(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 29 931 T3** 2006.12.21

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 804 462 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 29 931.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/10697**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 931 284.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/010530**
(86) PCT-Anmeldetag: **21.09.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **20.04.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.11.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2002**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **14.06.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.12.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 1/30*** (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
135196 **12.10.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE, DE, FR, GB, IT, NL

(73) Patentinhaber:
Archer Daniels Midland Co., Decatur, Ill., US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
SHEN, Jerome L., St. Louis, US; BRYAN, Barbara A., University City, US

(54) Bezeichnung: **AGLUCON-ISOFLAVON-ANGEREICHERTER PFLANZICHER PROTEINEXTRAKT, ISOLAT UND HERSTELLUNGSPROZESS**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

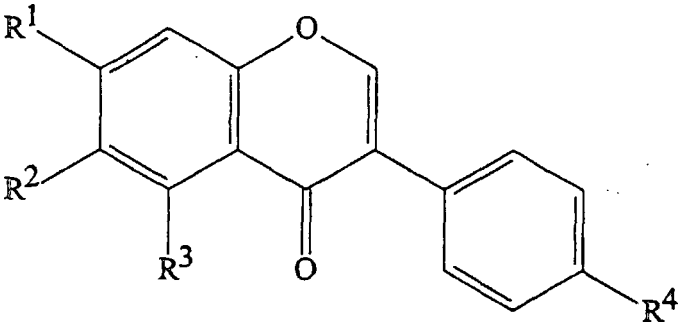
[0001] Die gegenwärtige Erfindung bezieht sich auf die Herstellung eines Extrakts und Isolierung (Isolat), angereichert mit Aglucon Isoflavonen, durch Extraktion von löslichem Material aus einem Pflanzenproteinmaterial und Behandlung mit einem oder mehreren beta-Glucosidaseenzymen unter derartigen Bedingungen, daß eine Mehrheit der Glucon Isoflavone zu Aglucon Isoflavonen umgewandelt wird, die in der Proteinisolierung zurückgehalten werden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Isoflavone treten in einer Mannigfaltigkeit von Hülsenfrüchten, einschließlich Pflanzenproteinmaterialien, wie Sojabohnen, auf. Diese Verbindungen schließen ein Daidzin, 6''-OAe Daidzin, 6''-OMal Daidzin, Daidzein, Genistin, 6''-OAe Genistin, 6''-OMal Genistin, Genistein, Glycitin, 6''-OAc-Glycitin, 6''-OMal Glycitin, Glycitein, Biochanin A, Formononetin und Coumestrol. Typischerweise sind diese Verbindungen mit dem inhärenten, bitterem Aroma von Sojabohnen assoziiert, und bei der Herstellung von kommerziellen Produkten, wie Isolaten und Konzentraten, ist der Fokus gewesen, diese Materialien zu entfernen. Beispielsweise werden in einem herkömmlichen Verfahren für die Herstellung einer Sojabohnenproteinisolierung, bei dem Sojaflocken mit einem wäßrigen alkalischen Medium extrahiert werden, viele der Isoflavone in dem Extrakt solubilisiert und verbleiben in der Molke solbilisiert, die üblicherweise im Anschluß an Säurefällung des Proteins unter Bilden einer Isolierung verworfen wird. Restliche Isoflavone, die in der Säure gefällten Proteinisolierung belassen sind, werden üblicherweise durch umfassendes Waschen der Isolierung entfernt.

[0003] Es ist kürzlich erkannt worden, daß die Isoflavone, enthalten in Pflanzenproteinen, wie Sojabohnen, das Wachstum von Humankrebszellen, wie Brustkrebszellen und Prostatakrebszellen, inhibieren können, wie in den folgenden Artikeln beschrieben: „Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells, Independence from Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance Gene" von Peterson and Barnes, Biochemical and Biophysical Research, Communications, Band 179, Nr. 1, Seiten 661-667, Aug. 30, 1991: „Genistein and Biochanin A Inhibit the Growth of Human Prostate Cancer Cells but not Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Autophosphorylation" von Peterson and Barnes, The Prostate, Band 22, Seite 335-345 (1993); und „Soybeans Inhibit Mammary Tumors in Models of Breast Cancer" von Barnes et al., Mutagens and Carcinogens in the Diet, Seite 239-253 (1990).

[0004] Von den zuvor angegebenen Isoflavonen existieren einige als Glucoside oder als Glucone mit einem Glucosemolekül angefügt. Einige der Glucone, wie das 6''-OAc Genistin, enthalten eine Acetatgruppe, angefügt an die Position sechs des Glucosemoleküls selbst. Während alle Isoflavone, einschließlich der Glucoside, von Interesse in medizinischer Bewertung sind, sind die spezifischen Isoflavone von meistem Interesse die Aglucone, wobei das Glucosemolekül nicht angefügt ist. Diese Isoflavone sind nicht so wasserlöslich wie die Glucone oder Isoflavonglucoside. Spezifische Isoflavone in dieser Kategorie sind Daidzein, Genistein und Glycitein. Diese Aglucone haben die folgende allgemeine Formel:



wobei R_1, R_2, R_3 und R_4 ausgewählt sein können aus der Gruppe, bestehend aus H, OH und OCH_3. Die gegenwärtige Erfindung richtet sich deshalb auf die Aglucone und Anreicherung einer Pflanzenproteinisolierung mit diesen Materialien.

[0005] Verfahren sind in der Technik zum Umwandeln von Glucon Isoflavonen in Aglucon Isoflavone bekannt, wie in Japanischer Patentanmeldung 258 669 von Obata et al. beschrieben. Derartige Verfahren erzielen nur ein mäßiges Ausmaß von Umwandlung und sind so nicht wünschenswert, insbesondere für kommerzielle Operationen in großem Umfang. Zusätzlich lehren bekannte Verfahren, wie in der '669 Anmeldung' beschrieben,

Entfernen der Isoflavone von dem Proteinmaterial und beschreiben nicht, wie ein Aglucon Isoflavon angereicherter Proteinextrakt oder Isolierung herzustellen ist. Somit besteht ein Verlangen nach einem Verfahren zum Umwandeln von mindestens einer Mehrheit und vorzugsweise im weswentlichen aller Glucon Isoflavone zu Aglucon Isoflavonen, und zum Herstellen eines Aglucon Isoflavon angereicherten Proteinextrakts und Isolierung.

[0006] Matsuura et al.: 'β-Glucosidase from Soybeans Hydrolyse Daidzin and Genistin', Journal of Food Science, Band 58, Nr. 1, 1993, Seiten 144-147 offenbart Verwenden von sterilisierter Sojamilch als ein Substrat zum Testen der Aktivität von β-Glucosidaseenzymen. Experimente in dieser Entgegenhaltung zeigen, daß die Isoflavonglucoside Daidzin und Genistin in Sojamilch durch β-Glucosidaseenzyme hydrolysiert werden. In einem Beispiel betrugen die Prozent Hydrolyse 28% für Daidzin und 29% für Genistin.

[0007] US-A-4 064 277 offenbart, daß restliches β-Glucosidaseenzym, enthalten in ganzen Sojabohnen, mit Glycosidsubstraten unter Bilden von beispielsweise Daidzein und Glycitein reagiert. Diese Entgegenhaltung lehrt, daß Verarbeiten von Sojabohnen, bevor die β-Glucosidase inaktiviert wird, in der Anwesenheit eines konkurrierenden Inhibitors für β-Glucosidase bewirkt werden sollte, um ein Sojabohnenprodukt zur Verfügung zu stellen, daß nicht eine Kehle fangende Sensation erzeugt.

[0008] US-A-4 889 921 offenbart ein Verfahren zum Herstellen einer Pflanzenproteinisolierung, insbesondere aus Rapssamen-oder Canolamaterial, durch Extrahieren mit einem wäßrigen Lösungsmittel unter Bilden einer Extraktionslösung, Einstellen des pH unter Fällen von Proteinen aus der Lösung und Trennen des gefällten Proteins durch Ultra- oder Diafiltration unter Bilden einer Pflanzenproteinisolierung.

[0009] Coward et al.: 'Genistein, Daidzein and their β-Glycoside Conjugates: Antitumor Isoflavones in Soybean Foods from Anerican and Asian Diets", Journal of Agricultural Food Chemistry, Band 41, Nr. 11, 1993, Seiten 1961-1967 offenbart, daß Sojaproteinisolierung, hergestellt durch Solubilisierung von Proteinen und löslichen Kohlehydraten aus Sojamehl durch eine alkalische (pH 9,5) Extraktionsstufe und anschließende Säurefällung (pH 4,5) des extrahierten Proteins Isoflavonkonzentrationen enthält, die 4-6 fach geringer als in Sojamehl oder Sojaproteinkonzentrat sind, wenn als Milligramm pro Gramm Protein ausgedrückt.

