

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2016/201536 A1

(43) Data de Publicação Internacional
22 de Dezembro de 2016 (22.12.2016) **WIPO | PCT**

(51) Classificação Internacional de Patentes :

A23C 11/10 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A23L 11/00 (2016.01) C07D 311/06 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01) C12N 9/18 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01) C12R 1/46 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) C12R 1/23 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :

PCT/BR2016/000024

(22) Data do Depósito Internacional :

3 de Março de 2016 (03.03.2016)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :

BR 10 2015 014499 7
18 de Junho de 2015 (18.06.2015) BR

(71) Requerente : **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP** [BR/BR]; rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131, Campinas - SP - CEP 13083-970 (BR).

(72) Inventores : **MACEDO, Gabriela Alves**; rua Monteiro Lobato, 80, Campinas - SP CEP: 13083-970 (BR). **MACEDO, Juliana Alves**; rua ENG. Humberto Soares de Camargo, 404, Cidade Universitária - Distrito de Barão

Geraldo, Campinas - SP - CEP: 13083-740 (BR). **DE QUEIRÓS, Livia Dias**; rua Maria Rita Alves, 127, Centro, Paula Candido - MG - CEP: 36544-000 (BR).

(74) Mandatário : **SILVADO, Fernanda Lavras Costallat**; rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131, Campinas - SP - CEP 13083-970 (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : BIOTRANSFORMATION METHOD FOR TRANSFORMING PHENOLIC COMPOUNDS FROM SOY EXTRACT INTO EQUOL AND BIOACTIVE ISOFLAVONES BY FERMENTATION AND/OR ENZYMATIC APPLICATION, THUS OBTAINED COMPOSITION AND USE

(54) Título : PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO DE SOJA EM EQUOL E ISOFLAVONAS BIOATIVAS ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO E/OU APLICAÇÃO ENZIMÁTICA, COMPOSIÇÃO ASSIM OBTIDO E USO

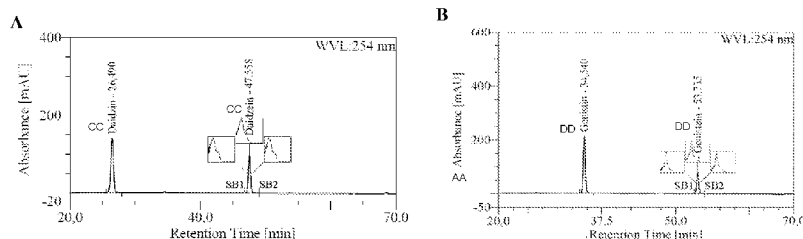


Figura 1

(57) Abstract : The present invention relates to a biotransformation method for transforming phenolic compounds from soy milk into bioactive isoflavones and equol, with a high yield and production volume, for use in the biotechnological field, mainly in the food industry. The invention allows the glycosylated forms of isoflavones (daidzin and genistin) to be biotransformed into the respective aglycone forms (daidzein and genistein) by fermentation of soy milk with initiator cultures and probiotic lactic bacteria, and/or by treatment of the extract with the enzyme tanase from *Paecilomyces variotti*. In one of the embodiments, the present invention relates to an *in vitro* method for producing bioactive equol in the absence of intestinal bacteria, using only enzymatic biotransformation.

(57) Resumo : A presente invenção refere-se a um processo de biotransformação de compostos fenólicos de extrato hidrossolúvel de soja em isoflavonas bioativas e equol com alto rendimento e alta produção para aplicação na área bioecnológica, principalmente para a Indústria alimentícia. A Invenção foi capaz de biotransformar as formas glicosiladas (daidzina e genistina) das Isoflavonas em suas respectivas formas aglilconas (daidzeina e genisteina) através de fermentação

(Continua na página seguinte)



WO 2016/201536 A1



Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

do extrato hidrossolúvel de soja com culturas Iniciadoras e bactérias lácticas probióticas e/ou tratamento do referido extrato com a enzima tanase obtida de *Paecilomyces variotti*. Em uma de suas concretizações, a presente invenção resulta em um processo *in vitro* para a obtenção de equol bioativo, sem a presença de bactérias intestinais, utilizando apenas biotransformação enzimática.

**“PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
DO EXTRATO DE SOJA EM EQUOL E ISOFLAVONAS BIOATIVAS
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO E/OU APLICAÇÃO ENZIMÁTICA,
COMPOSIÇÃO ASSIM OBTIDO E USO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a um processo de biotransformação de compostos fenólicos de extrato hidrossolúvel de soja em isoflavonas bioativas e equol com alto rendimento e alta produção; composição assim obtido e uso.

[002] O presente processo tem aplicação na área biotecnológica, principalmente para a indústria alimentícia, como ingrediente alimentar, e indústria de nutricosméticos e suplementos dietéticos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A principal aplicação da presente invenção consiste na biotransformação de compostos fenólicos de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) para obtenção de produto rico em compostos bioativos. O propósito é aumentar o conteúdo de isoflavonas bioativas (agliconas) e produzir equol em extrato de soja através da aplicação de culturas iniciadoras e bactérias lácticas probióticas na fermentação do EHS, aliado à ação do extrato bruto de tanase obtido a partir de *Paecilomyces variotti*.

[004] A presente invenção proporciona uma composição sob a forma de um ingrediente alimentício, o qual contém alto teor de isoflavonas bioativas e equol biodisponíveis.

[005] Outro possível uso é o da bioatividade do extrato hidrossolúvel de soja antes e após biotransformação com o extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* para modelos anti-inflamatórios e de quimioprevenção.

[006] Além disso, também é interessante a atuação do extrato semipurificado de tanase de *P. variotii* em outras classes de flavonoides glicosilados em alimentos com grande quantidade de flavonoides na forma glicosilada.

[007] O documento de patente US8765445B2 refere-se a um processo empregando cepas de *Lactobacillus* no processo para produção de produto para consumo direto, ressaltando-se que este processo já se encontra em fase comercial.

[008] O documento de patente WO2012033150 refere-se à produção de equol por fermentação em meio de fermentação complexo com adição de daizeína em

meio gasoso. O processo usa a cepa de *Streptococcus*. Este documento ensina que o uso de hidrogênio na fermentação aumenta a produção de equol. O processo de acordo com este documento é adequado para produção industrial, obtendo-se alto rendimento de isoflavonas.

[009] O documento de patente US20120094336 descreve a produção de equol sem mistura racêmica, por síntese química. Descreve a síntese por catalisadores químicos específicos para produção do isômero preferencial de tipo S.

[0010] O documento de patente US20110189134 descreve a produção de uma bebida fermentada à base de leite de soja, com adição de *Lactobacillus* vivos para produzir equol durante o tempo de prateleira (shelf life) do produto. O processo de acordo com os ensinamentos deste documento já se encontra em escala industrial. Destaca-se, ainda, que a adição de ácido ascórbico para a manutenção da produção é descrita.

[0011] O documento de patente JP2011083273 descreve um processo de produção de isoflavonas de soja e equol por fermentação utilizando *Lactococcus* isolados do produto japonês ekuoru. O processo de acordo com este documento se vale do uso de bactérias lácticas (*Lactococcus garviaes*).

[0012] O documento de patente US2013231291 descreve a produção de extrato de isoflavonas, equol e lunasil peptideo por fermentação utilizando bactérias lácticas isoladas. O processo de acordo com este documento tem como foco o uso em cosméticos.

[0013] O documento de patente CN102021130 descreve o uso de *Clostridium bifermentans* zx-7 para a produção de equol por fermentação.

[0014] O documento de patente TW200712211 revela a produção de equol com uma coleção de microorganismos da flora intestinal encontrados na flora intestinal humana.

[0015] O documento de patente CN104031875 traz a produção de equol por bactéria modificada geneticamente a partir de *Lactococcus*.

[0016] Ressalta-se que os processos descritos no estado da técnica são, em majoritariamente baseados em processos fermentativos, utilizando cepas de *Lactobacillus* (bactérias entéricas) diferentes, isoladas ou em grupos. Alguns dos documentos fazem a fermentação com os meios de cultivo sintéticos, adicionando o precursor de equol daizeina, outros formulam o meio de cultivo com leite de soja, estratégia também utilizada na presente invenção.

[0017] Já a presente invenção se vale de processos distintos que são diferentes dos anteriormente descritos no estado da técnica. Um deles utiliza uma mistura de *Lactobacillus* (estratégia também utilizada no estado da técnica), com o diferencial de utilizar uma enzima isolada de fungo à tanase, um efeito técnico novo e inventivo.

[0018] Em um dos processos de acordo com a presente invenção utiliza-se somente um tratamento enzimático, outro efeito técnico novo e inventivo. Destaca-se que o preparado enzimático de acordo com a presente invenção (de fungo, outro efeito aspecto inovador) não é purificado e possui tanto enzimas conhecidas quanto ainda desconhecidas. Este é um processo novo, não tendo sido encontrado qualquer relato ou sugestão neste sentido no estado da técnica.

[0019] A enzima de acordo com a presente invenção foi extraída de fungo GRAS, que pode ser usado em alimentos.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0020] O presente invento consistiu no desenvolvimento de processos biotecnológicos in vitro capazes de biotransformar as isoflavonas em suas formas bioativas e aumentar o teor de equol em extrato hidrossolúvel de soja através da fermentação deste substrato por bactérias iniciadoras e bactérias ácido lácticas probióticas e aplicação da enzima tanase, obtida a partir de *Paecilomyces variotti*, composição assim obtido e uso na indústria alimentícia, como ingrediente alimentar, e indústria de nutricosméticos e suplementos dietéticos.

[0021] Após os processos de biotransformação, obteve-se um ingrediente alimentar derivado de soja que apresentou grande teor de isoflavonas bioativas e equol, demonstrando, assim, que os processos biotecnológicos desenvolvidos consistiram em estratégias eficientes para melhorar o potencial bioativo do extrato de soja e demonstraram um potencial de aplicação do equol como agente nutracêutico para populações não produtoras deste isoflavonoide.

[0022] Produtos à base de soja são uma forma de incluir substâncias bioativas como as isoflavonas na dieta, sendo que o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) é um substrato que tem se apresentado com potencial para produção de novos alimentos com apelo saudável. Desse modo, com o propósito de aumentar o conteúdo de isoflavonas bioativas e avaliar a viabilidade de um processo biotecnológico para produção de equol in vitro, foi desenvolvido o processo

descrito neste documento. Foi investigada a aplicação de culturas iniciadoras e bactérias lácticas probióticas na fermentação do EHS, aliado à ação do extrato bruto de enzima tanase obtido a partir do fungo *Paecilomyces variotti*. Além disso, também foi avaliada a biotransformação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do produto obtido. O teor de fenóis totais foi avaliado por metodologia baseada na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante pelos métodos in vitro ORAC e de sequestro de radicais DPPH e a especificidade do extrato semipurificado de tanase frente aos padrões comerciais de isoflavonas, bem como as alterações no perfil fenólico do extrato hidrossolúvel de soja foram avaliadas por CLAE-DAD. Após o processo fermentativo e/ou tratamento enzimático do extrato hidrossolúvel de soja, houve um significativo aumento no teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante, por ambos métodos testados (ORAC e DPPH), quando comparados com o controle de EHS sem reação. Além disso, foi verificada uma modificação no perfil polifenólico das amostras de EHS biotransformadas obtido por CLAE-DAD, resultando em um aumento na concentração das formas agliconas em relação às glicosiladas, bem como o aumento da concentração de equol após os processos de biotransformação propostos. Os resultados obtidos, indicam que o extrato de tanase de *P. variotty* foi capaz de biotransformar as formas glicosiladas (daidzina e genistina) das isoflavonas em suas respectivas formas agliconas (daidzeína e genisteína). Pelo que se tem conhecimento, a hidrólise de isoflavonóides glicosilados por tanase, bem como a formação de equol, é um relato inédito na literatura demonstrando que é possível desenvolver um processo in vitro para a obtenção deste composto bioativo, sem a presença de bactérias intestinais, utilizando apenas uma biotransformação enzimática.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS.

A **Figura 1** apresenta cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da reação dos padrões de isoflavonas glicosiladas (A) daidzina e (B) genistina com extrato semipurificado de tanase de *Paecilomyces variotti* a 40° C por 30 minutos.

A **Figura 2** apresenta cromatogramas obtidos por HPLC-DAD do (A) EHS padrão, (B) EHS fermentado, (C) EHS fermentado reagido com 1,8 U de tannase e (D) EHS padrão reagido com 1,8 U de tannase a 40° C por 30 minutos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0023] A presente invenção refere-se ao processo de biotransformação de compostos fenólicos do extrato solúvel de soja para obtenção de produto rico em equol e isoflavonas bioativas através de fermentação com bactérias iniciadoras e bactérias ácido lácticas probióticas e aplicação da enzima tanase; composição assim obtido e uso. Para tanto, o processo pode utilizar formas biotransformação que compreendem na aplicação de cepas de bactérias iniciadoras e bactérias ácido lácticas probióticas e/ou reação com a enzima tanase de *Paecilomyces variotti* em hidrossolúvel de soja.

[0024] O processo compreende as etapas descritas a seguir:

- A. Macerar os grãos de soja íntegros a temperatura ambiente em água destilada (grãos de soja/água; 1:3 p/v);
- B. Descartar a água utilizada para maceração;
- C. Adicionar água destilada;
- D. Aquecer os grãos em água entre 90 a 110°C, preferencialmente a 100°C, (grãos de soja/água; 1:2 p/v) por 3 a 10 minutos, preferencialmente 5 minutos;
- E. Adicionar água destilada
- F. Triturar os grãos de soja com água destilada (grãos de soja/água; 1:4 p/v);
- G. Centrifugar a massa obtida entre 9000 a 10000 x g, preferencialmente 9630 x g, por 10 a 20 minutos, preferencialmente 15 minutos a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$);
- H. Aquecer o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) até ebulição entre 96 °C e 100°C por 10 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos;
- I. Esterilizar por aquecimento a temperatura de 121 °C, durante 15 a 20 minutos, preferencialmente 15 minutos;
 - a. Manter o extrato hidrossolúvel de soja estéril sob refrigeração a 4 a 12°C, por até 10 dias, ou congelar o extrato a -80°C até sua utilização;
- J. Realizar os processos de biotransformação do extrato hidrossolúvel de soja que podem ser realizados por qualquer uma das seguintes formas:

Processo 1 - Biotransformação fermentativa: Bactéria iniciadoras *Streptococcus ssp. Thermophilus* (YF-L811) e *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (LB-340) e bactérias ácido lácticas

probióticas *Bifidobacterium animales ssp. Lactis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05);

- i. Inocular as culturas iniciadoras na concentração de 0,5 – 2% (v/v), preferencialmente 1% (v/v), e de bactérias ácido lácticas probióticas na concentração de 5 a 15% (v/v), preferencialmente 5% (v/v), e contagem mínima de 10^6 - 10^7 log UFC/mL e máxima de 10^{14} log UFC/mL no EHS obtido em (I); e
- ii. Incubar a solução obtida em (i) entre 30 e 40°C, preferencialmente a 37°C, por 10 a 24 horas, preferencialmente 12 horas, em condições de anaerobiose;

Processo 2 – Biotransformação fermentativa seguida por enzimática

- i. Inocular as culturas iniciadoras na concentração de 0,5 - 2% (v/v), preferencialmente 1% (v/v), e de bactérias ácido lácticas probióticas na concentração de 5 - 15% (v/v), preferencialmente a 5% (v/v), e contagem mínima de 10^6 - 10^7 log UFC/mL e máxima de 10^{14} log UFC/mL no EHS obtido em (I);
- ii. Incubar ao EHS com as culturas obtida em (i) entre 30 e 40°C, preferencialmente a 37°C, por 10 a 24 horas, preferencialmente 12 horas, em condições de anaerobiose;
- iii. Inocular em solução obtida em (ii) com 1 a 5 U de tanase, preferencialmente 1,8 U de tanase, por 1ml de EHS fermentado (ii);
- iv. Incubar a solução de (iii) entre 35 a 45°C, preferencialmente 40°C, por 20 a 50 minutos, preferencialmente 30 minutos; e
- v. Incubar a solução de (iv) entre -2 a 2°C, preferencialmente 0°C (em banho de gelo) por 10 a 30 min, preferencialmente 15 minutos;

Processo 3 – Biotransformação enzimática

- i. Inocular em EHS obtida em (I) com 1 a 5 U de tanase, preferencialmente 1,8 U de tanase, por 1ml de EHS (I);

- ii. Incubar a solução em (i) entre 35 a 45°C, preferencialmente 40°C, por 20 a 50 minutos, preferencialmente 30 minutos; e
- iii. Incubar a solução de (ii) entre -2 a 2°C, preferencialmente 0°C (em banho de gelo) por 10 a 30 min, preferencialmente 15 minutos;

K. Manter o produto EHS com isoflavonas bioativas e equol congelado a -80°C.

[0025] As composições obtidas do processo descrito compreendem as características segundo o tipo de biotransformação conforme a tabela 1 abaixo e têm aplicação na indústria alimentícia, como ingrediente alimentar, e indústria de nutricosméticos e suplementos dietéticos.

Tabela 1: Composições obtida a partir do processo descrito

Produtos	Tipo de Biotransformação	Conteúdo de isoflavonoides (µg/mL)		
		Agliconas		Equol
		Daidzeína	Genisteína	
1	<i>Biotransformação fermentativa</i>	91,4 ^b ± 1,9	52,3 ^b ± 2,0	0,31 ^b ± 0,0008
2	<i>Biotransformação fermentativa seguida por enzimática</i>	717,2 ^c ± 11,0	251,4 ^c ± 6,9	0,63 ^c ± 0,0142
3	<i>Biotransformação enzimática</i>	944,5 ^d ± 0,9	321,6 ^d ± 0,8	0,82 ^d ± 0,0104

Exemplificação

Preparo do extrato hidrossolúvel de soja

[0026] O extrato hidrossolúvel de soja foi preparado de acordo com metodologia descrita por Mandarino e Carrão-Panizzi (1999). Foram utilizados grãos de soja (*Glycine max*) da marca "Natu's".

[0027] O processo pode ser representado pelas etapas a seguir:

1. Macerar os grãos de soja íntegros por 6 horas a temperatura ambiente em água destilada em água destilada (grãos de soja/água; 1:3 p/v).
2. Descartar a água utilizada para maceração

3. Ferver grãos em água (grãos de soja/água; 1:2 p/v) por cinco minutos.
4. Triturar os grãos de soja com auxílio de liquidificador, com água destilada (grãos de soja/água; 1:4 p/v) por 3 minutos.
5. Centrifugar a massa obtida a 9630 x g por 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Aquecer o sobrenadante obtido, conhecido como extrato hidrossolúvel de soja, até ebulição por 10 minutos.
7. Distribuir o extrato de soja em frascos e esterilizar por aquecimento a 121 °C durante 15 minutos.
8. Manter o extrato hidrossolúvel de soja estéril sob refrigeração até sua utilização nas análises.

Obtenção de extrato semipurificado de tanase

[0028] A enzima tanase (E.C: 3.1.1.20), obtida a partir do microorganismo *Paecilomyces variotii*, como descrito por Battestin e Macedo (2007a), foi utilizada neste estudo.

Este processo pode ser representado pelas etapas a seguir:

- a) Adicionar, em erlenmeyers de 250 mL, 10 g de farelo de trigo (Natu's, Hortolândia, Brasil), 10 mL de água destilada e 10% de ácido tânico (p/p) (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil)
- b) Esterilizar o meio de cultura a 121 °C por 15 minutos.
- c) Inocular 2,5 mL ($5,0 \times 10^7$ esporos/mL) da suspensão de pré-inóculo em água destilada
- d) Incubar o meio a 30 °C por 120 horas.
- e) Adicionar 80 mL de tampão acetato (20 mM, pH 5,0) ao meio.
- f) Agitar o meio a 200 rpm por 1 hora.
- g) Filtrar a solução final e centrifugar a 9630 x g por 30 minutos a 4 °C (Centrífuga Beckman J2-21, Beckman-Coulter, INC Fullerton, CA, USA).
- h) Adicionar, ao sobrenadante, sulfato de amônio (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo, Brasil) em concentração final de 80% de saturação (561 g/L).
- i) Manter sob refrigeração por 12 horas a 4 °C.
- j) Recolher o precipitado formado por centrifugação a (9630 x g por 30 minutos) e ressuspender o mesmo em água destilada
- k) Dialisar por 48 horas em água destilada.

- l) Congelar a -18°C e liofilizar, em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras Ind. Com. Serv. Liofilizadores Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil), durante 24 horas.
- m) Manter o extrato semipurificado liofilizado a -18°C .

Determinação de atividade enzimática

[0029] A medida de atividade enzimática do extrato semipurificado de tanase foi realizada de acordo com metodologia proposta por Battestin & Macedo (2007b). O substrato consistiu em uma solução de ácido tânico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) 0,7% (p/v) em tampão acetato (0,2 M, pH 5,5). Para a realização da reação foram seguidos os seguintes passos:

- a) Adicionar 0,3 mL da solução de substrato a 0,5 mL de extrato de enzima.
- b) Incubar a 60°C durante 10 minutos.
- c) Paralisar a reação pela adição de 3 mL de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1,0 mg/mL preparada em solução de cloreto de sódio 0,17 M em tampão acetato (0,2 M, pH 5,0).
- d) Filtrar e centrifugar a solução a $10.070 \times g$ por 15 min a 4°C .
- e) Dissolver o precipitado a 3 mL em SDS-triethanolamina
- f) Adicionar 1 mL do reagente FeCl_3 .
- g) Manter em repouso por 15 minutos para a estabilização da cor.
- h) Medir a absorbância a 530 nm (Mondal, Banerjee, Jana, & Pati, 2001).
- i) Calcular a atividade enzimática por $\text{Abs}_{530} = \text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{teste}}$.

Uma unidade de atividade de tanase foi definida como a quantidade de ácido tânico hidrolisado por 1 mL de enzima por minuto de reação.

Biotransformação enzimática dos isoflavonoides

[0030] Os padrões comerciais de isoflavonoides genistina, daidzina, genisteína e daidzeína (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram utilizados como substrato para hidrólise enzimática por tanase isolada a partir de *Paecilomyces variotti* (Battestin & Macedo, 2007a).

[0031] Este processo pode ser representado pelas etapas a seguir:

- a) Dissolver 1 mg dos padrões de isoflavonoides em 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4, 75 mM).
- b) Incubar a solução com 0,18U de tanase, por 30 minutos a 4°C em banho termostaticado (modelo B12D, Micronal, São Paulo, Brasil).
- c) Paralisar o processo de hidrólise em banho de gelo por 15 minutos.

- d) Avaliar, por HPLC-DAD, os produtos finais dos padrões de isoflavonoides.

Processos de biotransformação do extrato hidrossolúvel de soja

Processo 1 - Biotransformação fermentativa

[0032] Foram utilizadas culturas comerciais liofilizadas (Christian Hansen Lab. Ind. e Com. Ltda) de culturas iniciadoras *Streptococcus ssp. Thermophilus* (YF-L811) e *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (LB-340) e bactérias ácido lácticas probióticas *Bifidobacterium animales ssp. Lactis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05). Todas as culturas liofilizadas foram reativadas, individualmente, em extrato hidrossolúvel de soja estéril a 37°C por 12 horas em condições de anaerobiose utilizando uma jarra de anaerobiose. As culturas iniciadoras foram inoculadas na concentração de 1% (v/v) e as bactérias ácido lácticas probióticas na concentração de 5% (v/v), garantindo uma contagem mínima de $10^6 - 10^7$ log UFC/mL (Cruz et al., 2013).

[0033] A fermentação do extrato hidrossolúvel de soja fermentado foi conduzida de acordo com metodologia tradicional (Tamime e Robinson, 2007) de acordo com as seguintes etapas:

- a) Inocular, assepticamente, o extrato hidrossolúvel de soja estéril com o conteúdo total de cada cultura bacteriana reativada.
- b) Incubar o EHS inoculado a 37°C por 24 horas em condições de anaerobiose utilizando uma jarra de anaerobiose.

As amostras do EHS fermentado foram avaliadas quanto ao perfil químico (teor de fenóis totais e HPLC) e capacidade antioxidante (ORAC e DPPH).

Processo 2 – Biotransformação fermentativa seguida por enzimática

[0034] O EHS fermentado (1 mL), obtido no processo 1, foi inoculado com 1,8 U de tanase, a 40°C por 30 minutos. O processo de hidrólise foi paralisado em banho de gelo por 15 minutos.

[0035] As amostras do EHS biotransformadas foram avaliadas quanto ao perfil químico (teor de fenóis totais e HPLC) e capacidade antioxidante (ORAC e DPPH).

Processo 3 – Biotransformação enzimática

[0036] O EHS não fermentado (1 mL) foi inoculado com 1,8 U de tanase, a 40°C por 30 minutos. O processo de hidrólise foi paralisado em banho de gelo por 15 minutos.

[0037] As amostras do EHS biotransformados foram avaliadas quanto ao perfil químico (teor de fenóis totais e HPLC) e capacidade antioxidante (ORAC e DPPH).

Avaliação do perfil químico

Teor de fenólicos totais

[0038] O teor de fenólicos totais nas amostras foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil) de acordo com o método de Chandler and Doods (1983), com algumas modificações.

[0039] Este processo pode ser representado pelas etapas a seguir:

- a) Diluir uma alíquota de 1 mL das amostras, na proporção de 1:5, com metanol 70%.
- b) Adicionar 5 mL de água destilada, seguido por 0,5 mL de reagente de Folin-fenol Ciocalteu 1 M (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil).
- c) Agitar as amostras.
- d) Manter em repouso por 5 minutos.
- e) Adicionar 1 mL de solução de carbonato de sódio 5% (m/v) ao meio reacional de cada amostra.
- f) Agitadas e incubar as amostras no escuro a temperatura ambiente por 1 hora.
- g) Agitar novamente as amostras.
- h) Realizar leitura das absorbâncias a 725 nm em espectrofotômetro (modelo DU®640, Beckman Coulter™, EUA).

As concentrações de fenólicos totais foram determinadas por comparação de absorbância das amostras com uma curva de calibração utilizando catequina como padrão. Os resultados foram expressos em µg de catequina por mL de amostra.

Análise dos isoflavonoides por HPLC

[0040] As isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina), agliconas (daidzeína e genisteína) e equol foram identificados e quantificados em todas as amostras por HPLC-DAD.

[0041] A extração dos isoflavonoides das amostras do extrato de soja foi realizada de acordo com metodologia proposta por Aguiar (2003), com modificações de acordo com as seguintes etapas:

- a) Misturar 1 mL das amostras dos extratos de soja biotransformados com 5 mL de metanol 70% a 25°C, por 60 minutos, a 100 rpm.
- b) Centrifugar a mistura por 10 minutos a 5790 x g.
- c) Filtrar o sobrenadante através de uma membrana de 0,45 µm, antes de ser injetado num HPLC de fase invertida.

[0042] As condições cromatográficas utilizadas foram previamente descritas por Park et al. (2001). Foi utilizado o equipamento Dionex Ultimate 3000 (Alemanha) equipado com uma coluna C18 Atlantis® (Waters, 5 µm, 4,6 x 150 mm) mantida a 30°C. A detecção foi realizada utilizando um detector de arranjo de diodos UV/VIS (DAD-3000). As fases móveis consistiram em água deionizada (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente de eluição foi o seguinte: 20% B (0-15 min), 20-80% B (15-75min), 80-100% B (75-80min), 100-20% B (80-90 min) e 20% B (90-95 min) com vazão de 0.5 mL/min. O volume de injeção de amostra foi de 20 µL e todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os espectros foram obtidos entre 190 e 480 nm e os cromatogramas processados a 254 nm.

[0043] Os isoflavonóides foram identificados individualmente por comparação dos seus tempos de retenção e o espectro dos seus padrões: daidzina, genistina, daidzeína, genisteína e equol. A quantificação individual dos isoflavonóides foi realizada por integração das áreas dos picos utilizando curvas de calibração que foram estabelecidas no intervalo de concentração de 0,01-1,0 mg/mL dos padrões de isoflavonas e equol. Os resultados foram expressos em µg de cada composto fenólico por mL de amostra.

Atividade antioxidante dos polifenóis do extrato de soja biotransformado

Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

[0044] A determinação da capacidade antioxidante pelo método do ORAC foi realizada conforme metodologia descrita por Macedo et al. (2011), utilizando fluoresceína (FL) como sinalizador. O teste automatizado de ORAC foi realizado em leitor de microplacas Fluostar Optima (Fluostar Optima - Labtech BMG, Alemanha) com filtros de fluorescência para um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm. As medidas foram realizadas em placas pretas opacas Costar® (Corning Costar Corporation, Cambridge, EUA) com 96 poços.

Antes da reação várias etapas de preparo das soluções devem ser seguidas:

- a) Decompor, a 37°C, o AAPH (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidroclorato) em tampão fosfato (75 mM, pH 7,4). Obs: tal fato ocorre devido à sensibilidade da FL ao pH.
- b) Preparar diariamente a solução de FL (70 nM), em tampão de fosfato (PBS) (75 mM, pH 7,4).
- c) Armazenar no escuro.
- d) Preparar (diariamente) em PBS uma solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxylic acid) 75 µM (utilizada como padrão de referência).
- e) Construir uma curva padrão de Trolox diluindo a solução de 1,5-1500 µmol/mL.

A reação foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

- a) Diluir 1 ml de cada amostra utilizando metanol 70% na proporção de 1:5.
- b) Misturar, em cada poço, 120 µL de solução FL com 20 µL de amostra, branco (PBS) ou solução padrão (Trolox).
- c) Adicionar 60 µL de AAPH (12 mM).
- d) Realizar, em triplicata e a cada 6 minutos durante 87 minutos, a medida da fluorescência imediatamente após a adição do AAPH

[0045] Os valores de ORAC foram definidos como sendo a diferença entre a área sob a curva de decaimento de FL e do branco (net AUC). Equações de regressão entre net AUC e concentração de antioxidantes foram calculadas para todas as amostras. Um controle de tanase foi realizado como uma amostra regular, e o valor de ORAC obtido foi subtraído das amostras tratadas com esta enzima. Os valores de ORAC-FL foram expressos em µmol equivalente de Trolox/L de extrato de soja.

Sequestro dos radicais livres do DPPH

[0046] O potencial de atividade antioxidante do extrato hidrossolúvel de soja, fermentado e não fermentado, também foi avaliado pela atividade de sequestro do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), como descrito por Macedo et al. (2011).

- a) Preparar várias concentrações (0,01-0,1 mg/mL em metanol 70% (v/v)) de amostras testadas.
- b) Misturar 50 µL das amostras testes com 150 µL de DPPH 0,2 mM em metanol) em placas de 96 poços (BMG LABTECH 96, Alemanha),

- c) Realizar a leitura em um leitor de microplacas Fluostar Optima (BMG Fluostar Optima - Labtech, Alemanha) com filtros de absorção para um comprimento de onda de excitação de 520 nm.

[0047] O processo de decaimento da cor das amostras foi registrado depois de 90 minutos de reação e comparado com um branco controle; para as amostras de cores e amostras tratadas com tanase, foi realizado um controle adicional, que continha a solução de extrato (ou solução de tanase) e metanol puro, em vez de DPPH. As soluções foram preparadas e armazenadas no escuro. As medidas foram realizadas em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada a partir da equação obtida por regressão linear determinada traçando a atividade antioxidante de soluções padrão de Trolox com concentrações conhecidas. A atividade antioxidante foi expressa em μmol equivalente de Trolox/L de extrato de soja.

Análises estatísticas

[0048] Os resultados foram expressos como médias aritméticas e desvios padrões. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi analisada pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Efeitos dos bioprocessos no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante

[0049] Os efeitos da fermentação e/ou biotransformação enzimática no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato hidrossolúvel de soja, medida pelos métodos do ORAC e DPPH, estão apresentados na Tabela 2. Diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de fenólicos totais, ORAC e DPPH foram encontradas em todos os bioprocessos.

Tabela 2. Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante (ORAC e DPPH) das amostras do extrato hidrossolúvel de soja antes e após os processos de biotransformação.

Bioprocesso	Amostras	Fenólicos Totais Equiv. Catequina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ORAC Equiv. Trolox ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	DPPH Equiv. Trolox ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
Padrão	EHS	$101^a \pm 6$	$11584^a \pm 1022$	$821^a \pm 14$

I	EHS fermentado	254 ^b ± 11	25987 ^b ± 977	1729 ^b ± 27
II	EHS soja fermentado + tanase	387 ^c ± 9	31801 ^c ± 858	4439 ^c ± 39
III	EHS + tanase	847 ^d ± 7	45758 ^d ± 937	6724 ^d ± 36

*Os resultados apresentados são médias ($n = 3$) ± DP, e aqueles com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, com $p < 0,05$.

[0050] Os resultados mostraram que houve um aumento significativo no teor de fenólicos totais para todas as amostras biotransformadas ($p < 0,05$). Após o processo fermentativo com bactérias ácido lácticas (processo 1), o teor de fenólicos totais do extrato hidrossolúvel de soja aumentou significativamente de 101 para 254 µg catequina/mL, um aumento de cerca de 2,5 vezes comparado com o padrão (EHS não biotransformado). No processo 2, quando analisado a reação do EHS fermentado com a enzima tanase, também foi observado um aumento significativo no teor de fenólicos totais em que o aumento foi cerca de 3,8 vezes (101-387 µg catequina/mL), quando comparado com o padrão. O processo 3 mostrou o maior aumento em conteúdo de fenólicos totais (101-847 µg catequina/mL), aumento de cerca de 8,4 vezes após a reação do EHS com a enzima tanase. Estes resultados sugerem que o processo fermentativo e de biotransformação enzimática com tanase melhora a liberação de compostos fenólicos do extrato de soja. Além disso, os resultados parecem indicar um maior potencial catalítico da tanase obre os fenólicos do extrato de soja quando comparado à ação fermentativa das bactérias ácido lácticas.

[0051] A atividade antioxidante das amostras, antes e após os três processos de biotransformação do EHS, foi analisada pelos métodos do ORAC e DPPH, in vitro. Os resultados estão descritos na Tabela 2 e expressos em equivalentes de Trolox®. Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo na atividade antioxidante das amostras biotransformadas em ambas as metodologias ($p < 0,05$), correlacionando com os resultados encontrados para teor de fenóis totais.

[0052] Os resultados da tabela 2 indicam que o processo de fermentação do EHS (processo 1) resultou no aumento significativo de cerca de 2,2 vezes na

capacidade antioxidante pelo método ORAC e um aumento de aproximadamente 2,1 vezes pelo método de DPPH. A fermentação seguida pela biotransformação enzimática (processo 2) levou a um aumento na atividade antioxidante de 2,7 e 5,4 vezes pelos ensaios ORAC e DPPH, respectivamente. Do mesmo modo, na biotransformação do EHS catalisada apenas pela tanase (processo 3), houve um aumento significativo na atividade antioxidante de 4 e 8 vezes por ORAC e DPPH, respectivamente.

[0053] A soja e os produtos à base de soja são alimentos nutricionalmente ricos e possuem vários fitoquímicos (isoflavonas, fitoesteróis, saponinas, ácidos fenólicos, ácido fítico e inibidores de tripsina) que possuem propriedades funcionais, antioxidantes e de eliminação de radicais livres (Wardhani, Vázquez, e Pandiellaa, 2010). Os compostos fenólicos de soja apresentam atividade sequestradora de radicais livres (Shon et al., 2007), o que pode explicar a correspondência entre o aumento do teor de fenólicos totais com atividade antioxidante demonstrada na tabela 2.

[0054] Em resumo, os resultados da presente invenção indicam uma tendência do aumento do teor de fenólicos totais após os três bioprocessos propostos. Tal tendência foi semelhante à observada para a atividade antioxidante, tanto pelo método ORAC quanto pelo DPPH, apoiando os resultados obtidos pela biotransformação microbiana e enzimática do EHS.

Perfil das isoflavonas

[0055] A concentração de genistina, daidzina, genisteína, daidzeína e a formação de equol foram avaliadas, antes e após os três processos de biotransformação, utilizando HPLC-DAD (Tabela 3). As isoflavonas e equol foram separados e identificados de acordo com metodologia proposta por Aguiar (2003).

Tabela 3. Concentrações dos isômeros de isoflavonas e equol ($\mu\text{g/mL}$) em extrato hidrossolúvel de soja antes (padrão) e após os processos de biotransformação.

		Conteúdo de isoflavonoides (µg/mL)				Equol
Processos	Amostras	Glicosiladas		Agliconas		
		Daidzina	Genistina	Daidzeína	Genisteína	
		a	a	a	a	

Padrão	EHS	313,0 ^a ± 2,0	393,8 ^a ± 3,2	25,6 ^a ± 0,6	10,2 ^a ± 0,5	0,08 ^a ± 0,000 3
I	EHS fermentado	194,2 ^b ± 5,7	202,5 ^b ± 5,9	91,4 ^b ± 1,9	52,3 ^b ± 2,0	0,31 ^b ± 0,000 8
II	EHS fermentado + tanase	n.d.*	n.d.	717,2 ^c ± 11,0	251,4 ^c ± 6,9	0,63 ^c ± 0,014 2
III	EHS + tanase	n.d.	n.d.	944,5 ^d ± 0,9	321,6 ^d ± 0,8	0,82 ^d ± 0,010 4

* n.d. = Não detectado abaixo do limite de detecção para esta metodologia e equipamentos. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). A média na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

[0056] Os resultados demonstraram que todos os bioprocessos desenvolvidos foram capazes de aumentar significativamente o teor das formas agliconas (daidzeína e genisteína) e equol em extrato hidrossolúvel de soja. Devido à hidrólise da daidzina e genistina, o conteúdo das suas correspondentes formas agliconas, daidzeína e genisteína, em EHS aumentou após o processo fermentativo e enzimático (p < 0,05).

[0057] Como demonstrado na tabela 3, as isoflavonas glicosídicas foram as formas predominantes no EHS padrão e fermentado. No entanto, as concentrações dos glicosídeos genistina e daidzina do EHS fermentado (processo I) diminuíram cerca de 1,6 e 2 vezes, respectivamente, e as agliconas daidzeína e a genisteína aumentaram cerca de 3,5 e 5 vezes, respectivamente, quando comparado com o EHS padrão. Portanto, estes resultados sugerem que as isoflavonas glicosiladas foram transformadas em formas agliconas como resultado do processo de fermentação. De acordo com Dueñas et al., (2012),

este fato pode ser devido à atividade de β -glicosidase inerente aos microrganismos utilizados no processo fermentativo.

[0058] Como pode ser observado na tabela 3, após os processos II e III, as formas glicosídicas (daidzina e genistina) não foram identificadas, mostrando que estas formas foram convertidas em suas respectivas formas agliconas, como mostrado por um aumento significativo nos níveis de daidzeína e genisteína após estes bioprocessos.

[0059] As concentrações das formas agliconas do EHS fermentado, após o processo II, aumentaram significativamente cerca de 28 vezes (25,6 - 717,2 mg/mL) para a daidzeína e 25 vezes (10,2- 251,4 mg/mL) para a genisteína, comparado com o EHS padrão. No processo III as formas agliconas aumentaram significativamente, comparado com o EHS padrão, cerca de 37 vezes (25,6 - 944,5 mg/mL) para a daidzeína e 32 vezes (10,2 - 321,6 mg/mL) para a genisteína. Estes resultados indicam que a reação enzimática com tanasse (processo III) apresentou o maior aumento das formas bioativas das isoflavonas, o que também foi observado para os resultados do teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante pelos métodos do ORAC e DPPH.

[0060] As isoflavonas agliconas foram reportadas por exibir maior função bioativa do que as formas glicosídicas (Cederroth, e Nef, 2009; Setchell, 1998). Portanto, as agliconas são as principais responsáveis pela atividade antioxidante de alimentos à base de soja, embora outros componentes da soja, tais como compostos fenólicos também possam contribuir para a capacidade antioxidante em certa medida (Cheng, Lin, e Liu, 2011).

[0061] Portanto, a bioconversão das isoflavonas glicosiladas em suas formas agliconas após os três processos de biotransformação propostos, provou ser muito eficaz para aumentar a capacidade antioxidante das amostras pelos métodos testados, como foi demonstrado com os testes *in vitro* de atividade antioxidante (ORAC e DPPH).

[0062] A habilidade da enzima tanase em biotransformar padrões comerciais de isoflavonas glicosídicas (daidzina e genistina) foi provada em ensaios realizados *in vitro*. A figura 1 apresenta os cromatogramas obtidos após de 30 minutos de reação, a 40° C, em que padrões comerciais de daidzina (A) e genisteína (B) foram reagidos com extrato semipurificado de tanase de *P. variotti*. Também

são apresentados os tempos de retenção e os espectros de absorção dos produtos da reação.

[0063] Como mostrado na figura 1, é possível constatar que a reação entre a tanase e os padrões de isoflavonas glicosiladas (daidzina e genistina), levou à formação das suas respectivas formas agliconas (A) daidzeína e (B) genisteína. Tal fato pode ser confirmado a partir da similaridade entre o tempo de retenção dos produtos das reações. Estes resultados provam que a tanase é capaz de atuar na hidrólise das ligações glicosídicas das isoflavonas.

[0064] Como mostrado na tabela 3, a concentração de equol após a fermentação do EHS com bactérias do ácido láctico (processo I) levou a um aumento significativo no teor de equol, cerca de 3,9 vezes. No processo II, o tratamento enzimático do EHS fermentado levou a um aumento significativo de cerca de cerca de 7,9 vezes deste composto bioativo, quando comparado ao EHS padrão. No processo III, após o tratamento enzimático do EHS bruto o aumento foi de cerca de 10 vezes. Estes resultados indicam que a tanase de *P. variotiii* apresentou maior ação hidrolítica das isoflavonas glicosiladas em relação ao processo de fermentação e também foi capaz de melhorar o conteúdo de equol em EHS.

[0065] A capacidade da tanase em biotransformar as isoflavonas glicosiladas e aumentar o conteúdo de equol no EHS pode ser confirmada pelos cromatogramas presentes na figura 2.

[0066] A figura 2 apresenta o perfil cromatográfico da composição geral dos polifenóis do EHS padrão (A) e do EHS fermentado por bactérias do ácido lácticas (B), bem como para o EHS fermentado (C) e EHS não fermentado (D) tratado com 1,8 U de extrato semi-purificado de tanase.

[0067] Na figura 2, é possível observar que ambos os processos de fermentação e tratamento enzimático foram capazes de aumentar significativamente o conteúdo de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína). Além disso, estes bioprocessos levaram à formação de equol.

[0068] Os resultados da tabela 3 demonstraram que a tanase de *P. variotii* foi capaz de sintetizar o equol a um nível superior quando comparada às cepas microbianas utilizadas no processo de fermentação. Para o melhor do nosso conhecimento, estudos nessa área são raros e há pouca informação sobre a correlação entre a formação equol e uso de enzimas.

[0069] Também pode-se observar que a ação desta enzima não se limitou a uma deglicosilação da isoflavonas (figura 1), a tanase também foi capaz de aumentar o teor de equol. Estes resultados fazem desta enzima uma opção interessante para aplicação em alimentos à base de soja, com uma composição rica em polifenóis em que a tanase pode agir de diferentes maneiras no processo de biotransformação.

Referências Bibliográficas

- Alekel, D. L., Germain, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J. W., & Toda, T. (2000). Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3), 844–852.
- Aguiar, C. L.; Suzuki, C. N.; Paredes, J. G.; Alencar, S. M.; Park, Y. K. (2003). Transformation of beta-glucoside isoflavones on solid-state fermentation of the soy flour with *Aspergillus oryzae*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(2), 115-121.
- Battestin, V., & Macedo, G. A. (2007a). Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*, 98(9), 1832-1837.
- Battestin, V., & Macedo, G. A. (2007b). Purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of *Paecilomyces variotii*. *Food Biotechnology*, 21(3), 207–216.
- Battestin, V., Macedo, G. A., & de Freitas, V. A. P. (2008). Hydrolysis of epigallocatechingallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. *Food Chemistry*, 108(1), 228-233.
- Cao, S., Sofic, M., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44(11), 3426–3431.
- Cederroth, C. R., & Nef, S. (2009). Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1), 30–42.
- Chandler, S. F., & Dodds, J. H. (1983). The effect of phosphate, nitrogen, and sucrose on the production of phenolics and sicosidine in callus cultures of *solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports*, 2:105–108.
- Chang, C. T., Hsu, C. K., Chou, S. T., Chen, Y. C., Huang, F. S. & Chung Y.C. (2009). Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(4), 799–806.

- Cheng, C., Wang, X., Weakley, S. M., Kougias, P., Lin, P. H., Qizhi, Y., et al. (2010). Soybean isoflavonoid equol blocks ritonavir-induced endothelial dysfunction in porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Nutrition*, 140(1), 7-12.
- Cheng, K. C., Lin, J. T., & Liu, W. H. (2011). Extracts from fermented black soybean by immobilized *Rhizopus oligosporus* exhibit both antioxidative and cytotoxic activities. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 111–117.
- Chien, H. L., Huang, H. Y., & Chou, C. C. (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23(8), 772-778.
- Cho, K. M., Hong, S. Y., Math, R. K., Lee, J. H., Kambiranda, D. M., Kim, J. M. et al. (2009). Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of cheonggukjang by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chemistry*, 114(2), 413–419.
- Clerici, C., Setchell, K. D., Battezzati, P. M., Pirro, M., Giuliano, V., Asciutti, S., Castellani, D., et al. (2007). Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk. *Journal of Nutrition*, 137(10), 2270–2278.
- Cruz, A. G., Guerreiro, L., Nogueira, L. C., Sant'Ana, A. S., Faria, J. A. F., Oliveira, C. A. F., et al. (2013). Developing a prebiotic yogurt: rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of Food Engineering*, 114(3), 323-330.
- Dueñas, M., Hernández, T., Robredo, S., Lamparski, G., Estrella, & I., Muñoz, R. (2012). Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): modifications by different microbiological fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4), 241-250.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizello, C. G., Vincentini, O., Silano, M., Guilani, G., et al. (2010). Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(19), 10338-10446.
- Ferreira, L. R., Macedo, J. A., Ribeiro, M. L & Macedo, G. A. (2013). Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. *Food Research International*, 51(2), 526-535.

- Huang, D., Ou, D., & Hampsch-Woodi, M. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815–1821.
- King, R. A., & Bignell, C. M., (2000). Concentrations of isoflavones phytoestrogens and their glucosides in Australian soya beans and soya foods. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics*, 57(2), 70-78.
- Macedo, J. A., Battestin, V., Ribeiro, M. L., & Macedo, G. A. (2011). Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 491–497.
- Mandarino, J. M. G., & Carrão-Panizzi, M.C. (1999). A soja na cozinha. Embrapa Soja, doc. 136. p.13.
- McCue, P. P., & Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. *Process Biochemistry*, 40(5), 1791–1797.
- Nam, D. H., Kim, H. J., Lim, J. S., Kim, K. H, Park C., Kim J. H., et al. (2011). Simultaneous enhancement of free isoflavone content and potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 76(8), 194–200.
- Nielsen, I. L., & Williamson, G. (2007). Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutritional and Cancer*, 57(1), 1-10.
- Park Y. K., Alencar, S. M., Nery, I. A., Aguiar, C.L., Pacheco, T. A. R. C. (2001). Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. *Food Science-South Korea*, 34(4), 14-19.
- Pyo, Y-H., Lee, T-C., & Lee, Y-C. (2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International*, 38(5), 551–559.
- Setchell, K. D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1333–1346.
- Shon, M. Y., Lee, J., Choi, J. H., Choi, S. Y., Nam, S. H., Seo, K. I., et al. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 113–118.

- Tamime, A. Y., & Robinson R.K. (2007). *Yoghurt: Science and Technology*. (3th ed.). Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 791 p.
- Tyug, T. S., Prasad, K. N., & Ismail, A. (2010). Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry*, 123(3), 583–589.
- Wang, Y. C., Yu, R. C. & Chou, C. C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23(2), 128-135.
- Wardhani, D. H., Vázquez, J. A., & Pandiellaa, S. S. (2010). Optimisation of antioxidants extraction from soybeans fermented by *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 118(3), 731–739.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de biotransformação enzimática de isoflavona caracterizado pelo fato de compreender a fermentação de um substrato composto de extrato hidrossolúvel de soja por bactérias iniciadoras e bacterias ácido lácticas probióticas e/ou de enzima tanase obtida a partir de *Paecilomyces variotti*. e as etapas:
 - A. Macerar os grãos de soja íntegros em água destilada a temperatura ambiente;
 - B. Descartar a água utilizada para maceração;
 - C. Adicionar água destilada;
 - D. Aquecer os grãos em água entre 90 a 110°C por 3 a 10 minutos;
 - E. Adicionar água destilada;
 - F. Triturar os grãos de soja com água destilada;
 - G. Centrifugar a massa obtida entre 9000 a 10000g por 10 a 20 minutos, preferencialmente 15 minutos a temperatura ambiente;
 - H. Aquecer o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) até ebulição por entre 10 a 15 minutos;
 - I. Esterilizar por aquecimento a temperatura de 121°C por 15 a 20 minutos;
 - J. Realizar biotransformação; e
 - K. Manter o produto EHS com isoflavonas bioativas e equol conservado.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as bactérias iniciadoras serem *Streptococcus ssp. Thermophilus* (YF-L811) e *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (LB-340); e bactérias ácido lácticas probióticas serem *Bifidobacterium animales ssp. Lactis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus*.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (A) a proporção de peso de grãos de soja e volume de água ser de 1:3.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (D) a proporção de peso de grãos de soja e volume de água ser de 1:2 e as condições processuais serem 100°C por 5 minutos.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (F) a proporção de peso de grãos de soja e volume de água ser de 1:4.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (G) a centrifugação ocorrer a 9630 x g por 15 minutos a temperatura de 25°C.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (H) a faixa preferencial de ebulição ser entre 96 e 100°C e tempo de 10 minutos.
8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (I) o tempo ser de 15 minutos.
9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (I) compreender opcionalmente uma subetapa de armazenamento (I.a) em condição estéril do EHS.
10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por na subetapa etapa (I.a) as condições de armazenamento de EHS ser de refrigeração entre 4 a 12°C ou congelamento a -80°C.
11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (J) a biotransformação ser realizada por Biotransformação fermentativa, Biotransformação fermentativa seguida por enzimática ou Biotransformação enzimática.
12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela Biotransformação fermentativa ocorrer da seguinte forma:
 - i. Inocular as culturas iniciadoras na concentração de 0,5 – 2% (v/v), preferencialmente 1% (v/v), e de bactérias ácido lácticas probióticas na concentração de 5 a 15% (v/v), preferencialmente 5% (v/v), e contagem mínima de 10⁶ - 10⁷ log UFC/mL e máxima de 10¹⁴ log UFC/mL no EHS obtido na etapa (I); e
 - ii. Incubar a solução obtida em (i) entre 30 e 40°C, preferencialmente a 37°C, por 10 a 24 horas, preferencialmente 12 horas, em condições de anaerobiose.
13. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela Biotransformação fermentativa seguida por enzimática ocorrer da seguinte forma:
 - i. Inocular as culturas iniciadoras na concentração de 0,5 - 2% (v/v), preferencialmente 1% (v/v), e de bactérias ácido lácticas probióticas na concentração de 5 - 15% (v/v), preferencialmente a 5% (v/v), e contagem mínima de 10⁶ - 10⁷ log UFC/mL e máxima de 10¹⁴ log UFC/mL no EHS obtido na etapa (I);

ii. Incubar ao EHS com as culturas obtida em (i) entre 30 e 40°C, preferencialmente a 37°C, por 10 a 24 horas, preferencialmente 12 horas, em condições de anaerobiose;

iii. Inocular em solução obtida em (ii) com 1 a 5 U de tanase, preferencialmente 1,8 U de tanase, por 1ml de EHS fermentado (ii);

iv. Incubar a solução de (iii) entre 35 a 45°C, preferencialmente 40°C, por 20 a 50 minutos, preferencialmente 30 minutos; e

v. Incubar a solução de (iv) entre -2 a 2°C, preferencialmente 0°C (em banho de gelo) por 10 a 30 min, preferencialmente 15 minutos;

14. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela Biotransformação enzimática ocorrer da seguinte forma:

i. Inocular em EHS obtida em (I) com 1 a 5 U de tanase, preferencialmente 1,8 U de tanase, por 1ml de EHS (I);

ii. Incubar a solução em (i) entre 35 a 45°C, preferencialmente 40°C, por 20 a 50 minutos, preferencialmente 30 minutos; e

iii. Incubar a solução de (ii) entre -2 a 2°C, preferencialmente 0°C (em banho de gelo) por 10 a 30 min, preferencialmente 15 minutos;

15. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (K) a conservação ocorrer preferencialmente por congelamento a -80°C.

16. Composição caracterizada por ser obtido de acordo o processo descrito nas reivindicações de 1 a 15 e compreender Daidzina na forma aglicona em concentração entre 90 e 946 µg/mL, Genisteína na forma aglicona em concentração entre 50 e 323 µg/mL e Equol em concentração entre 0,30 e 0,83 µg/mL.

17. Uso da composição conforme definida na reivindicação 16 caracterizado por ter aplicação em alimentos à base de soja.

18. Uso da composição conforme definida na reivindicação 16 caracterizado por ser componente de produto nutracêutico.

19. Uso da composição conforme definida na reivindicação 16 caracterizado por ter aplicação na indústria alimentícia, como ingrediente alimentar, e indústria de nutricosméticos e suplementos dietéticos.

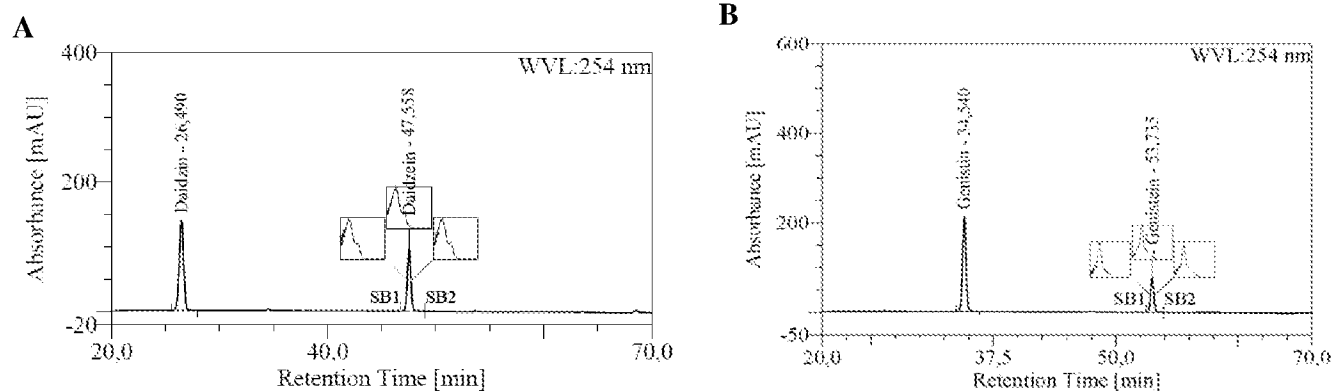


Figura 1

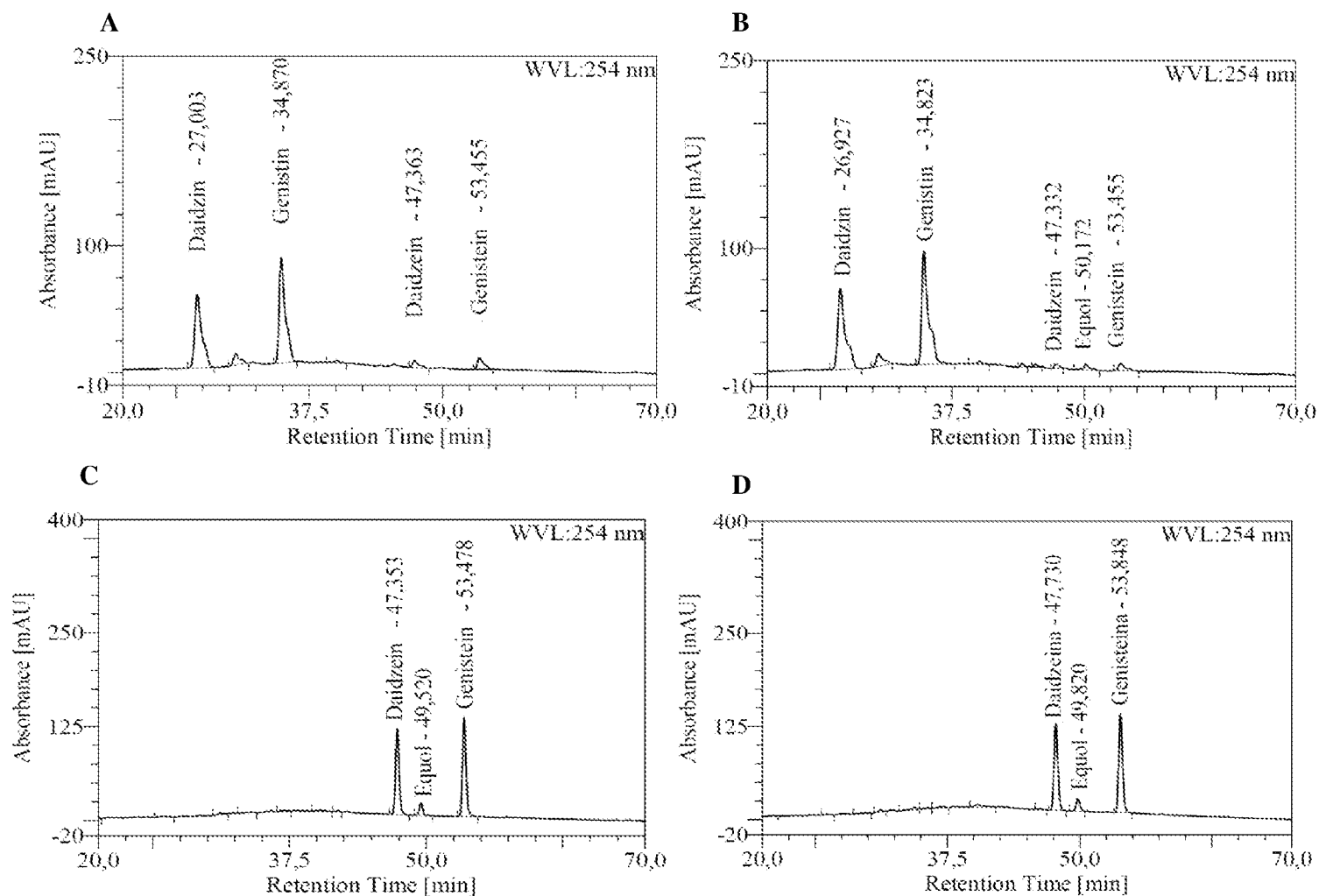


Figura 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2016/000024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23C 11/10 (2006.01), A23L 11/00 (2016.01), C12P 17/06 (2006.01), C12P 39/00 (2006.01), A61K 31/352 (2006.01), A61K 36/48 (2006.01), A61K 8/97 (2006.01), C07D 311/06 (2006.01), C12N 9/18 (2006.01), C12R 1/46 (2006.01), C12R 1/23 (2006.01), C12R 1/225 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

According to International Patent Classification (IPC)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, NPL, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	QUEIRÓS, L. D. Biotransformação de compostos fenólicos do extrato de soja para obtenção de produto rico em compostos bioativos. [online] 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Campinas, 06/06/2014. [access in 27/04/2016]. Disponível em: <URL: http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000932035&opt=4> Abstract, pages 8, 35, 36 (subitem 2.2), 38 and 39 (subitens 2.5.1 to 2.5.3), table 2 -----	1 to 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 2016

Date of mailing of the international search report

18/05/2016

Name and mailing address of the ISA/BR

+55 21 3037-3663
Facsimile No.

**INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL**
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Authorized officer

Flávia Riso Rocha

Telephone No. **+55 21 3037-3493/3742**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2016/000024

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DI CAGNO, R. <i>et al.</i> Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. J Agric Food Chem. 2010. Vol. 58, No. 19, pages 10338-10346. doi: 10.1021/jf101513r. Cited in the description. Abstract, "Introduction", first complete paragraph of the page 10339, second complete paragraph of the second column of the page 10339, first complete paragraph of the second column of the page 10341 to the first paragraph of the page 10342, first paragraph of the section "Materials and Methods", table 2, figure 1.	1 to 12, 15 and 17 to 19
X	CHUN, J. <i>et al.</i> Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. J Food Sci. 2007. Vol. 72, No. 2, pages : M39-44. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00276. Abstract, second paragraph of the page M39, second column of the page M40, first paragraph of the second column of the page M42, figure 3.	1 to 12, 15 and 17 to 19
X	CHIEN, H. L. <i>et al.</i> Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol. 2006. Vol. 23, No. 8, pages : 772-778. doi:10.1016/j.fm.2006.01.002. Abstract, subitem 2.1 of the page 773, figures 1 and 2.	1 to 12, 15 and 17 to 19
X	US 2011189134 A1 (OTSUKA FOOD CO LTD [JP]) 04 August 2011 (04-08-2011) Cited in the description. Abstract, paragraphs [0005], [0017] and [0054], example 1.	1 to 12, 15 and 17 to 19
A	FERREIRA, L. R. <i>et al.</i> Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. Food Res. 2013. Vol. 51, No. 2, pages 526-535. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.018. Abstract, figures 1 to 4, third paragraphs and subitem 3.5 of the page 531.	1 to 19
A	MADEIRA Jr, J. V. <i>et al.</i> Rich bioactive phenolic extract production by microbial biotransformation of Brazilian <i>Citrus</i> residues. Chemical Engineering Research and Design. 2014. Vol. 92, No. 10, pages 1802-1810. doi:10.1016/j.cherd.2014.07.014. Abstract, table 3.	1 to 19
A	MADEIRA Jr, J. V. <i>et al.</i> Efficient tannase production using Brazilian citrus residues and potential application for orange juice valorization. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2015. Vol. 4, No. 1, pages 91-97. doi:10.1016/j.bcab.2014.11.005. Abstract, subitem 3.3 of the page 96.	1 to 19
A	BATTESTIN, V. & MACEDO, G. A. Tannase production by <i>Paecilomyces variotii</i> . Bioresour Technol. 2007. Vol. 98, No. 9, pages 1832-1837. doi:10.1016/j.biortech.2006.06.031 Cited in the description. Abstract.	1 to 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2016/000024

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YUAN, J. P. <i>et al.</i> Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. Mol Nutr Food Res. 2007. Vol. 51, No. 7, pages 765-781. doi: 10.1002/mnfr.200600262. Abstract. -----	1 to 19
A	BR PI1103791 A2 (UNICAMP [BR]) 30 July 2013 (30-07-2013) Abstract. -----	1 to 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2016/000024

US 2011189134 A1	2011-08-04	US 9101159 B2	2015-08-11
		AU 2009293724 A1	2010-03-25
		BR PI0919735 A2	2015-08-18
		CA 2737545 A1	2010-03-25
		CN 102159092 A	2011-08-17
		EP 2335500 A1	2011-06-22
		JP 5769419 B2	2015-08-26
		KR 20110056419 A	2011-05-27
		MX 2011003021 A	2011-04-12
		SG 193883 A1	2013-10-30
		TW 201024417 A	2010-07-01
		TW 201514304 A	2015-04-16
		US 2015299748 A1	2015-10-22
		WO 2010032838 A1	2010-03-25
BR PI1103791 A2	2013-07-30	WO 2013020188 A1	2013-02-14

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A23C 11/10 (2006.01), A23L 11/00 (2006.01), C12P 17/06 (2006.01), C12P 39/00 (2006.01), A61K 31/352 (2006.01), A61K 36/48 (2006.01), A61K 8/97 (2006.01), C07D 311/06 (2006.01), C12N 9/18 (2006.01), C12R 1/46 (2006.01), C12R 1/23 (2006.01), C12R 1/225 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C12P

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, NPL, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	QUEIRÓS, L. D. Biotransformação de compostos fenólicos do extrato de soja para obtenção de produto rico em compostos bioativos. [online] 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Campinas, 06/06/2014. [acesso em 27/04/2016]. Disponível em: <URL: http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000932035&opt=4> Resumo, páginas 8, 35, 36 (subitem 2.2), 38 e 39 (subitens 2.5.1 a 2.5.3), tabela 2 -----	1 a 19

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C

☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

“A” documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

“E” pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

“L” documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

“O” documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

“P” documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

“T” documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

“X” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

“Y” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

“&” documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

29/04/2016

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

18/05/2016

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax: +55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Flávia Riso Rocha

Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

Quadro II**Observações quando certas reivindicações não puderam ser objeto de pesquisa (Continuação do ponto 2 da primeira página)**

Este relatório de pesquisa internacional não foi formulado em relação a certas reivindicações, sob Artigo 17.2).a), pelas seguintes razões:

1. ☐ Reivindicações:

porque estas se referem a matéria na qual esta Autoridade não está obrigada a realizar a pesquisa, a saber:

2. ☐ Reivindicações:

porque estas se referem a partes do pedido internacional que não estão de acordo com os requisitos estabelecidos, de tal forma que não foi possível realizar uma pesquisa significativa, especificamente:

3. ☐ Reivindicações:

porque estas são reivindicações dependentes e não estão redigidas de acordo com a segunda e terceira frase da Regra 6.4.a).

Quadro III**Observações por falta de unidade de invenção (Continuação do ponto 3 da primeira página)**

Esta Autoridade de pesquisa internacional encontrou múltiplas invenções neste depósito internacional, a saber:

1) processo de biotransformação fermentativa de extrato hidrossolúvel de soja (EHS) pelo emprego de bactérias iniciadoras e bactérias ácido lácticas probióticas, composição obtida pelo processo e usos dessa composição (reivindicações 1 a 12, 15 a 19, sendo as reivindicações 1 e 11 apenas parcialmente);

2) processo de biotransformação de EHS pelo emprego de enzima tanase, composição obtida pelo processo e usos dessa composição (reivindicações 1, 3 a 11, 14 a 19, sendo as reivindicações 1 e 11 apenas parcialmente);

3) processo de biotransformação de EHS por fermentação com bactérias iniciadoras e bactérias ácido lácticas probióticas, seguida por biotransformação com a enzima tanase, composição obtida pelo processo e usos dessa composição (reivindicações 1 a 11, 13, 15 a 19, sendo as reivindicações 1 e 11 apenas parcialmente).

1. ☐ como todas as taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa cobre todas as reivindicações pesquisáveis.

2. ☒ como a pesquisa em todas as reivindicações pesquisáveis pode ser feita sem esforço que justifique pagamento adicional, esta Autoridade não solicitou o pagamento de taxas adicionais.

3. ☐ como somente algumas das taxas requeridas para pesquisas adicionais foram pagas pelo depositante dentro do prazo, este relatório de pesquisa internacional cobre somente aquelas reivindicações cujas taxas foram pagas, especificamente as reivindicações:

4. ☐ as taxas de pesquisas adicionais requeridas não foram pagas dentro do prazo pelo depositante. Consequentemente, este relatório de pesquisa internacional se limita à invenção mencionada primeiramente nas reivindicações, na qual é coberta pelas reivindicações:

Observações da reclamação

☐ as taxas adicionais para pesquisas foram acompanhadas pela reclamação do depositante e, se for o caso, pelo pagamento da taxa de reclamação.

☐ as taxas adicionais para pesquisa foram acompanhadas pela reclamação do depositante mas a taxa de reclamação não foi paga dentro do prazo especificado pela solicitação.

☐ o pagamento de pesquisas adicionais não acompanha nenhuma reclamação.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	DI CAGNO, R. <i>et al.</i> Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. J Agric Food Chem. 2010. Vol. 58, No. 19, páginas 10338-10346. doi: 10.1021/jf101513r. Citado na descrição. Resumo, “Introdução”, primeiro parágrafo completo da página 10339, segundo parágrafo completo da segunda coluna da página 10339, primeiro parágrafo completo da segunda coluna da página 10341 ao primeiro parágrafo da página 10342, primeiro parágrafo da seção “Materiais e Métodos”, tabela 2, figura 1.	1 a 12, 15 e 17 a 19
X	CHUN, J. <i>et al.</i> Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. J Food Sci. 2007. Vol. 72, No. 2, páginas: M39-44. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00276. Resumo, segundo parágrafo da página M39, segunda coluna da página M40, primeiro parágrafo da segunda coluna da página M42, figura 3.	1 a 12, 15 e 17 a 19
X	CHIEN, H. L. <i>et al.</i> Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol. 2006. Vol. 23, No. 8, páginas: 772-778. doi:10.1016/j.fm.2006.01.002. Resumo, subitem 2.1 da página 773, figuras 1 e 2.	1 a 12, 15 e 17 a 19
X	US 2011189134 A1 (OTSUKA FOOD CO LTD [JP]) 04 agosto 2011 (2011-08-04) Citado na descrição. Resumo, parágrafos [0005], [0017] e [0054], exemplo 1.	1 a 12, 15 e 17 a 19
A	FERREIRA, L. R. <i>et al.</i> Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. Food Res. 2013. Vol. 51, No. 2, páginas 526-535. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.018. Resumo, figuras 1 a 4, terceiro parágrafos e subitem 3.5 da página 531.	1 a 19
A	MADEIRA Jr, J. V. <i>et al.</i> Rich bioactive phenolic extract production by microbial biotransformation of Brazilian <i>Citrus</i> residues. Chemical Engineering Research and Design. 2014. Vol. 92, No. 10, páginas 1802–1810. doi:10.1016/j.cherd.2014.07.014. Resumo, tabela 3.	1 a 19
A	MADEIRA Jr, J. V. <i>et al.</i> Efficient tannase production using Brazilian citrus residues and potential application for orange juice valorization. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2015. Vol. 4, No. 1, páginas 91–97. doi:10.1016/j.bcab.2014.11.005. Resumo, subitem 3.3 da página 96.	1 a 19
A	BATTESTIN, V. & MACEDO, G. A. Tannase production by <i>Paecilomyces variotii</i> . Bioresour Technol. 2007. Vol. 98, No. 9, páginas 1832-1837. doi:10.1016/j.biortech.2006.06.031 Citado na descrição. Resumo.	1 a 19

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
A	YUAN, J. P. <i>et al.</i> Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. Mol Nutr Food Res. 2007. Vol. 51, No. 7, páginas 765-781. doi: 10.1002/mnfr.200600262. Resumo. -----	1 a 19
A	BR PI1103791 A2 (UNICAMP [BR]) 30 julho 2013 (2013-07-30) Resumo. -----	1 a 19

Depósito internacional Nº

PCT/BR2016/000024

[illegible]