(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 827698 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A23J003/16 A A23J003/14 B
A23L001/20 B A23L001/211 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1997.09.05

(30) *Prioridade:* 1996.09.06 US 709026

(43) *Data de publicação do pedido:* 1998.03.11

(45) *Data e BPI da concessão:* 2000.05.03

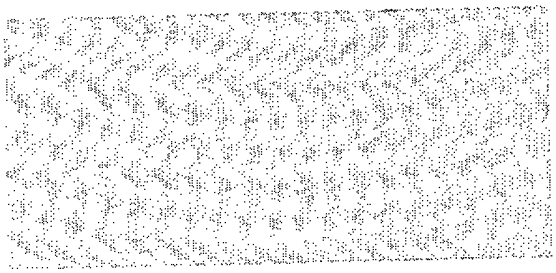
(73) *Titular(es):*
PROTEIN TECHNOLOGIES INTERNATIONAL,INC. US
CHECKERBOARD SQUARE ST. LOUIS MISSOURI 63164

(72) *Inventor(es):*
BARBARA A. BRYAN US
MARYANN C. ALLRED US

(74) *Mandatário(s):*
JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ
RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* EXTRACTO DE PROTEÍNA VEGETAL E MATERIAL DE PROTEÍNA ENRIQUICIDO COM AGLICONA ISOFLAVONA E MATERIAIS COM ELEVADO CONTEÚDO DE GENISTEÍNA E DAIDZEÍNA E PROCESSOS PARA A SUA PRODUÇÃO

(57) *Resumo:*



DESCRIÇÃO

"EXTRACTO DE PROTEÍNA VEGETAL E MATERIAL DE PROTEÍNA ENRIQUECIDO COM AGLICONA ISOFLAVONA E MATERIAIS COM ELEVADO CONTEÚDO DE GENISTEÍNA E DAIDZEÍNA E PROCESSOS PARA A SUA PRODUÇÃO"

A presente invenção relaciona-se com extracto de proteína vegetal e material proteico enriquecido com aglicona isoflavona, e métodos para fornecer tais materiais por realização de um processo em duas etapas para converter os conjugados de isoflavona num material de proteína vegetal em agliconas de isoflavonas, e também se relaciona com um material com elevado conteúdo em genisteína ou um elevado conteúdo em daidzeína e métodos para fornecer tais materiais a partir de um material proteico enriquecido com aglicona isoflavona.

As isoflavonas ocorrem numa variedade de plantas leguminosas, incluindo materiais proteicos vegetais tais como sementes de soja. Estes compostos incluem daidzina, 6"-Oac daidizina, 6"-OMal daidzina, daidzeína, genistina, 6"-OAc genistina, 6"-OMal genistina, genisteína, glicitina, 6"-OAc-glicitina, 6"-OMal glicitina, gliciteína, biocanina A, formononentina, e coumestrol. Tipicamente estes compostos estão associados com o aroma amargo, inerente das sementes de soja.

As isoflavonas nos materiais de proteína vegetais incluem glucósidos de isoflavona (agliconas), conjugados de isoflavona e agliconas isoflavonas. Os glucósidos de isoflavona têm uma molécula de glucose ligada a um ametade de isoflavona. Os conjugados de isoflavona têm metades adicionais

ligadas à molécula de glucose de um glucósido de isoflavona, por exemplo, 6"-OAc genistina contém um grupo acetato ligado à posição seis da molécula de glucose de genistina. As isoflavonas agliconas consistem unicamente de uma metade isoflavona.

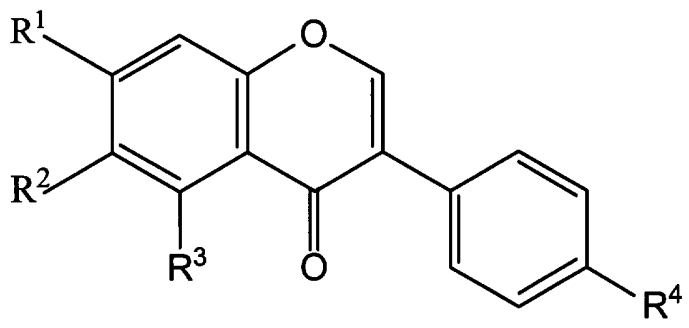
A soja contém três "famílias" de compostos isoflavona tendo os correspondentes glucósidos, conjugados, e membros aglicona: a família genisteína inclui o glucósido genistina; os conjugados 6"-OMal genistina (6"-éster malonato de genistina) e 6"-OAc genistina (6"-éster acetato de genistina); e a aglicona genisteína. A família daidzeína inclui o glucósido daidzina; os conjugados 6"-OMal daidzina e 6"-OAc daidzina; e a aglicona daidzeína. A família gliciteína inclui o glucósido glicitina; o conjugado 6"-OMal glicitina; e a aglicona gliciteína.

Na produção de produtos comerciais, tais como isolados e concentrados de proteína vegetal, os objectivos têm sido centralizados na remoção destes materiais. Por exemplo, num processo convencional para a produção de isolado ou concentrado de proteína de soja no qual os flocos de soja são extraídos com um meio aquoso alcalino, muitas das isoflavonas são solubilizadas no extracto simultaneamente com a proteína de soja. A proteína é precipitada do extracto após acidificação do extracto e é separado para formar um isolado ou um concentrado, deixando um soro que retém a maioria das isoflavonas solubilizadas. As isoflavonas residuais deixadas na proteína precipitada em meio ácido são geralmente removidas por lavagem exaustiva. O soro e as lavagens são tipicamente desprezados.

Foi recentemente reconhecido que as isoflavonas contidas em proteínas vegetais tais como sementes de soja têm valor medicinal. Enquanto todas as isoflavonas são consideradas com interesse na avaliação médica, as

agliconas são as isoflavonas específicas dee maior interesse. A genisteína e a daidzeína podem reduzir significativamente os factores de risco cardiovasculares, "Efeitos de Estrogénios em Plants e Mamíferos nos Lípidos do Plasma de Macacas Fêmeas," Circulação, vol. 90, p. 1259 (Oct. 1994). Pensa-se que a genisteína e a daidzeína reduzem os sintomas de condições causadas por niveis alterados ou reduzidos de estrogénios endógenos em mulheres, tais como menopausa e síndroma pré-menstrual. Além disso, foi recentemente reconhecido que as agliconas isoflavonas podem inibir o crescimento de células de cancro humanas, tais como células do cancro da mama e células do cancro da próstata, como descrito nos artigos seguintes: "A Inibição pela Genisteína do Crescimento de Células do Cancro Humano da Mama, Independência em Relação aos Receptores de Estrogénio e ao Gene de Resistência Multi-Fármaco" por Peterson e Barnes, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 179, No. 1, pp. 661-667, Aug. 30, 1991; "Genisteína e Biocanina A Inibem o Crescimento de Células do Cancro da Próstata Humano mas não inibe a Autofosforilação do Receptor de Tirosina do Factor de Crescimento Epidérmico" por Peterson ne Barnes, The Prostate, Vol. 22, pp. 335-345 (1993); e "Sementes de Soja Inibem Tumores de Mamíferos em Modelos de Cancro da Mama" por Barnes, *et al.*, Mutagens and Carcinogens in the Diet, pp. 239-253 (1990).

Como notado acima, as isoflavonas agliconas incluem daidzeína, genisteína, e gliciteína. Estas agliconas têm a seguinte fórmula geral:



em que, R^1, R^2, R^3 e R^4 podem ser seleccionados do grupo consistindo de H, OH e OCH_3.

Genisteína tem a fórmula acima onde R^1=OH, R^2=H, R^3=OH, e R^4=OH, daidzeína tem a fórmula acima em que R^1=OH, R^2=H, R^3=H, e R^4=OH, e gliciteína tem a fórmula acima em que R^1=OH, R^2=OCH3, R^3=H, e R^4=OH.
A invenção presente é por conseguinte dirigida às agliconas e ao enriquecimento de um extracto de proteína vegetal e de um material proteico vegetal com estes compostos, e também um material com elevado conteúdo em genisteína e um material com elevado conteúdo em daidzeína. A presente invenção é também dirigida a métodos de fabrico de extracto de proteína vegetal enriquecido com aglicona, um material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona, um material com elevado conteúdo em genisteína e um material com elevado conteúdo em daidzeína.

São conhecidos processos para converter glucósidos em agliconas isoflavonas. Um processo para converter glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas para produzir uma isoflavona aglicona enriquecida com extracto de proteína vegetal e um isolado deproteína vegetal enriquecido com aglicona isoflavona é fornecido na Patente WO95/10530.