[0010] Es ist deshalb eine Aufgabe der gegenwärtigen Erfindung, einen Aglucon Isoflavon angereicherten Extrakt und Proteinisolierung zur Verfügung zu stellen, und ein Verfahren zum Herstellen dieser. Diese und andere Aufgaben werden im einzelnen in der detaillierten Beschreibung der gegenwärtigen Erfindung, im nachfolgenden dargestellt, erzielt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die gegenwärtige Erfindung liefert einen Aglucon Isoflavon angereicherten Pflanzenproteinextrakt und Isolierung und Verfahren zum Herstellen dieser. Das Verfahren zum Herstellen derartiger Extrakte umfaßt Extrahieren eines Pflanzenproteinmaterials, umfassend Glucon Isoflavone, mit einem wäßrigen Extraktionsmittel mit einem pH über etwa dem isoelektrischen Punkt des Pflanzenproteinmaterials unter Herstellen eines wäßrigen Extrakts, umfassend Protein- und Glucon Isoflavone, und Umsetzen der Glucon Isoflavone mit einer ausreichenden Menge mindestens eines von beta-Glucosidase und Esterase für eine Zeitdauer, Temperatur und pH, ausreichend, eine Mehrheit der Glucon Isoflavone in dem Extrakt zu Aglucon Isoflavonen umzuwandeln und dadurch den Aglucon Isoflavon angereicherten Extrakt herzustellen. Die gegenwärtige Erfindung liefert auch Verfahren zum Herstellen derartiger Extrakte, wobei ergänzende beta-Glucosidase zu dem Extrakt unter Herstellen von Aglucon Isoflavon angereichertem Extrakt hinzugegeben wird. Die gegenwärtige Erfindung liefert ferner Verfahren zum Erhalten einer Aglucon angereicherten Proteinisolierung durch Einstellen des pH des zuvor beschriebenen Extrakts auf etwa den isoelektrischen Punkt des Proteinmaterials unter Fällen des Proteinmaterials und Herstellen einer Proteinisolierung, die mit Aglucon Isoflavonen angereichert ist. Die sich ergebende mit Aglucon Isoflavon angereicherte Isolierung kann dann getrennt und entwässert werden unter Bilden einer getrockneten angereicherten Isolierung. Die gegenwärtige Erfindung liefert zusätzlich Verfahren zum Gewinnen von in relativ hohen Anteilen Isoflavonen aus Pflanzenproteinmaterialien.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0012] Obwohl die gegenwärtige Erfidnung im Hinblick auf Sojabohnenprodukte beschrieben wird, und obwohl das Verfahren besonders geeignet für die Herstellung von Aglucon Isoflavon angereicherten Extrakten und Isolierungen von Sojabohnenmaterial geeignet ist, ist nichtsdestoweniger das gegenwärtige Verfahren allgemein auf die Herstellung von Proteinextrakten und Isolierungen aus einer Mannigfaltigkeit von Pflanzenpro-

teinquellen, die Isoflavone enthalten, anwendbar. Ein Beispiel einer derartigen Quelle ist ein Pflanzenproteinmaterial, umfassend Sojabohne und Sojabohnenmaterial. Der Ausdruck „Sojabohnenmaterial", wie hier verwendet, bezieht sich auf Sojabohnen oder irgendein Sojabohnenderivat.

[0013] Das Ausgangsmaterial in Übereinstimmung mit dem Extrakt oder Isolierung bevorzugter Ausführungsform ist Sojabohnenflocken, von denen das Öl mittels Lösungsmittelextraktion entfernt worden ist. Die Flocken werden mit einem wäßrigen Extraktionsmittel mit einem pH über etwa dem isoelektrischen Punkt des Proteinmaterials, vorzugsweise einem pH von etwa 6,0 bis etwa 10,0 und am bevorzugtesten einem pH von etwa 6,7 bis etwa 9,7, extrahiert. Typische alkalische Reagenzien können gewünschtenfalls zum Erhöhen des pH des wäßrigen Extraktionsmittels, wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid und Calciumhydroxid, verwendet werden. Die gewünschten Isoflavonverbindungen werden typischerweise in dem wäßrigen Extrakt solubilisiert. Es ist auch wünschenswert, um die Gewinnung dieser Verbindungen in dem wäßrigen Extrakt zu maximieren, daß das Gewichtsverhältnis von Sojabohnenflocken zu Extrakt auf spezifische Niveaus kontrolliert wird, um so viel der inhärenten Isoflavone in dem Proteinmaterial, wie möglich, zu solubilisieren.

[0014] Extraktion der Proteine und Isoflavone kann in einer Mannigfaltigkeit von Wegen, einschließlich Gegenstromextraktion der Flocken, bei einem Gewichtsverhältnis von wäßrigem Extraktionsmittel zu Flocken von etwa 8:1 bis etwa 16:1 durchgeführt werden, wobei der anfängliche Extrakt verwendet wird, die Flocken zu extrahieren und einen wäßrigen Extrakt von Protein und Isoflavonen zur Verfügung zu stellen. Alternativ kann ein Zweistufenextraktionsverfahren verwendet werden, bei dem das Gewichtsverhältnis von Extraktionsmittel zu Flocken in der anfänglichen Stufe etwa 10:1 umfaßt, und dann eine zweite Extraktion der Flocken mit frischem Extraktionsmittel bei einem Gewichtsverhältnis von Extraktionsmittel zu Flocken von etwa 6:1 oder weniger stattfindet, so daß das kombinierte Gewichtsverhältnis von Extraktionsmittel zu Flocken in beiden Stufen nicht ein Gesamtgewichtsverhältnis von Extraktionsmittel zu Flocken von etwa 16:1 übersteigt.

[0015] Nach Entfernung von unlöslichen Materialien wird der sich ergebende wäßrige Proteinextrakt, umfassend solubilisierte Isoflavone, dann mit einem oder mehreren beta-Glucosidase Enzymen umgesetzt, um eine Mehrheit und vorzugsweise im wesentlichen alle der Isoflavone in Gluconform, mit einem Glucosemolekül angefügt, zu einem Aglucon Isoflavon umzuwandeln. Der optimale pH Bereich für die beta-Glucosidaseenzyme variiert in Abhängigkeit von dem verwendeten spezifischen beta-Glucosidaseenzym, aber variiert typischerweise zwischen etwa 4 und etwa 8. Der pH des Extrakts wird typischerweise auf etwa den pH Bereich eingestellt, bei dem das spezifische Enzym am aktivsten vor Reaktion mit dem Enzym ist. Der pH wird typischerweise eingestellt durch die Zugabe einer eßbaren Säure, wie Essigsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salzsäure oder irgendeinem anderen geeigneten Reagenz.

[0016] Das beta-Glucosidaseenzym kann natürlicherweise in dem Sojabohnenmaterial vorhanden sein oder von mikrobiellem Wachstum vorhanden sein, hier als „restliches" Enzym bezeichnet, oder kann zu dem Proteinextrakt hinzugegeben werden. Auf hinzugefügtes Enzym wird hier als „Ergänzungsenzym" bezug genommen. Allgemein, wenn die Konzentration von restlichem Enzym in dem Sojabohnenmaterial oder Extrakt unzureichend ist, eine Mehrheit, und vorzugsweise im wesentlichen alle der Isoflavone in Gluconform zu Agluconform umzuwandeln, dann sollte Ergänzungsenzym hinzugefügt werden. Die Menge von Enzym, ausreichend, die Umwandlung von Isoflavonen durchzuführen, variiert bei einer Vielheit von Faktoren, einschließlich der Arten von vorhandenen Enzymen, Verteilung von Enzymkonzentrationen, pH des Systems und Aktivitäten von vorhandenen Enzymen. Sowie einmal ausreichende Konzentrationen von Enzymen vorhanden sind, entweder über restliche Enzyme, Ergänzungsenzyme oder beide, wird der Proteinextrakt mit solubilisierten Isoflavonen mit beta-Glucosidaseenzymen für eine Zeitdauer, Temperatur und pH umgesetzt, ausreichend, eine Mehrheit und vorzugsweise im wesentlichen alle der in dem Extrakt enthaltenen Gluconisoflavone zu der Agluconform umzuwandeln.

[0017] Bevorzugte ergänzende beta-Glucosidaseenzyme schließen Biopectinase 100L und 300L, Biopectinase OK 70L, Lactase F und Lactozyme ein. Lactase F ist von Amano International Enzyme Co., Inc., P.O. Box 1000, Troy, VA 22974 erhältlich, das einen optimalen pH Bereich von etwa 4 bis etwa 6 hat, und Lactozyme ist erhältlich von Novo Industries, Enzyme Division, Novo Alle, DK-2880 Bagsvaerd, Dänemark, das einen optimalen pH Bereich von etwa 7 hat. Biopectinase 100L, Biopectinase 300L und Biopectinase OK 70 L sind von Quest International, Sarasota, Florida erhältlich. Ergänzungsenzyme werden in Mengen hinzugegeben, ausreichend, eine Mehrheit und vorzugsweise im wesentlichen alle der Glucon Isoflavone zu Agluconen umzuwandeln. In Fällen, wo es notwendig ist, Ergänzungsenzyme hinzuzufügen, beträgt die Menge von hinzugefügtem Enzym etwa 0,5 Gew.% bis etwa 5 Gew.% des Proteinpräzipitats auf einer Trockenbasis.

[0018] Eine andere Klasse von geeigneten Enzymen ist diejenige von Esteraseenzymen. Von diesen Enzy-

men nimmt man an, daß sie gut geeignet für die hier beschriebenen Verfahren bevorzugter Ausführungsformen sind, da sie die Acetat- und Malonatkonjugate zu Glucon Isoflavonen umwandeln durch Entfernen der Acetat- und Malonatgruppen von den Isoflavonkonjugaten. Bei der bevorzugtesten Ausführungsform werden beide Arten von Enzymen, beta-Glucosidase und Esterase Enzyme, verwendet.

[0019] Die Verfahren der bevorzugten Ausführungsform sind vorzugsweise Einstufen-Verfahren und erzielen sehr hohe Grade von Umwandlung von Isoflavonen (von Gluconform zu Agluconform) in relativ kurzen Zeitdauern und mit relativer Leichtigkeit und Ökonomie. Der Ausdruck „Einstufen" Reaktionsverfahren, wie hier verwendet, bezieht sich auf ein Reaktionsverfahren, bei dem bestimmte Verfahrensparameterwerte allgemein über den Verlauf des Reaktionsverfahrens erhalten bleiben. Diese Verfahrensparameter schließen pH und Temperatur ein.

[0020] Die sehr hohen Umwandlungsgrade sind derartig, daß eine Mehrheit und vorzugsweise im wesentlichen alle der Isoflavone in Gluconform, vorhanden in dem Sojabohnenmaterialextrakt, zu Agluconform umgewandelt werden. Der Ausdruck „eine Mehrheit" bezieht sich auf das Umwandlungsausmaß von Glucon Isoflavonen zu Aglucon Isoflavonen von mindestens etwa 50%. Der Ausdruck „im wesentlichen alles" bezieht sich auf das Umwandlungsausmaß von Glucon Isoflavonen zu Aglucon Isoflavonen von mindestens etwa 80% und am bevorzugtesten mindestens etwa 90%.

[0021] Obwohl nicht gewünscht ist durch irgendeine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, daß die überraschend und unerwartet hohen Umwandlungsgrade der hier beschriebenen Verfahren aus einer Kombination von Verfahrensparametern, verwendet während des Einstufen-Reaktionsverfahrens, herrühren. Es ist bevorzugt, daß der pH des Reaktionssystems beibehalten bleibt oder annähernd so bei einem Wert von etwa 4 bis etwa 8 und am bevorzugtesten bei einem Wert, bei dem das (die) Enzyyme äußerst aktiv vor Reaktion mit dem (den) Isoflavonkonjugat(en) während des Einstufen-Reaktionsverfahrens sind. Es ist bevorzugt, daß die Temperatur des Reaktionssystems beibehalten bleibt oder annähernd so bei einer Temperatur von etwa 40°C bis etwa 60°C und am bevorzugtesten bei einer Temperatur von etwa 60°C während des Einstufen-Reaktionsverfahrens. Allgemein, die Zeitdauer, die notwendig sind zum Erzielen von Umwandlung von im wesentlichen allen Glucon Isoflavonen zu Agluconen über die hier beschriebenen Einstufenverfahren sind von etwa 2 Stunden bis etwa 24 Stunden.

[0022] Nach Reaktion mit einem oder mehreren beta-Glucosidaseenzymen wird der pH auf den isoelektrischen Punkt für Sojabohnenprotein, im allgemeinen zwischen etwa 4,0 bis etwa 5,0 und vorzugsweise zwischen etwa 4,4 bis etwa 4,6, durch die Zugabe einer Säure eingestellt. Einstellung des pH auf den isoelektrischen Punkt fällt das Protein in der Form eines Quarks, der mit den weniger löslichen Agluconen angereichert ist. Im Anschluß an Fällung wird der Quark oder gefälltes Protein von der Molke getrennt, wie durch Zentrifugation, unter Bilden einer mit Aglucon Isoflavonen angereicherten Proteinisolierung.

[0023] In der bevorzugten Ausführungsform wird Waschen des gefällten Proteinmaterials entweder gänzlich vermieden oder minimiert, um im wesentlichen Entfernung der Aglucon Isoflavone von dem Proteinpräzipitat zu reduzieren, wodurch eine Aglucon Isoflavon angereicherte Isolierung zur Verfügung gestellt wird, obwohl die Aglucone weniger löslich in Wasser als andere Isoflavone sind. Waschen des Säure gefällten Proteins mit Wasser kann deshalb vollständig vermieden werden oder auf ein einzelnes Waschen mit Wasser begrenzt werden, währenddessen das Gewichtsverhältnis von Wasser zu gefälltem Proteinmaterial zwischen etwa 2:1 bis etwa 6:1 ist. Der Mangel von Waschen des Säure gefällten Quarks liefert eine Isolierung, angereichert mit den gewünschten Spiegeln von Isoflavonen, obwohl umfassenderes Waschen mit einer geringeren Gewinnung von Isoflavonen durchgeführt werden könnte. Die mäßige Menge von Waschen liefert eine Proteinisolierung mit einem Trockenbasisgehalt von etwa 1,5 bis etwa 3,5 mg/Gramm Genistein und einem Daidzein Gehalt von etwa 1,0 bis etwa 3,0 mg/Gramm.

[0024] Das Säure gefällte Protein wird dann entwässert durch eine Kombination von Zentrifugation oder Konzentration und wird in einer herkömmlichen Weise getrocknet. Die bevorzugte Ausführungsform soll nicht auf ein bestimmtes Mittel zum Entwässern beschränkt werden, obwohl es bevorzugt ist, herkömmliche Trocknungstechniken, wie Sprühtrocknen, unter Bilden einer getrockneten Isolierung zu verwenden. Die hier beschriebenen Verfahren liefern Isolierungen, die erhöhte Mengen von Aglucon Isoflavonen haben.

[0025] Die gegenwärtige Erfindung liefert auch Verfahren zum Gewinnen von Isoflavonen in sehr hohen Anteilen aus einem Pflanzenproteinmaterial, wie einem Sojabohnenmaterial. Die Gewinnungsspiegel, erhältlich durch die hier beschriebenen Verfahren, sind typischerweise mindestens 50%, vorzugsweise 65% und am bevorzugtesten 80%, basierend auf dem Gesamten aller Formen des bestimmten Isoflavons in dem Ausgangs-

pflanzenproteinmaterial. Obwohl es nicht gewünscht ist, durch irgendeine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, daß die hohen Gewinnungen von den hier beschriebenen Umwandlungsreaktionen, gekoppelt mit den verschiedenen auch beschriebenen Verarbeitungsverfahren, stammen. Durch Umwandeln von Glucon Isoflavon Konjugaten, die relativ löslich sind, zu weniger löslichen Agluconformen bei einer bestimmten Verarbeitungsstufe ist es möglich, in dem sich ergebenden Produkt einen hohen Prozentsatz der Isoflavone aus dem Beschickungsmaterial zu gewinnen.

[0026] Die folgenden Beispiele beschreiben spezifische aber nicht beschränkende Ausführungsformen der gegenwärtigen Erfindung.

EXPERIMENTELLES

[0027] Proben wurden hergestellt durch Hinzufügen von 5 Gramm extrahierten, entfetteten Sojabohnenflocken (Mehl) zu 5 Gramm Wasser und der pH auf 7 und auf 8 eingestellt. 0,25 Gramm Lactase F oder Lactozyme wurden zu jeder der Suspensionen gegeben, so daß die Enzymkonzentration etwa 5 Gew.% der Feststoffe in jeder Probe betrug. Proben wurden bei 40°C und bei 60°C inkubiert. Eine Unterprobe wurde abgezogen, bevor Enzym (t=0) hinzugegeben wurde und nach 24 Stunden Inkubation bei der Zieltemperatur. Die Änderung und Prozent Verteilung von Isoflavonen in Sojabohnenflocken (Mehl) nach der 24 Stunden Inkubationsperiode mit entweder Lactase F oder Lactozyme ist in Tabelle 1 gezeigt. Die Proben wurden nicht vor Hinzufügen von Ergänzungsenzym sterilisiert, und mikrobielles und Kontaminantenwachstum wurde nicht inhibiert.

TABELLE 1

Probe	Genistin %	6''-OMAL Genistin %	6''-OAC Genistin %	Genistein %	Daidzin %	6''-OMAL Daidzin %	6''-OAC Daidzin %	Daidzein %	Glycitin %	6''-OMAL Glycitin %	Glycitein %
t=0	16	80	0	4	16	79	1	3	22	62	16
pH 7,0, 40°C, t=24											
kein hinzugefügtes Enzym	4	48	0	48	3	51	0	46	0	42	58
Lactase F	2	39	0	59	2	41	0	57	0	30	70
Lactozyme	3	45	0	51	2	49	1	48	0	40	60
pH 7,0, 60°C, t=24											
kein hinzugefügtes Enzym	5	22	0	73	7	33	0	60	4	21	75
Lactase F	10	32	0	59	10	35	3	52	6	23	71
Lactozyme	4	22	0	74	5	33	0	62	0	23	77
pH 8,0, 40°C, t=24											
kein hinzugefügtes Enzym	4	49	0	47	3	50	2	45	0	43	57
Lactase F	3	39	0	58	3	40	3	55	0	29	71
Lactozyme	5	46	0	49	4	48	0	47	0	40	60
pH 8,0, 60°C, t=24											
kein hinzugefügtes Enzym	2	14	0	84	3	26	3	70	0	15	85
Lactase F	6	24	0	80	8	30	3	59	5	22	74
Lactozyme	2	14	0	84	3	24	6	67	0	16	84

[0028] Diese Daten zeigen den Umwandlungsgrad, erzielbar durch eine Kombination von restlichem(en) En-

zym(en) und Ergänzungsenzym(en). Quelle von restlichem Enzym kann mikrobielles Wachstum oder endogene Sojabohnenenzyme sein. Beträchtliche Umwandlung von Isoflavonkonjugaten zu Agluconen trat in Sojabohnenflocken (Mehl), inkubiert bei einem pH von 8, 60°C und für 24 Stunden auf. Die Konzentration von jedem Typ von Isoflavon, hier beschrieben, basiert auf dem Gesamten aller Formen jenes Isoflavon Typs.

[0029] Ein anderer Satz von Proben wurde hergestellt durch Bilden von 16% wäßrigen Suspensionen von entfetteten Sojabohnenflocken. Die Proben wurden auf pH 4,5 und 7 eingestellt und bei 45°C 24 Stunden lang inkubiert. Unterproben wurden bei 0 und 24 Stunden genommen. Alle Proben wurden in bezug auf Isoflavon Gehalt analysiert. Tabelle 2 zeigt die Änderung an Prozent Verteilung von berechneten Isoflavonen in entfetteten Flocken nach Inkubation für 24 Stunden bei pH 4,5 und 7 und bei 45°C.

TABELLE 2

Probe	Genistin %	6"-OMAL Genistin %	6"-OAC Genistin %	Genistein %	Daidzin %	6"-OMAL Daidzin %	6"-OAC Daidzine %	Daidzein %	Glycitin %	6"-OMAL Glycitin %	Glycitein %
t=0											
Flocken	49	46	0	4	49	44	3	3	44	33	22
45°C, pH 7,0, t=24											
Flocken	3	28	0	69	2	35	5	59	0	28	73
45°C, pH 4,5, t=24											
Flocken	19	42	0	39	17	48	4	31	14	37	49

[0030] Diese Daten zeigen den Umwandlungsgrad, erzielbar durch restliches(e) Enzym(e) in dem Proteinmaterial. Beträchtliche Umwandlung von Isoflavonkonjugaten zu Agluconen trat bei einem pH von 7 und Temperatur von 45°C nach 24 Stunden Inkubation auf.

[0031] In einer anderen Serie von Experimenten wurden die Prozent Gewinnung von Genistein und Daidzein in einer Proteinisolierung, abstammend von Sojabohnen, untersucht. Die Prozente Gewinnung wurden gefunden durch Bestimmen der Menge von Genistein (oder Daidzein) in der Isolierung und Ausdrücken jener Menge als einen Prozentsatz, basierend auf der Gesamtmenge aller Formen von Genistein (oder Daidzein) in dem Sojabohnenausgangsmaterial. 100 g entfettetes Sojabohnenmehl wurden mit 1000 g Wasser extrahiert, das auf einen pH von 9,7 durch die Zugabe von Natriumhydroxid bei einer Temperatur von 32°C eingestellt wurde. Dieses lieferte ein Gewichtsverhältnis von Wasser zu Mehl von 10:1. Das Mehl wurde von dem Extrakt getrennt und erneut mit 600 g wäßrigem Extrakt mit einem pH von 9,7 und einer Temperatur von 32°C extrahiert. Die zweite Extraktionsstufe lieferte ein Gewichtsverhältnis von Wasser zu Mehl von 6:1. Das Mehl wurde mittels Zentrifugation getrennt, die ersten und zweiten Extrakte kombiniert, und der pH auf 4,5 eingestellt unter Bilden einer Aufschlämmung von Sojabohnenmolke und Säure gefälltem Quark. Die Aufschlämmung wurde auf 50°C erhitzt, und 2% bezogen auf Trockengewicht des Quarks des Enzyms Lactase F wurden hinzugegeben. Man ließ die Aufschlämmung 16 Stunden bei 50°C reagieren unter Gewährleisten von vollständiger Umwandlung der Glucon Isoflavone zu der Agluconform. Der Säure gefällte Quark wurde von der Molke durch Zentrifugation unter Bilden einer Aglucon angereicherten Isolierung getrennt. Weiteres Waschen des gefällten Quarks mit Wasser wurde vermieden. Die Menge von in der Isolierung gewonnenem Genistein betrug 86% des Gesamten aller Formen von Genistin und Genistein in dem Ausgangssojabohnenmaterial (entfettetes Sojamehl). In ähnlicher Weise betrug die Menge von in der Isolierung gewonnenem Daidzein 75%.

[0032] Das folgende ist eine Beschreibung eines Verfahrens zum mengenmäßigen Bestimmen von Isoflavonen in Sojabohnenprodukten. Die Isoflavone werden aus Sojabohnenprodukten durch Mischen von 0,75 Gramm Probe (sprühgetrocknetes oder fein gemahlenes Pulver) mit 50 ml 80/20 Methanol/Wasser Lösungsmittel extrahiert. Die Mischung wird 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Orbitalschüttler geschüttelt. Nach 2 Stunden werden die verbleibenden ungelösten Materialien durch Filtration durch Whatman Nr. 42 Filterpapier entfernt. Fünf ml des Filtrats werden mit 4 ml Wasser und 1 ml Methanol verdünnt.

[0033] Die extrahierten Isoflavone werden mittels HPLC (Hochleistungsflüsigkeitschromatographie) unter Verwenden einer Beckmann C18 Umkehrphasensäule getrennt. Die Isoflavone werden auf die Säule gespritzt und mit einem Lösungsmittelgradienten, beginnend mit 88% Methanol, 10% Wasser und 2% Eisessig und endend mit 98% Methanol und 2% Eisessig, eluiert. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/Min sind alle Isoflavone – Genistin, 6''-O-Acetylgenistin, 6''-O-Malonylgenistin, Genistein, Daidzin, 6''-O-Acetyldaidzin, 6''-O-Malonyldaidzin, Daidzein, Glycitin und dessen Derivate und Glycitein deutlich gelöst. Peak Nachweis ist durch UV Absorption bei 262 nm. Identifizierung der Peaks wird mittels Massenspektrometer durchgeführt.

[0034] Mengenmäßige Bestimmung wird erzielt durch Verwenden von reinen Standards (Genistin, Genistein, Daidzin und Daidzein), gekauft von Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ. Reaktionsfaktoren (Integrierter Bereich/Konzentration) werden für jede der zuvor genannten Verbindungen berechnet und zum mengenmäßigen Bestimmen unbekannter Proben verwendet. Für die konjugierten Formen, für die keine reinen Standards verfügbar sind, wird angenommen, daß Reaktionsfaktoren diejenigen des Elternmoleküls sind, aber korrigiert in bezug auf Molekulargewichtdifferenz. Man nimmt an, daß der Reaktionsfaktor für Glycitin derjenige für Genistin, korrigiert in bezug auf Molekulargewichtsdifferenz, ist.

[0035] Dieses Verfahren liefert die Mengen jedes einzelnen Isoflavons. Aus Bequemlichkeit können gesamtes Genistein, gesamtes Daidzein und gesamtes Glycitein berechnet werden und stellen das Aggregatgewicht dieser Verbindungen dar, wenn alle die konjugierten Formen in ihre entsprechenden unkonjugierten Formen umgewandelt werden. Diese Gesamtheiten können auch direkt durch ein Verfahren unter Verwenden von Säurehydrolyse unter Umwandeln der konjugierten Formen gemessen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines Aglucon Isoflavon angereicherten Extrakts aus einem Pflanzenproteinmaterial, umfassend:
(a) Extrahieren von Pflanzenproteinmaterial, umfassend Glucon Isoflavone, mit einem wäßrigen Extraktionsmittel mit einem pH über etwa dem isolektrischen Punkt des Pflanzenproteinsmaterials zum Herstellen eines wäßrigen Extrakts, umfassend Protein und Glucon Isoflavone, und
(b) Umsetzen der Glucon Isoflavone mit einer ausreichenden Menge mindestens eines von beta-Glucosidase und Esterase für eine Zeitdauer, Temperatur und pH, ausreichend, eine Mehrheit der Glucon Isoflavone in dem Extrakt zu Aglucon Isoflavonen umzuwandeln, wodurch ein Aglucon Isoflavon angereicherter Extrakt hergestellt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Extraktion in Stufe (a) bei einem pH von 6 bis 10 durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei Extraktion in Stufe (a) bei einem pH von 6,7 bis 9,7 durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei Extraktion des Pflanzenproteinmaterials eine Doppelextraktion umfaßt.

5. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Pflanzenproteinmaterial von 8:1 bis 16:1 ist.

6. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei die Zeitdauer von 2 Stunden bis 24 Stunden ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zeitdauer 24 Stunden beträgt.

8. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei die Temperatur 40°C bis 60°C beträgt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Temperatur 60°C beträgt.

10. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei der pH in Stufe (b) von 4 bis 8 beträgt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der pH in Stufe (b) 4,5 beträgt.

12. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, ferner umfassend:
(e) Einstellen des pH des Aglucon Isoflavon angereicherten Extrakts auf etwa den isoelektrischen Punkt des Pflanzenproteinmaterials, um das Proteinmaterial zu fällen, und
(d) Trennen des gefällten Proteinmaterials unter Herstellen einer Aglucon Isoflavon angereicherten Proteinisolierung (Proteinisolat).

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei Waschen der Isolierung vermieden wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Isolierung mit Wasser in einer Menge, bezogen auf Gewicht, gewaschen wird, die weniger als 6fach des Gewichts des gefällten Proteinmaterials ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Isolierung mit Wasser in einer Menge, bezogen auf Gewicht, gewaschen wird, die geringer als 4fach des Gewichts des gefällten Proteinmaterials ist.

16. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Pflanzenproteinmaterial ein Sojabohnenmaterial umfaßt.

17. Verfahren nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, wobei mindestens 80% der Glucon Isoflavone zu Aglucon Isoflavonen umgewandelt werden.

18. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Enzym restliches Enzym ist.

19. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Enzym Ergänzungsenzym ist.

20. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Enzym sowohl aus Ergänzungs- wie restlichem Enzym besteht.

21. Verfahren zum Gewinnen von mindestens 50% eines Isoflavons aus einem Pflanzenproteinmaterial, umfassend:
(a) Extrahieren von Pflanzenproteinmaterial, umfassend Isoflavone, mit einem wäßrigen Extrakt mit einem pH über etwa dem isoelektrischen Punkt des Pflanzenproteinmaterials unter Herstellen eines wäßrigen Extrakts, umfassend Protein und Isoflavone,
(b) Umsetzen der Isoflavone mit einer ausreichenden Menge von mindestens einem von beta-Glucosidase und Esterase für eine Zeitdauer, Temperatur und pH, ausreichend, eine Mehrheit der Isoflavone in dem Extrakt zu weniger löslichen Isoflavonen umzuwandeln und dadurch einen Isoflavon angereicherten Extrakt herzustellen,
(c) Einstellen des pH des Extrakts auf etwa den isoelektrischen Punkt des Pflanzenproteinmaterials, um das Proteinmaterial zu fällen, und
(d) Trennen des gefällten Proteinmaterials unter Gewinnen einer Isolierung (eines Isolats), enthaltend mindes-

tens 50% der Isoflavone in dem Pflanzenproteinmaterial.

22. Verfahren nach Anspruch 21, durchgeführt in Übereinstimmung mit einem der vorhergehenden Ansprüche.

23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, wobei mindestens 65% der Isoflavone in dem Pflanzenproteinmaterial in der Isolierung gewonnen werden.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei mindestens 80% der Isoflavone in dem Pflanzenproteinmaterial in der Isolierung gewonnen werden.

25. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei der pH in Stufe (b) bei einem Wert ist, bei dem das Enzym äußerst aktiv vor Reaktion mit den Glucon Isoflavonen ist.

26. Verfahren nach Anspruch 18, wobei der pH in Stufe (b) bei einem Wert ist, bei dem das restliche Enzym äußerst aktiv vor Reaktion mit den Glucon Isoflavonen ist.

27. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der pH in Stufe (b) bei einem Wert ist, bei dem das Ergänzungsenzym äußerst aktiv vor Reaktion mit den Glucon Isoflavonen ist.

28. Extrakt oder Isolierung, hergestellt durch ein Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch.

29. Extrakt oder Isolierung nach Anspruch 28, hergestellt aus Sojabohnen.

30. Pflanzenproteinisolierung mit einem Trockenbasis-Genisteingehalt von 1,5 bis 3,5 mg/Gramm und einem Trockenbasis-Daidzeingehalt von 1,0 bis 3,0 mg/Gramm.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen