguales a los del ejemplo 1. Además, para el iniciador madre y el iniciador a granel, también se midió de la misma forma el recuento de células de *Lactococcus garvieae*, y la capacidad de producción de ecul de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada.

45

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. Estos resultados revelan que podía conservarse la capacidad de producción de ecuol de *Lactococcus garvieae* añadiendo extracto de levadura, hidrolizado de suero de leche o hidrolizado de caseína/levadura al medio. En particular, se encontró que si el medio contenía el 0,1% en peso o más de extracto de levadura o el 0,1% en peso o más de hidrolizado de caseína/levadura, podía conservarse la capacidad de producción de ecuol de *Lactococcus garvieae* en la leche fermentada a lo largo de un periodo de hasta 10 semanas o más.

5

Tabla 5

		Condición de almacenamiento	pH	Recuento de células de <i>Lactococcus garvieae</i> (ufc/ml)	Capacidad de producción de ecuol #1
Iniciador madre		Condición A-1 a A-5	5,64	$7,0 \times 10^8$	O
		Condición B	5,65	$5,2 \times 10^8$	O
		Condición C	5,66	$5,8 \times 10^8$	O
Iniciador a granel		Condición A-1 a A-5	6,02	$6,1 \times 10^8$	O
		Condición B	5,95	$7,0 \times 10^8$	O
		Condición C	6,05	$5,3 \times 10^8$	O
Leche fermentada	Inmediatamente después de la preparación	Condición A-1	6,00	$5,9 \times 10^8$	O
		Condición A-2	6,03	$5,8 \times 10^8$	O
		Condición A-3	6,11	$4,0 \times 10^8$	O
		Condición A-4	6,20	$2,3 \times 10^8$	O
		Condición B	5,93	$5,7 \times 10^8$	O
		Condición C	6,02	$4,6 \times 10^8$	O
	2 semanas después	Condición A-1	6,04	$3,9 \times 10^8$	O
		Condición A-2	6,07	$3,9 \times 10^8$	O
		Condición A-3	6,16	$2,8 \times 10^8$	O
		Condición A-4	6,24	$2,2 \times 10^8$	O
		Condición B	5,99	$5,0 \times 10^8$	O
		Condición C	6,08	$4,7 \times 10^8$	O
	4 semanas después	Condición A-1	5,99	$3,0 \times 10^8$	O
		Condición A-2	6,04	$3,0 \times 10^8$	O
		Condición A-3	6,12	$2,6 \times 10^8$	x
		Condición A-4	6,23	$2,1 \times 10^8$	x
		Condición B	5,95	$5,1 \times 10^8$	O
		Condición C	6,03	$4,8 \times 10^8$	O
	10 semanas después	Condición A-1	5,89	$2,8 \times 10^8$	O
		Condición A-2	6,03	$2,2 \times 10^8$	x
		Condición A-3	6,10	$1,9 \times 10^8$	x
		Condición A-4	6,20	$1,3 \times 10^8$	x
		Condición B	5,89	$3,4 \times 10^8$	x
		Condición C	5,98	$4,4 \times 10^8$	O

10 #1 La capacidad de producción de ecuol se midió con n=3, y la determinación fue x cuando no se observó capacidad de producción de ecuol, y O cuando se observó capacidad de producción de ecuol en los tres casos

Ejemplo comparativo 2: Preparación de leche fermentada y evaluación de la leche fermentada

15 La preparación del iniciador madre, la preparación del iniciador a granel y la fermentación principal se llevaron a cabo en las mismas condiciones que en el ejemplo 2, excepto que se realizó un cultivo aerobio en la preparación del iniciador madre.

20 Se midió el pH de la leche fermentada obtenida de esta manera; además, se evaluó el recuento de células de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada, y la presencia o ausencia de la capacidad de producción de ecuol de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada mediante métodos que son iguales a los del ejemplo 2. Además, para el iniciador madre y el iniciador a granel, también se midió de la misma forma el recuento de células de *Lactococcus garvieae* y la capacidad de producción de ecuol de *Lactococcus garvieae* contenido en la leche fermentada.

25 Como resultado, cuando el iniciador madre se preparó mediante fermentación aerobia en condiciones aerobias,

aunque se mantuvo la capacidad de producción de ecuol de *Lactococcus garvieae* en el iniciador madre, se perdió en última instancia la capacidad de producción de ecuol de *Lactococcus garvieae* en el producto de leche fermentada obtenido. Obsérvese que, aunque el iniciador madre se preparó mediante fermentación aerobia, el pH y el recuento de células de *Lactococcus garvieae* en la leche fermentada fueron del mismo orden que cuando el iniciador madre se preparó mediante fermentación anaerobia.

Ejemplo 4: Evaluación del efecto de conservación de la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol

1. Preparación de la composición que contiene microorganismos que producen ecuol

Se inoculó un inóculo de *Lactococcus garvieae* (cepa 20-92 de *Lactococcus*, FERM BP-10036) en 5 ml de medio GAM modificado (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), y se llevó a cabo un cultivo anaerobio con un paquete de gas a 37°C durante 24 horas. Entonces, se inocularon 50 ml de medio GAM modificado (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) con 2 ml del cultivo obtenido, y se llevó a cabo el cultivo anaerobio con un paquete de gas a 37°C durante 24 horas. Además, se inocularon 200 ml de medio GAM modificado (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) con 8 ml del cultivo obtenido, y se llevó a cabo el cultivo anaerobio con un paquete de gas a 37°C durante 24 horas.

Se centrifugó el cultivo obtenido (4.500 rpm x 15 minutos) para recuperar los cuerpos celulares, y las células obtenidas se añadieron a cada bebida de las composiciones mostradas en la tabla 6, de modo que la concentración de células fue de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml para preparar una composición que contiene un microorganismo que produce ecuol; entonces se dividió la composición en tubos de polipropileno de 15 ml de capacidad (fabricados por IWAKI) en alícuotas de 10 ml.

[Tabla 6]

	Composición
Bebida 1	Bebida ajustada a pH 4,5 añadiendo (ácido cítrico) a una disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco)
Bebida 2	Bebida en la que se añadió ácido ascórbico a una disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco) a una cantidad del 0,5% en peso, ajustada a pH 4,5 usando (ácido cítrico)
Bebida 3	Bebida en la que se añadió ácido ascórbico a una disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco) a una cantidad del 1,0% en peso, ajustada a pH 4,5 usando (ácido cítrico)
Bebida 4	Bebida en la que se añadió ácido ascórbico a una disolución de polvo de soja (que contenía el 14% de polvo de soja en peso seco) a una cantidad del 2,0% en peso, ajustada a pH 4,5 usando (ácido cítrico)

1. Evaluación de la capacidad de producción de ecuol después del almacenamiento

Se almacenó cada una de las composiciones que contienen microorganismos que producen ecuol obtenidas anteriormente a 10°C durante 21 días. Durante el periodo de almacenamiento, se realizaron evaluaciones de pH, recuento de células y capacidad de producción de ecuol para cada composición que contenía microorganismos que producen ecuol. El método para medir el recuento de células fue el mismo que en el ejemplo 1 anterior. Además, se analizó la capacidad de producción de ecuol mediante HPLC de la misma manera que en el ejemplo 1 anterior, y se calculó la tasa de conversión de ecuol según la siguiente fórmula.

[Mat. 1]

$$\text{Tasa de conversión de ecuol (\%)} = \left\{ \frac{\text{área de pico de ecuol}}{\text{área de pico total de daidzeína, dihidrodaidzeína y ecuol}} \right\} \times 100$$

En la tabla 7 se muestran los resultados de la medición del pH. Además, en la figura 1 se muestran los resultados de la medición del recuento de células, y en la figura 2 se muestran los resultados de la medición de la capacidad de producción de ecuol. Tal como queda claro a partir de la tabla 7, en todas las bebidas, el pH inmediatamente después de la preparación se mantuvo incluso cuando estaban almacenadas, y se mantuvo un entorno en el que no podían proliferar bacterias contaminantes dentro de las bebidas. Además, tal como queda claro a partir de la figura 1, con cada composición que contiene microorganismos que producen ecuol, se observó poca diferencia en el recuento de células viables durante el periodo de almacenamiento. Por otra parte, tal como se muestra en la figura 2, aunque la capacidad de producción de ecuol se perdió 14 días después del almacenamiento en la composición que contiene microorganismos que producen ecuol sin ácido ascórbico añadido, en las composiciones que contienen microorganismos que producen ecuol en las que se añadió ácido ascórbico, la capacidad de producción de ecuol se mantuvo incluso después de 21 días de almacenamiento. En particular, en las composiciones que contienen microorganismo que producen ecuol con el 1% en peso o el 2% en peso de ácido ascórbico, se encontró

que la capacidad de producción de ecuol se mantenía de manera extremadamente estable.

[Tabla 7]

	Número de días después del almacenamiento			
	0 días después	7 días después	14 días después	21 días después
Bebida 1	4,52	4,53	4,52	4,53
Bebida 2	4,48	4,50	4,49	4,50
Bebida 3	4,47	4,50	4,48	4,52
Bebida 4	4,46	4,47	4,46	4,48

Ejemplo 5: Evaluación del efecto de conservación de la capacidad de producción de ecuol del microorganismo que produce ecuol

#### 1. Preparación de la composición que contiene microorganismos que producen ecuol

Se obtuvo un iniciador madre mediante la inoculación de 5 ml de un medio que tenía la misma composición que el medio de iniciador madre usado en el ejemplo 1 con un inóculo de la cepa 20-92 de *Lactococcus*, y realizando un cultivo anaerobio con un paquete de gas a 37°C durante 96 horas.

A continuación, se inocularon 10 ml de un medio que tenía la misma composición que el medio de iniciador a granel usado en el ejemplo 1 con 0,2 ml del iniciador madre obtenido anteriormente, y se llevó a cabo un cultivo anaerobio durante 15 horas usando un paquete de gas a 37°C para obtener un iniciador a granel primario. Además, se inocularon 300 ml de un medio que tenía la misma composición que el medio de iniciador a granel usado en el ejemplo 1 con 6 ml del iniciador madre obtenido anteriormente, y se llevó a cabo un cultivo anaerobio durante 15 horas usando un paquete de gas a 37°C para obtener un iniciador a granel secundario.

A continuación, se inocularon 2.000 ml de un medio que tenía la misma composición que el medio de fermentación principal usado en el ejemplo 1 con 40 ml del iniciador a granel secundario obtenido anteriormente, y se llevó a cabo un cultivo estacionario a 37°C durante 15 horas en condiciones aerobias para obtener una disolución de soja fermentada.

Se añadieron seis tipos de antioxidantes a la disolución de soja fermentada obtenida, tal como se muestra en la tabla 8, para preparar un producto fermentado; después se llenaron por separado cubetas de papel con 130 g de disolución, y se sellaron con tapas de aluminio. Estas cubetas se almacenaron a 10°C, se abrieron 7 días después para medir el recuento de células de los microorganismos que producen ecuol, y se midió la capacidad de producción de ecuol de los mismos mediante métodos que son iguales a los del ejemplo 4.

[Tabla 8]

	Antioxidante	Concentración añadida en el producto fermentado	Nombre de producto del antioxidante y fabricante
Ejemplo 5	Ácido ascórbico	0,5% en peso	Ácido L-ascórbico (SIGMA)
Ejemplo comparativo 5-1	Extracto de arrayán	0,1% en peso	SANMELIN Y-AF (SAN-EI GEN F.F.I., Inc.)
Ejemplo comparativo 5-2	Rutina	0,1% en peso	SANMELIN A0-1007 (SAN-EI GEN F.F.I., Inc.)
Ejemplo comparativo 5-3	Extracto de romero	0,05% en peso	RM-21A base (MITSUBISHI-KAGAKU FOODS CORPORATION)
Ejemplo comparativo 5-4	Extracto de té	0,03% en peso	Sunfood 100 (MITSUBISHI-KAGAKU FOODS CORPORATION)
Ejemplo comparativo 5-5	Vitamina e	0,25% en peso	Extracto líquido de VE (MITSUBISHI-KAGAKU FOODS CORPORATION)

#### 2. Resultado de la evaluación

En la tabla 9 se muestra el resultado de la medición del recuento de células de microorganismos que producen ecuol, y en la tabla 10 se muestra el resultado de la medición de la capacidad de producción de ecuol. Al comienzo del almacenamiento, se observó capacidad de producción de ecuol en todos los casos en los que se mezcló

inhibidor de la oxidación. Sin embargo, 7 días después del almacenamiento, aparte del producto fermentado al que se le añadió ácido ascórbico, desaparecieron las capacidades de producción de ecuol en todos los casos.

[Tabla 9]

5

	Recuento de células de microorganismos que producen ecuol (UFC/ml)	
	A los 0 días de almacenamiento	A los 7 días de almacenamiento
Ejemplo 5	$3,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
Ejemplo comparativo 5-1	$3,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
Ejemplo comparativo 5-2	$3,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
Ejemplo comparativo 5-3	$4,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
Ejemplo comparativo 5-4	$3,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
Ejemplo comparativo 5-5	$4,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$

[Tabla 10]

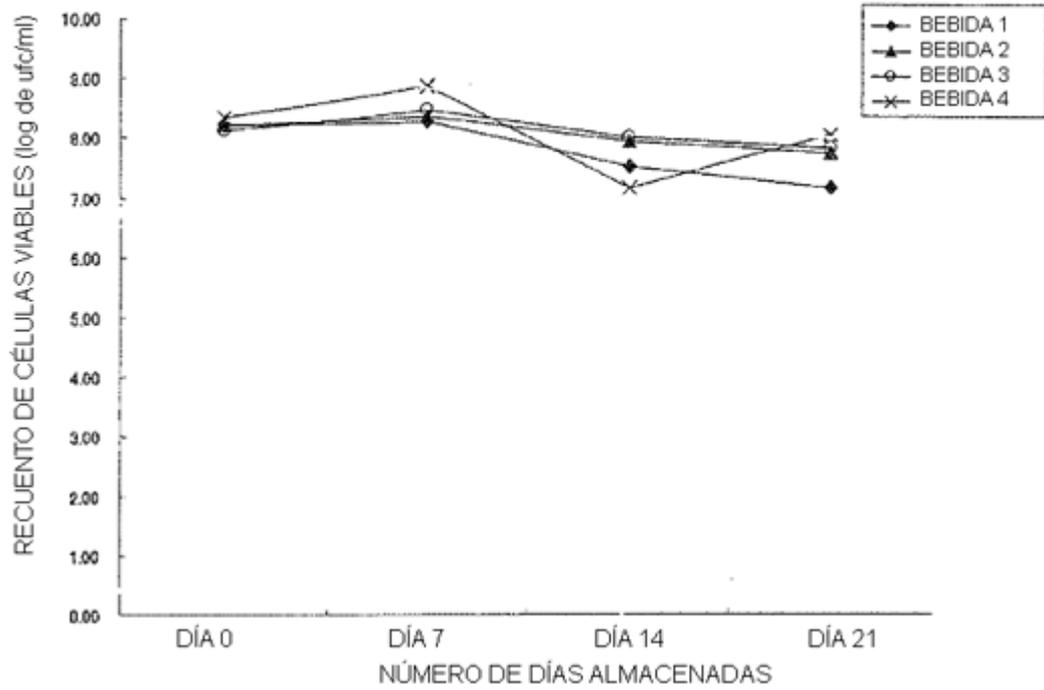
	Tasa de conversión de ecuol (%)	
	A los 0 días de almacenamiento	A los 7 días de almacenamiento
Ejemplo 5	98,5	100,0
Ejemplo comparativo 5-1	98,8	0,0
Ejemplo comparativo 5-2	98,6	0,0
Ejemplo comparativo 5-3	98,2	0,0
Ejemplo comparativo 5-4	97,8	0,0
Ejemplo comparativo 5-5	98,9	0,0

10

## REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene microorganismos que producen ecuol que contiene (A) un microorganismo que produce ecuol en un estado de una célula viva, y (B) al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, derivados del mismo y sales del mismo, en la que el componente (B) está contenido en una proporción de mezclado del 0,05 al 5% en peso, en la que la composición que contiene microorganismos que producen ecuol comprende un material fermentado que se fermentó usando un microorganismo que produce ecuol como el microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, y en la que el derivado de ácido ascórbico es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en 2,6-dipalmitato de ascorbilo, 6-estearato de ascorbilo, 2-fosfato de ascorbilo, 2-sulfato de ascorbilo, 2-glucósido de ascorbilo, ascorbil-glucosamina, 6-palmitato de ascorbilo, tetra-isopalmitato de L-ascorbilo y tetra-2-hexildecanoato de ascorbilo.  
5  
10
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el pH de la misma es de 5,0 o menor.  
15
3. Composición según la reivindicación 1, que es una bebida de soja fermentada o una leche de soja fermentada.  
20
4. Composición según la reivindicación 1, en la que el microorganismo que produce ecuol es una bacteria del ácido láctico.  
25
5. Composición según la reivindicación 1, en la que el microorganismo que produce ecuol es *Lactococcus garvieae*.  
30
6. Método para mantener la capacidad de producción de ecuol de un microorganismo que produce ecuol, comprendiendo el método: añadir al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, derivados del mismo, y sales del mismo a una composición que contiene un microorganismo que produce ecuol, en el estado de una célula viva, en el que la composición que contiene un microorganismo que produce ecuol comprende un material fermentado que se fermentó usando un microorganismo que produce ecuol como el microorganismo que produce ecuol en el estado de una célula viva, y en el que el derivado de ácido ascórbico es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en 2,6-dipalmitato de ascorbilo, 6-estearato de ascorbilo, 2-fosfato de ascorbilo, 2-sulfato de ascorbilo, 2-glucósido de ascorbilo, ascorbil-glucosamina, 6-palmitato de ascorbilo, tetra-isopalmitato de L-ascorbilo y tetra-2-hexildecanoato de ascorbilo.  
35

[FIG.1]



[FIG.2]