Outros processos são também conhecidos na técnica para converter glucósidos de isoflavona, tais como os descritos no Pedido de Patente Japonesa 258,669 por Obata, *et al.*. Tais processos não permitem a conversão de conjugados de isoflavona em agliconas isoflavonas nem permitem obter um material com elevado conteúdo em genisteína ou um material com elevado conteúdo em daidzeína por derivatização de um isolado de proteína vegetal enriquecido com aglicona. Além disso, estes processos permitem conseguir

apenas uma extensão de conversão moderada dos glucósidos em aglicona, e requerem um período de tempo substancial para efectuar esta conversão de estensão moderada. Portanto, tais processos não são desejáveis para operações comerciais de grande escala.

É por consequência um objectivo da presente invenção fornecer um extracto de proteína vegetal enriquecido com aglicona isoflavona e um processo para produzir o mesmo.

É um objectivo posterior da presente invenção fornecer um material proteico vegetal enriquecido com aglícina isoflavona, e um processo para produzir o mesmo.

É ainda objecto posterior desta invenção o fornecimento de um material com elevado conteúdo em genisteína e um material com elevado conteúdo em daidzeína e processos para produzir os mesmos a partir de um material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona.

A invenção consiste num extracto enriquecido com aglicona isoflavona e um processo para produzir a mesma a partir de um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína.O processo compreende a extracção ede material vegetal contendo conjugados de isoflavona com um extractante aquoso tendo pH acima da zona do pH do ponto isoeléctrico da proteína no material vegetal.Num primeiro passo de conversão o extracto aquoso é tratado a uma temperatura e pHdurante um período de tempo suficiente para converter uma maioria dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona. Num segundo passo de conversão, um enzima é colocado em contacto com glucósidos de isoflavona num extracto aquoso e a uma temperatura e um pH durante um período de tempo suficiente para converter a maioria dos



conjugados de isoflavona em agliconas isoflavonas, produzindo-se o extracto enriquecido com aglicona isoflavona.

Numa forma de realização da invenção, a extracção é realizada a um pH desde cerca de 6 a cerca de 10. Preferencialmente a razão de pesos de extractante em relação ao material proteico vegetal é desde cerca 8:1 a cerca de 16:1.

Em outra forma de realização da invenção, os conjugados de isoflavona são convertidos em glucósidos de isoflavona por tratamento do extracto aquoso a uma temperatura de cerca de 2°C a cerca de 121°C e a um valor de pH de cerca 6 a cerca de13,5. Preferencialmente a conversão é efectuada a um pH de cerca de 11 e a uma temperatura de cerca de 5°C a cerca de 50°C, ou, alternativamente, a um pH de cerca de 9 e a uma temperatura de cerca de 45°C a cerca de 75°C.

Em ainda outra forma de realização desta invenção, os glucósidos de isoflavona são convertidos em agliconas isoflavonas após contacto dos glucósidos de isoflavona com uma enzima num extracto aquoso a uma temperatura entre cerca de 5°C e cerca de 75°C e a um valor de pH entre cerca de 3 e cerca de 9. Preferencialmente a enzima é uma enzima sacaridase capaz de clivagem de ligações 1,4-glucósidos.

Em outra forma de realização desta invenção, o pH do extracto enriquecido com a isoflavona aglicona é ajustado até próximo do ponto isoeléctrico da proteína no extracto para precipitar um material proteico contendo proteína e agliconas isoflavonas.

Obervam-se taxas elevadas de interconversão de conjugados de



isoflavona em glucósidos de isoflavona, e de glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas. Numa forma de realização, uma maioria, e de preferência substancialmente todos os conjugados de isoflavona são convertidos em isoflavonas agliconas.

Em outro aspecto, a invenção é um material proteico enriquecido com aglicona isoflavona, e um processo para produção do mesmo a partir de material proteico enriquecido com glucósido de isoflavona e derivado do material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína. O material vegetal é extraído com um extractante aquoso tendo um pH de valor acima do ponto isoeléctrico da proteína no material vegetal. Num primeiro passo de conversão, o extracto aquoso é tratado a uma temperatura e a um pH determinado durante um período de tempo suficiente para converter uma maioria dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona. Um material proteico contendo glucósidos de isoflavona é separado do extracto, e, num segundo passo de conversão, os glucósidos de isoflavona no material proteico são colocados em contacto com uma enzima a um pH e uma temperatura determinada durante um período de tempo suficiente para converter os glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas.

Em ainda outro aspecto, a invenção é um extracto enriquecido com aglicona isoflavona, e um processo para produção do mesmo a partir de um material vegetal enriquecido com glucósido de isoflavona derivado de um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína. Forma-se uma pasta aquosa do material vegetal, e, num primeiro passo de conversão, a pasta é tratada a um pH e a uma temperatura determinada durante um período de tempo suficiente para converter uma maioria dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona. O material vegetal enriquecido com glucósido de isoflavona é então extraído com um extractante aquoso tendo um pH acima do

ponto isoeléctrico da proteína no material vegetal. Num segundo passo de conversão, os glucósidos de isoflavona no extracto são colocados em contacto com uma enzima a uma temperatura e a um pH determinado por um período de tempo suficiente para converter os glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas.

Numa forma de realização preferida, os glucósidos de isoflavona no extracto são colocados em contacto com uma enzima através da adição de uma quantidade efectiva de uma enzima suplementar do extracto, em que a enzima suplementar é preferencialmente uma enzima sacaridase capaz de clivagem das ligações 1,4-glucósido.

Em outra forma de realização, o material proteico enriquecido com os glucósidos de isoflavona é forma do a partir de um extracto enriquecido com aglicona isoflavona por ajustamento do pH do extracto até próximo do ponto isoeléctrico da proteína para precipitar um material proteico contendo proteína e agliconas isoflavonas.

Em ainda outro aspecto, a invenção é um material proteico enriquecido com aglicona isoflavona, e um processopara produção da mesma a partir de um material proteico derivado de um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína. O material vegetal é extraído com um extractante aquoso tendo um pH acima do valor de ponto isoeléctrico da proteína. Um material proteico contendo conjugados de isoflavona é separado do extracto por ajustamento do pH do extracto a um valor próximo do ponto isoeléctrico da proteína. É formada uma pasta aquosa do material proteico, e, num primeiro passo de conversão, a pasta aquosa é tratada a um pH e a uma temperatura determinada durante um período de tempo suficiente para converter uma maioria dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona. Num segundo passo

de conversão, os glucósidos de isoflavona na pasta ficam em contacto com uma enzima a um pH e a uma temperatura determinada durante um período de tempo suficiente para converter os glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas.

Numa forma de realização preferida, os glucósidos de isoflavona na pasta são postos em contacto com uma enzima por adição à pasta de uma quantidade efectiva de uma enzima suplementar, em que a enzima suplementar é preferencialmente uma enzima sacaridase capaz de clivagem de ligações 1,4-glucósido.

Em outro aspecto ainda, a invenção é um material de elevado conteúdo de genisteína e um processo para recuperação do mesmo a partir de um material vegetal proteico enriquecido com aglicona isoflavona. Um material proteico vegetal enriquecido com isoflavona é fornecido e é extraído com um extractante aquoso alcoólico para produzir um extracto enriquecido com aglicona isoflavona. O extracto é colocado em contacto com um material adsorvente durante um período de tempo suficiente para separar um material com conteúdo elevado de genisteína a partir do extracto.

Num aspecto final, a invenção é um material com elevado conteúdo em daidzeína e um processo para produzir o mesmo a partir de um material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona. Um material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona é fornecido e extraído com um extractante aquoso alcoólico para produzir um extracto enriquecido com aglicona isoflavona.

O material de partida da forma de realização preferida é qualquer material proteico vegetal ou material de plantas contendo conjugados de isoflavona e uma proteína vegetal. Numa forma de realização preferida, o

material de partida é um material de soja uma vez que o processo é particularmente adequado para a produção de extractos enriquecidos com aglicona isoflavona e materiais proteicos a partir de material de soja. O termo "material de soja" tal como usado aqui refere-se a sementes de soja ou quaisquer materiais obtidos a partir da soja. O material de partida mais preferido são flocos de soja do qual o óleo tenha sido removido por extracção com solventes de acordo com procedimentos convencionais na técnica. O processo presente á geralmente aplicável a um agrande variedade de materiais proteicos vegetais exceptuando os materias de soja ou de semente de soja.

Dependendo do tipo de material vegetal da planta contendo conjugados de isoflavona, pode ser necessário em algumas circunstâncias processar o material de planta numa forma finamente dividida. Isto pode ser desejável para tornar acessíveis os compostos de isoflavona contidos no material vegetal a vários reagentes como descrio abaixo em maior detalhe. O material pode ser moído, cortado, ou processado de outro modo por métodos convencionais conhecidos na técnica. Se o material da planta está num estado tal que os compostos de isoflavona no material da planta estão prontamente acessíveis a reagentes externos, tal como pequenas porções da folha de certas plantas, pode não ser necessário submeter o material da planta a tal processamento.

Num primeiro passo ou operação, a proteína vegetal e os compostos de isoflavona incluindo conjugados de isoflavona são extraídos do material proteico vegetal. Os flocos são extraídos com um extractante aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico do material proteico, preferencialmente a um pH de cerca de 6,0 a cerca de 9,7. Reagentes tipicamente alcalinos tais como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, e hidróxido de cálcio podem ser empregues, se necessário, para elevar o pH do extractante aquoso.

É preferido, para maximizar a recuperação destes compostos no extracto aquoso, que a razão de pesos dos flocos de sementes de soja e outro material proteico vegetal em relação ao extractante seja controlada a níveis específicos para solubilizar tantas isoflavonas no material vegetal quanto possível. A extracção de isoflavonas e proteínas no material vegetal pode ser realizada por processos de extracção convencionais incluindo extracção em contracorrente do material proteico vegetal, preferencialmente a uma razão de pesos de extractante aquoso para material proteico vegetal de cerca de 8:1 a cerca de 16:1. Após extrair o material proteico vegetal, o extractante fornece um extracto aquoso de proteína e isoflavonas.

Alternativamente, pode ser usado um processo de extracção de dois passos, onde preferencialmente a razão de pesos de extractante para material proteico vegetal numa extracção inicial é de cerca de 10:1, e a razão de pesos de extractante para material proteico vegetal numa segunda extracção é de cerca de 6:1, de modo que a razão de pesos combinada de extractante para material proteico vegetal é de cerca de 16:1. Outros processos de extracção podem também ser usados nos quais a razão de pesos de extractante para material proteico vegetal em ambas as extracções não excedem um arazão de pesos totais de extractante para material proteico vegetal de cerca de 16:1. Outros processos de extracção podem também ser usados nos quais a razão de pesos de extractante para material proteico vegetal é preferencialmente 16:1 ou menos.

Num primeiro passo ou operação de conversão de isoflavona, uma maioria dos conjugados de isoflavona no extracto aquoso são convertidos em glucósidos de sioflavona para produzir um extracto enriquecido com glucósido de isoflavona. Verificou-se que a conversão é dependente do pH e da temperatura do extracto aquoso.

O intervalo de pH para conversão dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona é desde cerca de 6 a cerca de 13,5. O pH do extracto aquoso deceria ser ajustado ao pH desejado, se necessário, com uma base adequada, agente cáustico, ou reagente básico se tiver de ser aumentado o pH, ou, se o pH tiver de ser diminuído, com um ácido adequado ou reagente ácido. Verificou-se que a conversão dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona é catalisada por base, e por isso é mais preferida a utilização de pH elevado para conseguir uma conversão rápida. O pH mais preferido para conversão dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona é um pH de cerca de 9 a cerca de 11.

O intervalo de temperatura para conversão dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona é desde cerca de 2°C a cerca de 121°C. O intervalo de temperatura ao qual ocorre prontamente a conversão depende do pH do extracto aquoso. Os inventores verificaram que a conversão ocorre facilmente a temperaturas mais baixas quando o pH é relativamente elevado. Por exemplo, a um pH de cerca de 11 a conversão ocorre rapidamente e eficientemente a um intervalo de temperatura de cerca de 5°C a cerca de 50°C. A um pH de cerca de 9 a conversão ocorre eficientemente dentro de um intervalo de temperaturas de cerca de 45°C a cerca de 75°C. Quando o pH do extracto aquoso é relativamente baixo, a conversão ocorre a temperaturas mais elevadas. Por exemplo, a um pH de cerca de 6, a conversão ocorre dentro de um intervalo de temperatura de cerca de 80°C a cerca de 121°C. Numa forma de realização preferida, a conversão é efectuada a cerca de 35°C e a um pH de cerca de 11. Em outra forma de realização preferida, a conversão é efectuada a uma temperatura de cerca de 73°C e a um pH de cerca de 9.

O período de tempo requerido para conversão de conjugados de

isoflavona em glucósidos de isoflavona no primeiro passo de conversão depende principalmente do intervalo de pH e temperatura utilizado. Tais tempos de conversão oscilam tipicamente desde cerca de 15 minutos até várias horas ou mais. A conversão ocorre mais rapidamente a valores mais altos de pH e a uma temperatura mais elevada. A um pH de cerca de 9, a conversão é substancialmente completa em cerca de 4 horas até cerca de 6 horas a 73°C. Numa forma de realização mais preferida, os conjugados de isoflavona são convertidos em glucósidos de isoflavona em cerca de 30 minutos a cerca de 1 hora, preferencialmente cerca de 45 minutos, a um pH de cerca de 11 e a uma temperatura de cerca de 35°C.

O primeiro passo de conversão é preferencialmente realizado num sistema aquoso. Outros componentes compatíveis com água podem também estar presentes no sistema, tais como um álcool de baixo peso molecular, e outros solvenets solúveis em água.

O primeiro passo de conversão de isoflavona é notavelmente eficiente, convertendo maioritariamente desde cerca de 80% a cerca de 100% dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona. Através da utilização dos parâmetros de reacção preferidos previamente descritos é possível atingir conversões de 95% ou mais. Estas velocidades de conversão elevadas são particularmente atraentes para operações comerciais de grande escala.

Num segundo passo ou operação de conversão de isoflavona, os glucósidos de isoflavona produzidos no primeiro passo de conversão, bem como glucósidos de isoflavona previamente residentes no extracto aquoso, são convertidos em agliconas isoflavonas por reacção enzimática. A conversão produz um extracto enriquecido com isoflavona aglicona a partir do extracto enriquecido com glucósido de isoflavona.

Verificou-se que o segundo passo de conversão é dependente da concentração de enzimas presentes no extracto, e das suas características. As enzimas necessárias para efectuar a conversão são enzimas capazes de clivagem de ligações glucosídicas entre a metade de isoflavona e a molécula dos glucósidos de isoflavona. Numa forma de realização preferida, as enzimas são sacaridase, esterase, ou gluco-amilase capazes de clivagem de ligações 1,4-glucosídicas.

A concentração de enzimas necessárias para converter os glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas é dependente de uma variedade de factores incluindo o tipo d eenzimas presentes no extracto aquoso, a distribuição de concentração de enzimas,, actividades de enzimas, e do pH e temperatura do extracto durante a conversão. As enzimas podem estar inerentemente presentes no extracto quer a partir do material proteico vegetal quer devido ao crescimento microbiano no extracto. Tais enzimas inerentemente presentes são aqui referidas como enzimas "residuais", e enzimas que são adicionadas ao extracto são aqui referidas como enzimas "suplementares".

Enzima suficiente deverá estar presente no extracto para converter pelo menos uma maioria, e de preferência substancialmente todos os glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas. Geralmente, se as enzimas residuais no extracto são insuficientes para realizar a conversão, devem ser adicionadas ao extracto enzimas suplementares. Numa forma de realização preferida, são adicionadas enzimas suplementares ao extracto independentemente de estarem ou não presentes enzimas residuais suficientesno extracto, uma vez que a adição de enzimas suplementares decresce dramaticamente o tempo necessário para efectuar a conversão substancialmente completa dos glucósidos em agliconas. Se são adicionadas enzimas suplementares, as enzimas suplementares devem ser

adicionadas de modo que a concentração total de enzima presente seja cerca de 0,1% a cerca de 10% em peso de material proteico vegetal ou numa base de peso seco.

São seleccionadas enzimas suplementares com base na actividade óptima a um pH de eleição e em determinadas condições de temperatura, e com base na eficácia dos custos.As enzimas suplementares são enzimas capazes de clivar a ligação entre a metade de isoflavona e a molécula de glucose dos glucósidos de isoflavona, tais como a sacaridase, a esterase, e enzimas gluco-amilases capazes de clivagem de ligações 1,4-glucosídicas. Enzimas suplementares preferidas são as enzimas disponíveis comercialmente alfa-glucosidase e beta-glucosidase, beta-galactosidase, gluco-amilase, e pectinase. Particularmente preferidas são enzimas tais como Biopectinase 100L (que é utilizada preferencialmente a um intervalo de pH de cerca de 3 a cerca de 6), Biopectinase 300L (intervalo de pH óptimo desde cerca de 3 a cerca de 6), Biopectinase OK 70L (intervalo de pH óptimo desde cerca de 3 a cerca de 6), Biolactase 30000 (intervalo de pH óptimo desde cerca de 3 a cerca de 6), Neutral Lactase (intervalo de pH óptimo desde cerca de 6 a cerca de 8), as quais são todas disponíveis na Quest International, 1833 57th Street, Post Office Box 3917, Sarasota, Florida 34243. Também especialmente preferidas são a Lactase F (que é preferencialmente utilizada a um intervalo de pH de cerca de 4 a cerca de 6), e Lactase 50000 (intervalo de pH óptimo desde cerca de 4 a cerca de 6), ambas disponíveis através de Amano International Enzyme Co., Inc., Post Office Box 1000, Troy, Virginia 22974. Outras enzimas suplementares particularmente preferidas incluem a Gzyme G990 (pH óptimo desde cerca de 4 a cerca de 6) e Enzeco Fungal Lactase Concentrate (pH óptimo desde cerca de 4 a cerca de 6) disponível de Enzyme Development Corporation, 2 Penn Plaza, Suite 2439, New York, New York 10121; Lactozyme 3000L (que preferencialmente é utilizada a um intervalo de pH desde cerca de 4 a cerca de 6,5), disponível de Novo Nordisk

Bioindustrials, Inc., 33 Turner Road, Danbury, Connecticut 06813; Maxilact L2000 (que é preferencialmente utilizada a um intervalo de pH desde cerca de 4 a cerca de 6), disponível de Gist Brocades Food Ingredients, Inc., King of Prussia, Pennsylvania, 19406; e Neutral Lactase (que é preferencialmente utilizada a um intervalo de pH desde cerca de 6 a cerca de 8), disponível de Pfizer Food Science Group, 205 East 42nd Street, New York, New York 10017.

O intervalo de pH para conversão dos glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas é desde cerca de 3 a cerca de 9. O pH que é utilizado depende primariamente do tipo de enzima usada, e deve ser seleccionado em concordância. A enzima residual é activa dentro de um intervalo de pH desde cerca de 7 a cerca de 9, embora se acredite que o pH do extracto é diminuído no decurso da conversão.As enzimas suplementares são activas dentro de um intervalo óptimo de pH especificado pelo fabricante da enzima, como demonstrado acima para diversas enzimas específicas. Tipicamente as enzimas suplementares são activas quer num intervalo neutro de pH desde cerca de 6 a cerca de 8, ou num intervalo de pH acídico desde cerca de 3 a cerca de 6.

O pH pode ser ajustado ao valor desejado para conduzir o segundo passo de conversão da isoflavona. Em muitas circunstâncias o pH é reduzido a partir do pH relativamente elevado ou básico do primeiro passo de conversão da isoflavona pela adição de um ou mais ácidos adequados tais como ácido acético, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorídrico ou qualquer outro reagente adequado.

O intervalo de temperatura para o segundo passo de conversão de isoflavona é desde cerca de 5°C a cerca de 75°C. A temperatura afecta significativamente a actividade das enzimas, e por conseguinte, a velocidade de conversão. As enzimas supolementares podem ser activas acima de 70°C, por

exemplo Alpha-Gal 600L é activa a 75°C, contudo, é preferido conduzir a conversão a mais baixas temperaturas para evitar a desactivação de enzima. Numa forma de realização preferida, a conversão é efectuada entre cerca de 35°C e cerca de 45°C.

O tempo requerido para o segundo passo de conversão da isoflavona depende de factores relacionados com a enzima, particularmente a concentração, temperatura e pH do sistema. Na maior parte das circunstâncias é possível atingir uma conversão substancialmente completa em 24 horas, contudo é preferível que seja adicionada enzima suplementar para aumentar dramaticamente a velocidade de conversão da reacção. A enzima suplementar seleccionada, concentração de enzima, pH e temperatura causam de preferência conversão substancialmente completa em 2 horas, e mais preferencialmente em 1 hora.

Os graus de conversão muito elevados com este processo são tais que pelo menos uma maioria, e de preferência substancialmente todos, os glucósidos de isoflavona presentes no extracto, são convertidos na forma aglicona. O termo "uma amioria" refere-se a uma extensão de conversão de glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas de pelo menos cerca de 50%. O termo "substancialmente todos" refere-se a uma extensão de conversão de glucósidos de isoflavona nas agliconas isoflavonas de pelo menos cerca de 80%, e mais preferencialmente de pelo menos cerca de 90%.Tais velocidades altas de conversão são notáveis numa base dependente, e são desejáveis para aplicações comerciais.

Um material proteico enriquecido com aglicona isoflavona pode ser recuperado de um extracto enriquecido com aglicona isoflavona. Após completar o segundo passo de conversão da isoflavona, o pH é ajustado pela adição de

ácido, se necessário, próximo do ponto isoeléctrico para a proteína vegetal, para a proteian de soja geralmente entre 4,0 a cerca de 5,0 e preferencialmente entre cerca de 4,4 a cerca de 4,6. A proteína é precipitada do extracto com pH ajustadona forma de um coalho. Uma porção significativa das isoflavonas agliconas são capturadas no coalho. A seguir à precipitação, o coalho ou proteína precipitada é separada do extracto para formar um material de proteína enriquecido com agliconas isoflavonas. O material de proteína enriquecido com aglicona isoflavona é separado do extracto por centrifugação ou filtração.

Na forma de realização mais preferida, a lavagem do material d eproteína separado é evitada quer inteiramente ou minimizada de modo a reduzir substancialmente a remoção de isoflavonas agliconas do material de proteína. A lavagem do material de proteína com água pode por conseguinte ser evitada completamente, ou ser limitada a uma única lavagem com água durante a qual a razão de peso entre a água e o material de proteína está entre 2:1 a cerca de 6:1. A falta de lavagem do coalho precipitado fornece um material de proteína enriquecido com os níveis de sejados de isoflavonas, mesmo que possa ser realizada uma lavagem mais extensiva com menor recuperação de isoflavonas.

O material de proteína separado pode ser desidratado por centrifugação ou concentração ou uma combinação de ambos, e é seco de uma maneira convencional. Não se pretende que a forma de realização preferida seja limitada por algum modo de desidratação, embora seja preferido usar técnicas de desidratação e de secagem convencionais tais como a centrifugação e a secagem por atomização para formar um material proteico seco.

O processo de forma de realização preferido descrito previamente utiliza ambos o primeiro e segundo passo de conversão imediatamente depois da obtenção de um extracto. A invenção presente também inclui um processo no

qual um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína é extraído com um extractante aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico da proteína; o primeiro passo de conversão da isoflavona é realizado no extracto; um material proteico contendo glucósidos de isoflavona é separado do extracto; e o segundo passo de conversão de isoflavona é realizado no material de proteína. Os passos neste processo podem ser realizados da mesma maneira geral que a descrita acima.

A presente invenção inclui ainda um processo no qual é formada uma pasta aquosa de material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína, sendo o primeiro passo de conversão de isoflavona realizado na pasta aquosa; o material vegetal é extra´sido com um extractante aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico da proteína; e o segundo passo de conversão de isoflavona é realizado em glucósidos de isoflavona no extracto.A pasta aquosa de material vegetal contém preferencialmente até 20% de material vegetal em peso. Os passos deste processo podem ser realizados da mesma maneira geral que a descrita acima.

A presente invenção também inclui um processo em que um material de proteína vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína é exttraído através de um extracto aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico da proteína; um material proteico contendo conjugados de isoflavona é separado do extracto; uma pasta aquosa de material proteico é formada; e o primeiro e segundo passos de conversão são realizados na pasta aquosa do material proteico. A pasta aquosa de material proteico contém preferencialmente até 30% de material proteico em peso. Os passos deste processo podem ser realizados da mesma maneira que a descrita acima.

É observado que tanto o primeiro como o segundo passos de conversão de isoflavona podiam ser realizados num apasta aquosa de material

vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína, de acordo com um extracto de tal material vegetal, e com um material proteico separado de tal extracto. A presente invenção inclui combinação de qualquer dos processos precedentes para formar um material proteico enriquecido com aglicona de isoflavona.

Um material com teor elevado em genisteína e um teor elevado em daidzen pode ser produzido a partir do material proteico enriquecido com aglicona isoflavona recuperada.Tal como usado aqui, um teor elevado em genisteína é definido como um material vegetal contendo pelo menos 40% de genisteína, e mais preferencialmente pelo menos 90% de genisteína, além de material vegetal residual, que é material de soja residual se o material contendo teor elevado em genisteína for recuperado de soja. Um material contendo teor elevado em daidzen contém pelo menos 40% de daidzeína além de material vegetal residual, que é material de soja se o material com elevado teor em daidzeína é recuperado de material de soja.

O material proteico enriquecido com aglicona isoflavona pode ser inicialmente lavado e filtardo para remover sais e açúcares indesejáveis. O material de proteína enriquecido com aglicona isoflavona é misturado com água, numa proporção em que a água está presente até uma razão de 6.1 em relação ao material proteico. A água deverá ser fria para minimizar a solubilidade das isoflavonas agliconas na água, e preferencialmente ter uma temperatura desde cerca de 5°C até cerca de 30°C. O material proteico é misturado na água durante cerca de15 a cerca de 30 minutos, e de seguida o material proteico é filtrado da água usando quaisquer meios de filtração convencionais, preferencialmente filtrando a mistura através de papel de filtro convencional. O passo de lavagem e filtração pode se evitado, se desejado, para minimizar qualquer perda potencial de isoflavonas agliconas nas águas de lavagem.

O material proteico enriquecido com isoflavona aglicona pode então ser extraído com um álcool extractante para remover as isoflavonas agliconas do material proteico e produzir um extracto de aglicona isoflavona. Álcoois de baixo peso molecular tais como metanol, e particularmente etanol, são preferidos como componente álcool do extractante. Verificou-se que as isoflavonas agliconas são solúveis em praticamente todas as concentrações do extractante. As sioflavonas agliconas são particularmente solúveis quando o extractante contém entre 30% de álcool e cerca de 90% de álcool, e mais preferencialmente quando o extractante contém entre cerca de 60% de álcool e cerca de 80% de álcool. Embora o álcool aquoso seja o solvente preferido, outros solventes incluindo água, acetonitrilo, cloreto de metileno, acetona, e acetato de etilo podem ser usados para efectuar a extracção das isoflavonas agliconas do material proteico.

A extracção é realizada usando a quantidade mínima de extractante.É preferido que a razão de pesos do extractante em relação ao material proteico enriquecido com aglicona isoflavona não exceda 11:1. A extracção pode ser realizada por qualquer método convencional de extracção, incluindo extracção contracorrente, ou extracção dupla em que a razão de pesos dos extractos combinados para o material proteico não excede 11:1.

Numa forma de realização preferida, o material proteico é inicialmente extraído com etanol 80% sendo a razão de pesos de extractante para o material proteico de cerac de 6:1. De seguida o extractante é separado do material proteico por meios convencionais de separação, tais como nuam centrifuga ou numa prensa de filtração, e o extracto é recolhido. O material proteico é extraído novamente com etanol a 80%, sendo a razão de pesos do extractante para o material proteico de cerca de 4:1. O extracatante é outra vez recolhido e adicionado ao extracto inicial separado. O material proteico é então

lavado com um fluxo de água, em que a razão de peso da água para o material proteico é de cerca de 4:1, e a água é adicionada aos extractos recolhidos.

Embora a extracção possa ser realizada a qualquer pH, é preferido que o extractante tenha um pH de cerac de 7 a cerca de 10. A formação de gel proteico é evitada dentro de um intervalo de pH preferido, e, se o material proteico é para ser recuperado bem como o extracto de aglicona isoflavona, é evitada a formação de subprodutos aminoácidos dentro do material proteico dentro do intervalo de pH preferido.

A extracção pode ser realizada a qualquer temperatura até ao ponto de ebulição do extractante, e preferencialmente é conduzida entre cerca de 25°C e cerca de 70°C. A fim de efectuar a remoção máxima de aglicona sisoflavonas do material proteico, é preferido que a extracção seja realizada a uma temperatura entre cerca de 50°C a cerca de 70°C, mais preferencialmente a cerca de 60°C.

A seguir à extracção, pode ser separado do extracto de aglicona isoflavona um material com elevado conteúdo em genisteína e um material com elevado contéudo em daidzeína por contacto do material com um material adsorvente durante um tempo suficiente para separar os materiais com elevado conteúdo de genisteína e de daidzeína do extracto. Numa forma de realização preferida, os materiais com elevado conteúdo de genisteína e de daidzeína são separados do extracto por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (HPLC). A genisteína e a daidzeína são separadas de outras sioflavonas e de impurezas no extracto por eluição do extracto através de partículas de um material adsorvente que se liga de forma reversível à genisteína, daidzeína, outras isoflavonas, e impurezas de uma maneira específica para cada composto, permitindo consequentemente que cada um dos compostos seja separado.

O extracto de aglicona isoflavona é inicialmente filtrado para

remover material insolúvel que poderia obstruir uma coluna de HPLC. O extracto pode se rfiltrado por um método de filtração convencional. Mais preferencialmente o extracto é filtrado num processo de ultrafiltração convencional que também remove proteína residual que possa estar no extracto.

Uma coluna de HPLC é preparada por empacotamento de uma coluna de HPLC convencional comercialmente disponível com um material adsorvente particulado que ligará irreversivelmente a genisteína, a daidzeína, outras isoflavonas, e impurezas num composto de uma maneira específica. O material adsorvente pode ser qualquer material de empacatomento de HPLC de fase reversa , contudo pode ser escolhido um material de empacotamento preferido pelo critério da capacidade de carga, eficácia da separação, e custo. Um tal material de empacotamento preferido é o Kromasil C18 16mm 100 A (pérolas) disponível de Eka Nobel, Nobel Industries, Suécia.

O extracto filtrado é passado através de uma coluna de HPLC empacotada até que todos os sítios d eligação da coluna sejam completamente saturados com isoflavonas, o que é detectado pelo aparecimento de isoflavonas no efluente da coluna. A coluna de HPLC pode então ser eluída com um eluente polar para efectuar a separação. Numa forma de realização preferida, o eluente é um álcool aquoso. O eluente álcool aquoso pode ter um conteúdo de álcool de entre cerca de 30% a cerca de 90%, e preferencialmente tem um conteúdo de álcool de cerca de 50% para fornecer tanto uma boa separação como uma boa solubilidade das isoflavonas. O álcool é preferencialmente metanol ou etanol, em que o etanol é preferido quando for necessário usar os materiais com elevado teor em genisteína ou com elevado teor em daidzeína em produtos alimentares ou para aplicações farmacêuticas.

Os materiais com elevado teor em genisteína ou com elevado teor em daidzeína são recolhidos a partir do efluente da coluna. A fracção de eluente

contendo daidzeína elui da coluna em primeiro lugar, seguida por uma fracção de gliciteína, a qual é seguida pela fracção mais polar de genisteína. As fracções de daidzeína e de genisteína são recolhidas à medida que eluem da coluna. A fracção de gliciteína pode também ser recolhida, se desejado.

O álcool nas fracções pode ser removido por evaporação, após o que os materiais com elevado teor em genisteína e com elevado teor em daidzeína, e com elevado teor em gliciteína, pode se recuperado por métodos convencionais de separação tais como centrifugação ou filtração. O material com elevado conteúdo em genisteína contém pelo menos 40% de genisteína, e preferencialmente pelo menos 90% de genisteína, além de um material residual vegetal, que é material residual de soja se a genisteína é recuperada de um soro de leite de soja. O material recuperado com elevado teor em daidzeína contém pelo menos 40% de daidzeína, além de material vegetal residual.

PARTE EXPERIMENTAL

A presente invenção é ilustrada em maior pormenor pelos exemplos seguintes usando material de soja como material vegetal. Pretende-se que os exemplos sejam ilustrativos, e não deverão de algum modo ser interpretados como limitantes ou de outro modo restritivos no âmbito da invenção.

Tal como salientado acima, o material de soja inclui as "famílias" de isoflavonas da genisteína, daidzeína, e glicitina tendo os correspondentes membros glucósido, conjugado e aglicona, em que a família da genisteína contém os conjugados 6′-OMal genisteína e 6"-OAc genisteína, o glucósido genistina, e a aglicona genisteína; a família daidzeína contém os conjugados 6"-OMal daidzina e 6"-OAc daidzina, o glucósido daidzina, e a aglicona daidzeína; e a família gliciteína contém o conjugado 6"-OMal glicitina, o glucósido glicitina, e a aglicona gliciteína. Nas seguintes tabelas as concentrações relativas das

ioflavonas são medidas como uma percentagem de uma família de isoflavonas. Por exemplo, na família genisteína: % genistina + % 6"-OMal genistina + % 6"-OAc genistina + % genisteína = 100%. A extensão da conversão de conjugados em glucósidos, e glucósidos em agliconas pode ser determinada por comparação das percentagens de cada tipo de composto numa família de isoflavona.

EXEMPLO 1

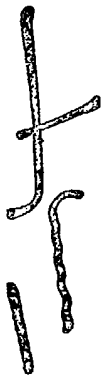
Numa primeira experiência, é examinada a conversão dos conjugados de isoflavona em glucósidos d eisoflavona num extracto de soja. A extensão da conversão é determinada pelo decréscimo quantitativo da percentagem de ésteres malonato e acetato de uma família de isoflavona acoplado ao aumento quantitativo correspondente da percentagem de glucósido da mesma família de isoflavona.

O extracto de soja é preparado através de uma pasta contendo 400 g dos flocos de soja finamente divididos com 4000 g de água. O pH é ajustado a 9,7 com hidróxido de sódio e a pasta é aquecida a 38°C durante 15 minutos com agitação. A pasta é então centrifugada e o extracto é recolhido como sobrenadante.

A conversão de conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona é examinada a diferentes condições de pH e temperatura. Os valores de pH de 600 g de amostras do extracto são ajustados a 6, 7, 9, e 11 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Para cada pH a amostra de 6oo g é dividida em duas amostras de 300 g, e estas amostras são incubadas a 45°C e 72,5°C durante 24 horas. É conduzida uma análise periódica de cada amostra a 0, 2, 4, 6, e 24 horas para determinar o conteúdo em isoflavona das amostras. A Tabela 1 mostra a alteração e distribuição de isoflavonas durante o curso da experiência.

TABELA 1

Amostra	Genistina	6"-OMal Genistina	6"-OAc Genistina	Genisteína	Daidzina	6"-OMal Daidzina	6"-Oac Daidzina	Daidzeína	Glicitina	6"-OMal Glicitina	Gliciteína
					PERCENTAGENS						
pH6, 45°C											
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	42	49	0	9	39	49	1	11	41	37	22
t=2 h	29	51	0	19	27	49	1	22	37	36	27
t=4 h	25	50	0	25	22	49	1	28	36	35	29
t=6 h	23	50	0	27	19	48	1	31	35	35	30
pH7, 45°C											
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	43	48	0	9	40	48	1	11	42	36	22
t=2 h	38	48	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=4 h	37	47	0	16	32	47	1	20	41	36	23
t=6 h	36	46	0	18	31	46	1	22	41	35	24
t=24 h	18	42	0	39	13	41	0	46	31	34	35



pH9, 45°C

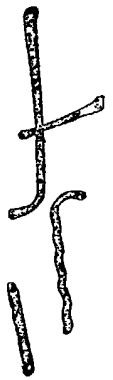
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	46	46	0	8	43	46	1	10	45	33	23
t=2 h	51	41	0	8	49	40	1	10	49	30	21
t=4 h	57	36	0	7	54	35	1	10	52	27	21
t=6 h	60	33	0	7	58	31	0	10	54	25	21
t=8 h	58	26	0	15	55	25	0	20	50	23	27

pH11, 45°C

t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	73	20	0	8	71	19	0	10	62	19	19
t=2 h	92	0	0	7	91	0	0	9	82	0	18
t=4 h	93	0	0	7	90	0	0	10	82	0	18
t=6 h	93	0	0	7	90	0	0	10	81	0	19
t=24 h	95	0	0	5	87	0	0	13	78	0	22

pH6, 72,5°C

t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	42	48	0	9	40	48	1	12	40	35	24
t=2 h	50	41	0	9	47	40	1	12	47	29	24
t=4 h	56	34	0	9	53	34	1	12	52	23	24
t=6 h	61	30	0	9	58	29	2	12	53	23	25
t=24 h	84	7	0	9	80	6	2	12	66	5	29



pH7, 72,5°C

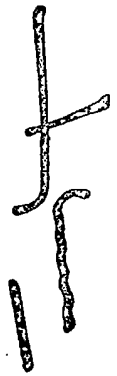
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	45	40	0	9	41	47	1	11	43	36	22
t=2 h	54	21	0	8	50	38	1	10	47	30	23
t=4 h	61	11	0	8	58	30	1	10	52	24	24
t=6 h	67	6	0	8	63	25	1	10	56	20	24
t=24 h	90	0	0	5	85	4	1	9	68	4	28

pH9, 72,5°C

t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	53	40	0	7	50	39	1	10	47	31	22
t=2 h	73	21	0	6	70	20	0	9	58	22	20
t=4 h	83	11	0	6	80	10	0	9	67	14	19
t=6 h	88	6	0	5	85	6	0	9	73	8	19
t=24 h	96	0	0	4	91	0	0	9	80	0	20

pH11, 72,5°C

t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 min	89	3	0	8	87	3	0	9	79	3	18
t=2 h	94	0	0	6	90	0	0	10	81	0	19
t=4 h	94	0	0	6	87	0	0	13	75	3	22
t=6 h	94	0	0	6	86	0	0	14	74	3	23
t=24 h	95	0	0	3	78	0	2	20	70	4	27



Tal como indicado pelo decréscimo da concentração relativa deos compostos conjugados de isoflavona de 6"-OMal e de 6"-OAc e aumento da concentração correspondente dos glucósidos genistina, daidzina, e glicitina, o priemiro passo de conversão é mais rápido e completo a condições de pH mais elevado, em condições mais básicas e a temperaturas mais elevadas.Ocorre conversão substancialmente completa de conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona nas amostras a pH 9 e a pH 11tanto a 45°C como a 72,5°C, contudo a daidzina e a glicitina foram degradadas a pH 11, 72,5°C. A conversão também prossegue quase até ser completa nas amostars ao pH 6 e 7 a 72,5°C. Ocorre uma conversão substancial dos glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas pela enzima residual no extracto nas amostars aos pH 6 e 7 a 45°C, embora a conversão dos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona não seja particularmente eficaz sob estas condições.

EXEMPLO 2

Numa segunda experi~encia, é examinada a conversão de glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas. A exdtensão da conversão é determinada pelo decréscimo quantitativo da percentagem do glucósido de uma família de isoflavonas acoplada com um aumento quantitativo correspondente da percentagem de aglicona da mesma família de isoflavona.

Um extracto enriquecido com glucósido de isoflavona é produzido a partir de flocos de soja por ajuste do pH de um extracto de soja a cerca de 11 a uma temperatura de cerca de 35°C durante cerca de 1 hora. Nas primeiras amostras, a conversão de glucósidos de isoflavona em agliconas isoflavonas é efectuada usando a enzima residual presente num extracto enriquecido com glucósido de isoflavona através do ajuste do pH das amostras ao pH 7,0 e pH 9,0 e conservação das amostras a 45°C durante 24 horas. A conversão dos glucósidos de isoflavona em aglicona sisoflavonas é efectuada usando enzimas

suplementares por doseamento de amostras de um extracto enriquecido com glucósidos de isoflavona com as seguintes enzimas suplementares comercialmente disponíveis: Biolactase 30,000, Quest Neutral Lactase, Lactase 50,000, Biotectinase 100L, e Alpha Gal 600. A quantidade de enzima adicionada a cada amostra é indicada na Tabela 2 abixo. O pH de cada amostra á ajustado a um valor no qual a enzima suplementar é activa, quer 4,0, 4,5, ou 7,0. As amostras são incubadas a intervalos de temperatura desde 35°C a 75°C. São retiradas amostras a tempos seleccionados e é medido o teor em isoflavona.

TABELA 2

Amostra	Genistina	6"-OMal Genistina	6"-OAc Genistina	Genisteina	Daidzina	6"-OMal Daidzina	6"-OAc Daidzina	Daidzeina	Glicitina	6"-OMal Glicitina	Gliciteina
					PERCENTAGENS						
Enzima Residual, pH 7,0, 45ºC											
t=0	94	1	1	5	93	1	0	6	75	2	23
t=3 h	94	1	1	5	93	1	0	6	75	2	22
t=6 h	84	1	1	14	86	1	1	13	73	3	24
t=24 h	29	1	1	69	42	2	2	54	45	3	53
Enzima Residual, pH 9,0,45ºC											
t=0	94	1	1	5	93	1	0	6	75	2	23
t=3 h	93	1	1	5	94	1	0	6	74	2	24
t=6 h	93	1	1	5	94	1	0	6	74	2	24
t=24 h	0	1	0	99	1	1	4	93	18	5	77
Lactase 50,000, pH 4,0,50ºC 0,12 g/100g extracto											
t=0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0
t=1 h	6	0	0	94	30	0	0	70	40	19	41

Biolactase 30,000, pH 4,5,35°C
0,05g/100g extracto

t=0	93	4	0	4	93	3	0	5	100	0	0
t=1 h	26	4	0	70	16	3	0	80	40	0	60
t=2 h	10	4	0	85	4	3	0	92	26	0	74
t=3 h	5	4	0	91	0	3	0	97	19	0	81

Alpha Gal 600, pH 4,5,75°C
10g/100g extracto

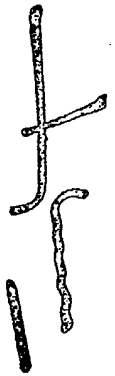
t=0	91	0	0	9	89	0	0	11	78	0	22
t=24h	1	0	0	99	0	0	2	98	0	0	100

Biopectinase 100L, pH 4,0,50°C
0,2g/100g extracto

t=0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0
t=1h	67	0	0	33	58	0	0	42	87	13	0

Quest Neutral Lactase, pH 7,0, 35°C
0,05g/100g extracto

t=0	93	4	0	4	93	3	0	5	100	0	0
t=1h	66	4	0	30	66	3	0	31	77	0	23
t=2h	50	4	0	46	51	3	0	46	67	0	33
t=3h	36	4	0	59	37	3	0	59	58	0	42
t=24h	1	4	0	95	0	3	0	97	0	0	100



Tal como foi demonstrado através da conversão de genistina, daidzina, e glicitina em genisteína, daizeína e gliciteína, respectivamente, é conseguida um aconversão substancialmente completa dos glucósidos de isoflavona nas agliconas isoflavonas. Algumas enzimas suplementares seleccionadas aumentam marcadamente a velocidade de conversão quando comparada com a conversão da enzima residual no extracto, efectuando conversão substancialmente completa dentro de 1 hora a uma concentração, temperatura e pH eficazes.

EXEMPLO 3

Noutra experiência, um material proteico enriquecido com aglicona isoflavona é recuperado de um extracto enriquecido com aglicona isoflavona e também um material proteico convencional é recuperado de um extracto convencional. O conteúdo em isoflavona nos materais proteicos recuperados de cada extracto é determinado a um pH de separação de 4,0, 4,5, e 5,0.

Um extracto de soja enriquecido com aglicona isoflavona é preparado por 1) extracção de flocos de soja desengordurados com uma solução aquosa alcalina; 2) ajuste do pH do extracto a 11 e manutenção do extracto a 35°C durante 1 hora para produzir um extracto enriquecido com aglicona isoflavona ; e 3) adição de 0,1% de Lactase 50,000 (Amano International Enzyme Co.) por peso de sólidos no extracto enriquecido com glucósido de isoflavona, o qual é então tratado a 5'°C e pH 4,5 durante 1 hora para produzir o extracto enriquecido com aglicona isoflavona. É também preparado um extracto de soja convencional, em que o extracto convencional é preparado por extracção de flocos de soja desengordurados com uma solução aquosa alcalina.

Uma amostra contendo 10 g de sólidos é obtida de cada extracto, e o pH das amostras de cada extracto é ajustado a 4,5. De cada amostra é separado um material proteico por centrifugação da amostra e decantação do sobrenadante soro de leite do material proteico. É então determinado o conteúdo em isoflavona do material proteico separado de cada amostra. A Tabela 3 mostra o conteúdo total de isoflavona em miligramas por amostra e a percentagem de cada tipo de isoflavona de uma família de isoflavona presente no material proteico de cada uma das amostras.

TABELA 3

Amostra	Genistina	6"-OMal Genistina	6"-OAc Genistina	Genisteina	Daidzina	6"-OMal Daidzina	6"-Oac Daidzina	Daidzeina	Glicitina	6"-OMal Glicitina	Gliciteina
MG/AMOSTRA											
Material proteico enriquecido com aglícona isoflavona, separação a pH 4,5											
Proteina	1,4	0,0	0,0	9,7	0,0	0,0	0,0	5,8	0,4	0,0	0,5
Material proteico convencional, separação a pH 4,5											
Proteina	1,6	4,3	0,0	1,6	0,7	2,3	0,0	1,2	0,0	0,4	0,4
PERCENTAGEM											
Material proteico enriquecido com aglícona isoflavona, separação a pH 4,5											
Proteina	13	0	0	87	0	0	0	100	49	0	51
Material proteico convencional, separação a pH 4,5											
Proteina	21	58	0	21	16	55	0	28	0	52	48



Comparando o conteúdo de isoflavona dom material proteico do extracto enriquecido co aglicona isoflavona e do material proteico do extracto convencional, pode ser observado que o material proteico obtido a partir do extracto enriquecido com aglicona isoflavona contém quantidades significativamente superiores das agliconas isoflavonas, particularmente genisteína e daidzeína, que o material proteico obtido a partir do extracto convencional. O material proteico obtido do extarcto convencional contém quantidades substanciais de conjugados de isoflavona que estão ausentes no material proteico enriquecido com aglicona isoflavona devido à conversão dos conjugados de isoflavona em agliconas isoflavonas no extracto enriquecido com aglicona isoflavona.

Nos exemplos acima, todas as percentagens indicadas para 6"-OMal-genistina, 6"-OAc-genistina, 6"-OMal-daidzina, 6"-OAc-daidzina, glicitina, 6"-Mal-glicitina, e gliciteína são valores calculados. As percentagens indicadas ou concentração de enzima são calculadas a partir de gramas de uma preparação das enzimas comerciais por 100 g de sólido em cada amostra. A seguir apresenta-se uma descrição de um método para quantificação de isoflavonas em produtos de soja. As isoflavonas são extraídas dos produtos de soja misturando 0,75 g de amostra (seca por atomização de pó finamente moído) com 50 mL de solvente metanol/água 80/20. A mistura é agitada durante 2 horas à temperatura ambiente com um agitador orbital. Após 2 horas, os materiais remanescentes não dissolvidos são removidos por filtração através de papel de filtro Whatman No. 42. Cinco mL do filtrado são diluidos com 4 mL de água e 1 mL de metanol.

As isoflavonas extraídas são separadas por HPLC (Cromatografia Liquida de Alta Eficiência) usando uma coluna de fase reversa Hewlett Packard

C18 Hypersil. As isoflavonas são injectadas na coluna e eluídas com um gradiente de solvente iniciando com uma mistura de 88% de metanol, 10% de água, 2% de ácido acético glacial e finalizando com 98% de metanol e 2% de ácido acético glacial. A uma velocidade d efluxo de 0,4 mL/min, todas as isoflavonas – genistina, 6"-O-acetilgenistina, 6"-O-malonilgenistina, genisteína, daidzina, 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-malonildaidzina, daidzina, glicitina e seus derivados e gliciteína- são claramente resolvidas. A detecção do pico é por absorvância no UV a 260 nm. A identificação dos picos foi reallizada por HPLC-espectrometria de massa.

A quantificação é conseguida usando padrões puros (genistina, genisteína, daidzina e daidzeína) comprados à Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ. Factores de resposta (área de integração/concentração) são calculados para cada um dos compostos acima descritos e são usados para quantificar as amostras desconhecidas. Em relação às formas conjugadas para as quais não existem disponíveis padrõe spuros, os factores de resposta considerados são os da molécula parente ma scorrigidos para a diferença de peso molecular.O factor de resposta para a glicitina é considerado o da genistina corrigido para a diferença de peso molecular.Este método fornece as quantidades de cada isoflavona individual. Por conveniência, a genisteína total, a daidzeína total e a gliciteína total pode ser calculadas, e representam o peso agregado destes compostos se todas as formas conjugadas forem convertidas nas suas respectivas formas não conjugadas.Estes totais podem também ser medidos directamente por um método que utiliza hidrólise ácida para converter as formas conjugadas.

Lisboa, 7 de Julho de 2000

JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para produzir um extracto enriquecido com uma aglicona isoflavona a partir de um material vegetal compreendendo:

extracção de um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína com um extractante aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico da referida proteína no referido material vegetal;

num primeiro passo de conversão, tratamento do referido extracto aquoso a uma temperatura desde 2°C a 121°C e um pH de desde 6 a 13,5 durante tempo suficiente para converter uma maioria dos referidos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona; e

num segundo passo de conversão, contacto de uma enzimam capaz de clivagem, das ligações glucosídicas com os referidos glucósidos de isoflavonas nos referidos extractos aquosos a uma temperatura desde 5°C a 75°C e um pH desde 3 a 9 durante tempo suficiente para converter os referidos glucósidos de isoflavona em aglicona sde isoflavona.

2. Um processo de acordo com a Reivindicação 1, em que a extracção é efectuada a um pH desde 6 a 10.

3. Um processo de acordo com a Reivindicação 1, em que o referido extracto aquoso é tratado a um pH de cerca de 9 e uma temperatura de cerca de 45°C a 75°C para converter os referidos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona.

4. Um processo de acordo com a Reivindicação 1, em que o referido extracto aquoso é tratado a um pH de cerca de 11 e uma temperatura desde 5°C a 50°C para converter os referidos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona.

5. Um processo de acordo com qualquer um das Reivindicações precedentes, em que o contacto de uma enzima com os referidos glucósidos de isoflavona compreende a adição de uma quantidade eficaz de uma enzima suplementar ao referido extracto aquoso contendo glucósidos de isoflavona.

6. Um processo de acordo com a Reivindicação 5, em que a referida enzima suplementar é uma enzima alfa-galactosidase, uma enzima beta-galactosidase, uma enzima gluco-amilase, uma enzima pectinase, ou uma combinação resultante.

7. Um processo de acordo com a Reivindicação 5 ou Reivindicação 6, em que a referida enzima suplementar é adicionada de tal modo que a concentração total de enzima presente no referido extracto aquoso é desde 0,1% a 10% por peso do referido material vegetal, numa base seca.

8. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, em que o referido material vegetal compreende um material de soja.

9. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, em que uma maioria dos referidos conjugados de isoflavona são convertidos em agliconas isoflavonas.

10. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindi-

cações precedentes, em que substancialmente todos os referidos conjugados de isoflavona e os referidos glucósidos de isoflavona são convertidos em agliconas isoflavonas.

11. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, compreendendo posteriormente o ajuste de pH do referido extracto enriquecido com a referida aglicona de isoflavona próximo do ponto isoeléctrico da referida proteína para precipitar um material proteico contendo proteína e as referidas agliconas isoflavonas.

12. Um processo de acordo com a Reivindicação 11, em que é evitada a lavagem do referido material proteico.

13. Um processo de acordo com a Reivindicação 11, em que o referido material proteico é lavado com água num aquantidade por peso que é menos de cerca de 6 vezes o peso do referido material de proteína precipitada.

14. Um processo para produzir um material proteico enriquecido com uma aglicona isoflavona a partir de um material vegetal compreendendo:

extracção de um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteian com um extractante aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico da referida proteína no referido material vegetal;

num primeiro passo de conversão, tratamento do referido extracto aquoso a uma temperatura desde 2°C a 121°C e um pH de desde 6 a 13,5 durante tempo suficiente para converter uma maioria dos referidos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona; e

separação de um material proteico contendo os referidos glucósidos de isoflavona a partir do referido extracto aquoso; e

num segundo passo de conversão, contacto dos referidos glucósidos de isoflavona no referido material proteico com uma enzima capaz de clivagem, das ligações glucosídicas a uma temperatura desde 5°C a 75°C e um pH desde 3 a 9 durante tempo suficiente para converter os referidos glucósidos de isoflavona em agliconas de isoflavona.

15. Um processo de acordo com a Reivindicação 14, em que a referida extracção é efectuada a um pH desde 6 a 10.

16. Um processo de acordo com a Reivindicação 14 ou Reivindicação 15, em que o referido extracto aquoso é tratado a um pH desde 9 a 11 e a um atemperatura desde 5°C a 75°C para converter os referidos conjugados de isoflavona nos referidos glucósidos de isoflavona.

17. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 14 a 16, em que a separação de um material proteico contendo os referidos glucósidos de isoflavona a partir do referido extracto aquoso compreende posteriormente o ajuste de pH do referido extracto aquoso próximo do ponto isoeléctrico do referido material proteico para precipitar o referido material proteico a partir do referido extracto.

18. Um processo de acordo com a Reivindicação 14, em que o contacto dos referidos glucósidos de isoflavona no referido material proteico com uma enzima compreende a adição de uma quantidade eficaz de uma enzima suplementar ao referido material proteico.

19. Um processo de acordo com a Reivindicação 18, em que a referida enzima suplementar é um aenzima alfa-galactosidase, uma enzima beta-galactosidase, uma enzima gluco-amilase, uma enzima pectinase, ou uma combinação resultante.

20. Um processo de acordo com a Reivindicação 18, em que a referida enzima suplementar é adicionada ao referido material proteico numa concentração desde 0,1% a 10% por peso do referido material proteico, numa base seca.

21. Um processo de acordo com a Reivindicação 14, em que o referido material vegetal é um material de semente de soja.

22. Um processo de acordo com a Reivindicação 14, em que a maioria dos referidos conjugados de isoflavona são convertidos em isoflavonas agliconas.

23. Um processo de acordo com a Reivindicação 14, em que substancialmente todos os referidos conjugados de isoflavona são convertidos em isoflavonas agliconas.

24. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, em que o material vegetal extraído está na forma de uma pasta aquosa contendo proteína e conjugados de isoflavona.

25. Um processo de acordo com a Reivindicação 24, em que a referida pasta aquosa contém até 20% por peso do referido material vegetal.

26. Um processo para produzir um material proteico enriquecido com aglicona isoflavona a partir de um material vegetal, compreendendo:

extracção de um material vegetal contendo conjugados de isoflavona e proteína com um extractante aquoso tendo um pH acima do ponto isoeléctrico da referida proteína no referido material vegetal;

separação de um material proteico contendo os referidos conjugados de isoflavona a partir do referido extracto;

formação de uma pasta aquosa do referido material proteico;

num primeiro passo de conversão, tratamento da referida pasta aquosa a uma temperatura desde 2°C a 121°C e um pH de desde 6 a 13,5 durante tempo suficiente para converter uma maioria dos referidos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona; e

num segundo passo de conversão, contacto dos referidos glucósidos de isoflavona cna referida pasta aquosa com uma enzima capaz de clivagem, das ligações glucosídicas com os referidos glucósidos de isoflavonas nos referidos extractos aquosos a um atemperatura desde 5°C a 75°C e um pH desde 3 a 9 durante tempo suficiente para converter os referidos glucósidos de isoflavona em agliconas de isoflavona.

27. Um processo de acordo com a Reivindicação 26, em que a extracção é efectuada a um pH desde 6 a 10.

28. Um processo de acordo com a Reivindicação 26, em que o referido material proteico é separado do referido extracto por ajuste do pH do referido extracto a um valor próximo do ponto isoeléctrico da referida proteína para precipitar o referido material proteico do referido extracto.

29. Um proceso de acordo com a Reivindicação 26, em que a referida pasta aquosa contém até cerca de 30% por peso do referido material proteico.

30. Um processo de acordo com a Reivindicação 26, em que a referida pasta aquosa é tratada a um pH desde 9 a 11 e a uma temperatura desde 5°C a 75°C para converter os referidos conjugados de isoflavona em glucósidos de isoflavona.

31. Um processo de acordo com a reivindicação 26, em que o contacto dos referidos glucósidos de isoflavona na referida pasta aquosa com uma enzima compreende a adição de uma quantidade eficaz de uma enzima suplementar à referida pasta.

32. Um processo de acordo com a Reivindicação 31, em que a referida enzima suplementar é uma enzima alfa-galactosidase, uma enzima beta-galactosidase, uma enzima gluco-amilase, uma enzima pectinase, ,ou uma combinação resultante.

33. Um processo de caordo com a reivindicação 31, em que a referida enzima suplementar é adicionada à referida pasta aquosa numa concentração desde 0,1% a 10% por peso do referido material vegetal, numa base seca.

34. Um processo de acordo com a Reivindicação 26, em que o referido material vegetal é material de semente de soja.

35. Um processo de acordo com a Reivindicação 26, em que a maioria dos referidos conjugados de isoflavona são convertidos em agliconas isoflavonas.

36. Um processo de acordo com a Reivindicação 26, em que substancialmente todos os referidos conjugados de isoflavona são convertidos em agliconas isoflavonas.

37. Um processo de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes, compreendendo de seguida:

extracção de um material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona por meio de um extractante para produzir um extracto enriquecido com aglicona isoflavona; e

contacto do referido extracto com um material adsorvente durante um tempo suficiente para separar um material com elevado conteúdo em genisteína a partir do referido extracto.

38. Um processo de acordo com a Reivindicação 37, em que o referido extractante é um álcool aquoso contendo desde 30% a 90% de álcool.

39. Um processo de acordo com a Reivindicação 37, em que o referido extractante tem um valor de pH próximo do ponto isoeléctrico da referida proteína no referido material proteico vegetal enriquecido com aglicona.

40. Um processo de acordo com a Reivindicação 37, em que o referido material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona é extraído com o referido extractante em que uma razão de pesos de extractante para o material não excede cerca de 11:1.

41. Um processo de acordo com a Reivindicação 37, em que o referido extracto é eluído através do referido material adsorvente com um eluente adequado para fazer contactar o referido extracto com o referido material adsorvente a fim de separar um material com elevado conteúdo em genisteína do referido extracto através da ligação reversível diferencial da referida genisteína no referido extracto ao referido material adsorvente.

42. Um processo de acordo com a Reivindicação 37, em que o referido material com elevado conteúdo em genisteína contém pelo menos 40% de genisteína.

43. Um processo de acordo com a Reivindicação 42, em que o referido material com elevado conteúdo em genisteína contém pelo emnos 90% de genisteína.

44. Um processo de acordo com a Reivindicação 37, compreendendo posteriormente a remoção de material proteico vegetal residual a partir do referido extracto.

45. Um processo de acordo com qualquer das Reivindicações 1 a 36, compreendendo ainda:

extracção do material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona com um extractante para produzir um extracto enriquecido com aglicona isoflavona; e

contacto do referido extracto com um material adsorvenet durante um tempo suficiente para separar um material com elevado conteúdo em daidzeína a partir do referido extracto.

46. Um processo de acordo com a Reivindicação 45, em que o referido extractante é um álcool aquoso contendo desde cerca de 30% a 90% de álcool.

47. Um processo de acordo com a Reivindicação 45, em que o referido extractante tem um valor de pH próximo do ponto isoeléctrico da referida proteína no referido material proteico vegetal enriquecido com aglicona isoflavona.

48. Um processo de acordo com a Reivindicação 45, em que o referido material proteico vegetal enriquecido com a aglicona isoflavona é extraído com o referido extractante em que a razão de peso do extractante para o material não excede 11:1.

49. Um processo de acordo com a Reivindicação 45, em que o referido extracto é eluído através do referido material adsorvente com um eluente para contactar o referido extracto com o referido material adsorvente a fim de separar material com elevado conteúdo em daidzeína do referido extracto por libertação diferencial reversível dfa ligação da referida daidzeína ao referido material adsorvente.

50. Um processo de acordo com a Reivindicação 45 em que o referido material com elevado conteúdo em daidzeína contém pelo menos 40% de daidzeína.

51. Um processo de acordo com a Reivindicação 45 compreendendo posteriormente a remoção do material proteico vegetal residual do referido extracto.

Lisboa, 7 de Julho de 2000

JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA