(19) **RU** (11) **2 219 785** (13) **C2**

(51) МПК[7] **A 23 J 3/16, 1/14**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97109364/13, 11.06.1997

(24) Дата начала действия патента: 11.06.1997

(30) Приоритет: 11.06.1996 US 08/661845

(43) Дата публикации заявки: 10.05.1999

(46) Дата публикации: 27.12.2003

(56) Ссылки: US 5320949 A, 14.06.1994. US 4390559 A, 28.06.1983. BARNES et al. J. Agric. Food Chem. 42(11), p. 2466-2474, 1994. NGUYENLE et al. J. Pharm. Biomed. Anal., 14(1/2), p. 221-232, 1995. SU 1151541 A, 23.04.1985.

(98) Адрес для переписки:
105023, Москва, ул. Б.Семеновская, д.49, оф.404, Центр "ИННОТЭК", пат.пов. О.В.Аргасову

(72) Изобретатель: УЭГГЛ Дойл Х. (US), БРАЙАН Барбара А. (US)

(73) Патентообладатель:
ПРОТЕИН ТЕКНОЛОДЖИЗ ИНТЕРНЭШНЛ ИНК. (US)

(74) Патентный поверенный:
Аргасов Олег Вячеславович

(54) БОГАТОЕ ИЗОФЛАВОНАМИ ВЕЩЕСТВО (ВАРИАНТЫ) И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БОГАТОГО ИЗОФЛАВОНАМИ ВЕЩЕСТВА ИЗ СОЕВОЙ МЕЛАССЫ (ВАРИАНТЫ)

(57)

Изобретение относится к способу выделения изофлавонов из соевой мелассы и, кроме того, к продуктам, полученным упомянутым способом. Способ получения богатого изофлавонами вещества из соевой мелассы заключается в выделении указанного богатого изофлавонами вещества из соевой мелассы при уровне pH, температуре и в течение времени, достаточных для того, чтобы в богатом изофлавонами веществе содержалась основная часть изофлавонов. Богатое изофлавонами вещество выделяют из соевой мелассы. Оно содержит, по меньшей мере, два или три изофлавона, которыми являются, например, глицитеин, глицитин, 6"-О-малонил глицитин или смесь этих изофлавонов. По меньшей мере, один из изофлавонов является изофлавоновым глюкозидом, который выбирают из генистина и даидзина. По меньшей мере, один из изофлавонов является аглюконовым изофлавоном, выбранным из генистеина и даидзеина. Изобретение позволяет получить обогащенное изофлавонами вещества, имеющие лекарственную ценность. 5 с. и 33 з.п. ф-лы, 4 табл.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

(19) **RU** (11) **2 219 785** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **A 23 J 3/16, 1/14**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 97109364/13, 11.06.1997

(24) Effective date for property rights: 11.06.1997

(30) Priority: 11.06.1996 US 08/661845

(43) Application published: 10.05.1999

(46) Date of publication: 27.12.2003

(98) Mail address:
105023, Moskva, ul. B.Semenovskaja, d.49,
of.404, Tsentr "INNOTEhK", pat.pov. O.V.Argasovu

(72) Inventor: UEhGGL Dojl Kh. (US),
BRAJAN Barbara A. (US)

(73) Proprietor:
PROTEIN TEKNOLODZhIZ INTERNEhShNL INK. (US)

(74) Representative:
Argasov Oleg Vjacheslavovich

(54) ISOFLAVONE-RICH SUBSTANCE (OPTIONS) AND A METHOD OF PREPARING ISOFLAVONERICH SUBSTANCE FROM SOYA MOLASSES

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: preparation method consists in isolation of isoflavone-rich substance from soya molasses at pH value, temperature, and for a period of time, which are suitable to provide content of main part of isoflavones in isoflavone-rich substance. The latter, in particular, contains at least two or three isoflavones, e. g. glycyteine, glycytine, 6"-O-malonylglycytine, or their mixture. At least one of isoflavones is isoflavone glucoside: genistine or daidzine, and at least one of isoflavones is aglucone isoflavone: genisteine or daidzeine. EFFECT: enabled enrichment of substance with isoflavones thereby acquiring therapeutic value. 38 cl, 4 tbl, 4 ex

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть).

Формула изобретения:

1. Богатое изофлавонами вещество, содержащее твердое вещество, выделенное из вещества соевой мелассы, причем указанное твердое вещество содержит, по меньшей мере, два изофлавона, причем это твердое вещество содержит глицитеин, глицитин, 6"-О-малонил глицитин или смесь этих изофлавонов.

2. Богатое изофлавонами вещество по п.1, отличающееся тем, что указанное твердое вещество содержит, по меньшей мере, большинство указанных изофлавонов указанного вещества соевой мелассы, из которой выделено указанное твердое вещество.

3. Богатое изофлавонами вещество по п.1, отличающееся тем, что указанное твердое вещество содержит генистеин.

4. Богатое изофлавонами вещество по п.1, отличающееся тем, что указанное твердое вещество содержит даидзеин.

5. Богатое изофлавонами вещество по п.1, отличающееся тем, что указанное твердое вещество содержит глицитеин.

6. Богатое изофлавонами вещество по п.1, отличающееся тем, что указанное твердое вещество содержит, по меньшей мере, два аглюконовых изофлавона.

7. Богатое изофлавонами вещество, содержащее твердое вещество, выделенное из вещества соевой мелассы, причем это твердое вещество содержит, по меньшей мере, три изофлавона, по меньшей мере, один из которых является изофлавоновым коньюгатом, выбранным из 6"-О -малонил генистина и 6"-О-малонил даидзина, причем, по меньшей мере, один из изофлавонов является изофлавоновым глюкозидом, выбранным из генистина и даидзина, и, по меньшей мере, один из изофлавонов является аглюконовым изофлавоном, выбранным из генистеина и даидзеина.

8. Способ получения богатого изофлавонами вещества из соевой мелассы, содержащей изофлавоны по п.1, заключающийся в том, что выделяют указанное богатое изофлавонами вещество из упомянутой соевой мелассы при уровне pH 3-6,5 и температуре 0-35°С, для того, чтобы в богатом изофлавонами веществе содержалась основная часть изофлавонов.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что образовывают водную смесь вещества соевой мелассы, содержание твердых веществ в которой составляет 3-28% перед выделением упомянутого богатого изофлавонами вещества из вещества соевой мелассы.

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что богатое изофлавонами вещество отделяют от упомянутой соевой мелассы центрифугированием.

11. Способ по п.8, отличающийся тем, что упомянутое богатое изофлавонами вещество отделяют от соевой мелассы фильтрацией.

12. Способ получения богатого изофлавонами вещества по п.7, заключающийся в том, что выделяют указанное богатое изофлавонами вещество из указанной соевой мелассы при уровне pH 3-6,5 и температуре 0-35°С, для того, чтобы в богатом изофлавонами веществе содержалась основная часть изофлавонов, образовывают водную взвесь указанного богатого изофлавонами вещества, содержащего изофлавоновые конъюгаты, и обрабатывают указанную взвесь при температуре 2-120°С и уровне pH6-13,5 в течение 15 мин - 6 ч для преобразования указанных конъюгатов изофлавоновых конъюгатов в изофлавоновые глюкозиды с образованием богатой изофлавоновыми глюкозидами взвеси и отделяют богатое изофлавоновыми глюкозидами вещество от указанной взвеси.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что содержание твердых веществ в упомянутой водной взвеси богатого изофлавонами вещества составляет 6-13%.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что после преобразования упомянутых изофлавоновых коньюгатов и упомянутых изофлавоновых глюкозидов добавляют в эти изофлавоновые глюкозиды в упомянутой взвеси фермент с возможностью преобразования упомянутых изофлавоновых глюкозидов в аглюконовые изофлавоны, образуя богатую аглюконовыми изофлавонами взвесь.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что добавление фермента в упомянутые изофлавоновые глюкозиды в упомянутой взвеси заключается в добавлении эффективного количества дополнительного фермента в упомянутую взвесь.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что упомянутый дополнительный фермент содержит фермент сахаридазы, способный расщеплять 1,4-глюкозидные связи.

17. Способ по п.14, отличающийся тем, что после преобразования упомянутых изофлавоновых глюкозидов в аглюконовые изофлавоны выделяют вещество, богатое аглюконовыми изофлавонами, из упомянутой взвеси.

18. Способ по п.15, отличающийся тем, что добавление фермента в изофлавоновые глюкозиды в упомянутой соевой мелассе состоит в добавлении эффективного количества дополнительного фермента в упомянутую соевую мелассу.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что упомянутый дополнительный фермент содержит фермент сахаридазы, способный расщеплять 1,4-глюкозидные связи.

20. Способ по п.14, отличающийся тем, что упомянутое богатое аглюконовыми изофлавонами вещество выделяют из упомянутой соевой мелассы или из взвеси при уровне pH 3-6,5 и при температуре 0-35 °С, предпочтительно 0-10°С.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что упомянутое богатое аглюконовыми изофлавонами вещество выделяют из упомянутой соевой мелассы при уровне pH примерно 4,5.

22. Способ по п.20, отличающийся тем, что упомянутое богатое аглюконовыми изофлавонами вещество выделяют из упомянутой соевой мелассы центрифугированием или фильтрованием.

23. Способ получения богатого изофлавоновыми глюкозидами вещества из соевой мелассы, содержащей изофлавоновые коньюгаты по п.7, заключающийся в том, что обрабатывают упомянутую соевую мелассу при уровне pH

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

6-13,5, при температуре 2-120°С и в течение времени как минимум 15 мин, позволяющих преобразовывать изофлавоновые коньюгаты в изофлавоновые глюкозиды, и выделяют богатое изофлавоновыми глюкозидами вещество из упомянутой соевой мелассы.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что упомянутую соевую мелассу обрабатывают при уровне pH 9-11 и при температуре 5-75°С в течение как минимум 15 мин для преобразования упомянутых изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что упомянутую соевую мелассу обрабатывают при уровне pH примерно 11 и при температуре 5-50°С в течение 15 мин - 1 ч для преобразования упомянутых изофлавоновых конъюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что упомянутую соевую мелассу обрабатывают при уровне pH примерно 11 и при температуре примерно 35°С в течение 30 мин - 1 ч для преобразования упомянутых изофлавоновых конъюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

27. Способ по п.24, отличающийся тем, что упомянутую соевую мелассу обрабатывают при уровне pH примерно 9 и при температуре 45-75°С в течение 4-6 ч для преобразования упомянутых изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

28. Способ по п.24, отличающийся тем, что образовывают водную взвесь указанного выделенного вещества, богатого изофлавоновыми глюкозидами, и добавляют фермент, преобразующий глюкозид в аглюкон, с указанными изофлавоновыми глюкозидами в этой взвеси при уровне pH 3-9 и температуре 5-75°С в течение как минимум примерно 1 ч для преобразования указанных изофлавоновых глюкозидов в аглюконовые изофлавоны с образованием взвеси, богатой аглюконовыми изофлавонами.

29. Способ получения богатого аглюконовыми изофлавонами вещества из соевой мелассы, содержащей изофлавоновые коньюгаты по п.7, заключающийся в том, что обрабатывают упомянутую соевую мелассу при уровне pH 6-13,5, при температуре 2-120°С и в течение как минимум 15 мин, достаточных для преобразования упомянутых изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды, добавляют фермент в изофлавоновые глюкозиды в упомянутой соевой мелассе, выбранный из группы, состоящей из альфа-глюкозидных ферментов, бета-глюкозидных ферментов, бета-глактозидазных ферментов, глюко-амилазных ферментов, пектиназных ферментов и их сочетаний, при уровне pH 3-9, при температуре 5-75°С и в течение как минимум 1 ч для преобразования упомянутых изофлавоновых глюкозидов в аглюконовые изофлавоны, и выделяют вещество, богатое аглюконовыми изофлавонами, из упомянутой соевой мелассы.

30. Способ по п.29, отличающийся тем, что образовывают водную смесь соевой мелассы, содержание твердых веществ в которой составляет 3-28% перед проведением преобразования упомянутых изофлавоновых конъюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

31. Способ по п.29, отличающийся тем, что упомянутую соевую мелассу обрабатывают при уровне pH 9-11 и при температуре 5-75°С в течение 15 мин - 6 ч для преобразования упомянутых изофлавоновых конъюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что упомянутую соевую мелассу обрабатывают при уровне pH примерно 11 и при температуре 5-50°С в течение 30 мин - 1 ч для преобразования упомянутых изофлавоновых конъюгатов в изофлавоновые глюкозиды.

33. Способ по п.29, отличающийся тем, что упомянутый фермент добавляют в изофлавоновые глюкозиды в упомянутой соевой мелассе при температуре 35-60°С.

34. Способ по п.29, отличающийся тем, что добавление фермента в изофлавоновые глюкозиды в упомянутой соевой мелассе состоит в добавлении эффективного количества дополнительного фермента в упомянутую соевую мелассу.

35. Способ по п.34, отличающийся тем, что упомянутый дополнительный фермент содержит фермент сахаридазы, способный расщеплять 1,4-глюкозидные связи.

36. Способ по п.29, отличающийся тем, что упомянутое богатое аглюконовыми изофлавонами вещество выделяют из упомянутой соевой мелассы или из взвеси при уровне pH 3-6,5 и при температуре 0-35 °С, предпочтительно 0-10°С.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что упомянутое богатое аглюконовыми изофлавонами вещество выделяют из упомянутой соевой мелассы при уровне pH примерно 4,5.

38. Способ по п.36, отличающийся тем, что упомянутое богатое аглюконовыми изофлавонами вещество выделяют из упомянутой соевой мелассы центрифугированием или фильтрованием.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Изобретение относится к способу выделения изофлавонов из соевой мелассы. Кроме этого, настоящее изобретение относится к конечным продуктам данного способа, содержащим изофлавоны.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изофлавоны встречаются в различных бобовых растениях, в том числе в таких овощных белках, как соевые бобы. Эти соединения включают в себя даидзин, 6"-ОАс-даидзин, 6"-ОМал даидзин, даидзеин, генистин, генистеин, 6"-ОАс генистин, 6"-ОМал- генистин, глицитин, 6"-Оас-глицитин, 6"-Омал глицитин, глицитеин, биоканин А, формононентин и кауместрол. Обычно эти соединения имеют горький вкус, присущий соевым бобам.

Изофлавоны соевых бобов содержат изофлавоновые глюкозиды (глюконы), изофлавоновые коньюгаты и аглюконовые изофлавоны. В изофлавоновых глюкозидах молекула глюкозы присоединена к изофлавоновой части. Изофлавоновые коньюгаты имеют дополнительные части, присоединенные к молекуле глюкозы изофлавонового глюкозида, например, 6"-ОАс генистин содержит ацетатную группу, присоединенную к шестой позиции молекулы глюкозы генистина. Аглюконовые изофлавоны состоят только из изофлавоновой части.

Соя содержит три "семейства" изофлавоновых соединений, имеющих соответствующие глюкозидные, коньюгатные и аглюконовые элементы: генистеиновое семейство, даидзеиновое семейство и глицитеиновое семейство. В генистеиновое

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

семейство входят глюкозидовый генистин; коньюгатный 6"-ОМал генистин (6"- эфир малонатовой кислоты генистина) и 6"-ОАс генистин (6"-эфир уксусной кислоты генистина); и аглюконовый генистеин. В даидзеиновое семейство входят глюкозидовый даидзин; коньюгатный 6"-ОМал даидзин и 6"-ОАс даидзин; и аглюконовый даидзеин. В глицитеиновое семейство входит глюкозидовый глицитин; коньюгатный 6"-ОМал глицитин; и аглюконовый глицитеин.

При производстве промышленной продукции, такой, как концентраты овощного белка, основное внимание уделялось удалению (выделению) этих веществ. Например, в известных способах производства концентрата соевого белка, при котором соевые хлопья выделялись с применением водного раствора кислоты или водного раствора спирта, необходимых для выделения растворимых в воде веществ из соевых хлопьев, большинство изофлавонов растворяются в экстракте. Этим экстрактом растворимых в воде веществ, в том числе изофлавонов, является соевая меласса. Соевая меласса является побочным продуктом при производстве концентрата соевого белка, который обычно выбрасывался. Поэтому соевая меласса является недорогим и предпочтительным продуктом, содержащим изофлавоны, при условии, что изофлавоны можно выделить из соевой мелассы.

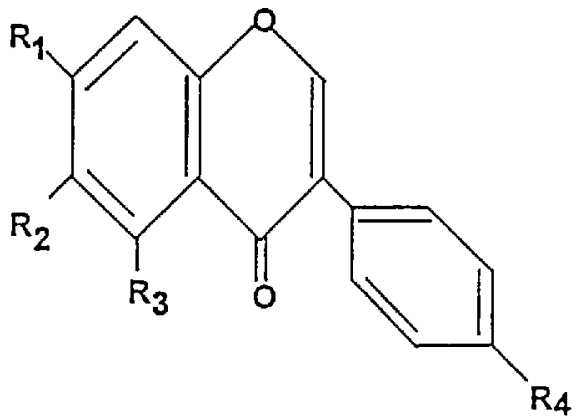
Недавно выяснилось, что изофлавоны, содержащиеся в овощных белках, таких, как, соевые бобы, имеют лекарственную ценность. Наибольший интерес представляют аглюконовые изофлавоны. Генистеин и даидзеин могут значительно снизить фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. "Влияние эстрагена растений млекопитающих на липиды плазмы женских особей обезьяны", Кровообращение, том 90, стр.1259 (октябрь 1994 г.). Генистеин и даидзеин также считаются способными снизить симптомы условий, вызванных пониженным или

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

изменяющимся уровнем эндогенного эстрогена в организме женщины, таких, как менопауза или предменструальный синдром. Кроме того, недавно выяснили, что аглюконовые изофлавоны могут подавлять рост раковых клеток в человеческом организме, таких, как рака груди и рака простаты, что описано в следующих статьях: "Подавление генистеином роста рака груди в человеческом организме, независимость от эстрогенных рецепторов и гена сопротивляемости группе препаратов" авторов Патерсена и Барнса, Биохимические и биофизические Исследования, Связи, том 179, No1, стр.661-667, 30 августа 1991 г.; "Подавление генистеином и биоканином А роста клеток рака простаты в человеческом организме, а не тирозинная самофосфориляция фактора роста эпидермальных рецепторов" Петерсона и Барнса, Простата, том 22, стр.335-345 (1995 г.); и "Подавление соевыми бобами роста опухоли молочной железы на образцах рака груди", Барнса и лр.,Мутагены и канцерогенны при соблюдении диеты, стр. 239-253 (1990).

Аглюконовые изофлавоны имеют следующую общую формулу:



RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

в которой R1,R2,R3 и R4 выбираются из группы, содержащей H,OH и OCH3. Генистеин имеет приведенную выше формулу, в которой R1=OH; R2=H; R3=OH; R4=OH; даидзеин имеет приведенную выше формулу, в которой: R1=OH; R2=H, R3=H, R4=OH; и глицетеин имеет приведенную выше формулу, в которой R1=OH, R2=OCH3, R3=H, R4=OH.

Поэтому настоящее изобретение относится именно к изофлавонам и к выделению веществ, богатых изофлавонамы, из соевой мелассы. Кроме того, настоящее изобретение относится к изофлавоновым глюкозидам и аглюконовым изофлавонам - к преобразованию изофлавонов соевой мелассы в изофлавоновые глюкозиды и аглюконовые изофлавоны, а также к выделению богатых изофлавоновыми глюкозидами веществ и веществ, богатых аглюконовым изофлавоном, из соевой мелассы.

Общий способ преобразования изофлавоновых коньюгатов овощных белков в аглюконовый изофлавон известен и предложен в находящейся на рассмотрении заявке США Сер. N08/477,102, поданной 7 июня 1975 года и принадлежащей правопреемнику настоящей заявки.

Другие способы известны из области преобразования изофлавоновых глюкозидов и аглюконовых изофлавонов, один из которых, например, описан в японской заявке 258,669, автор Обата и др. Такие способы не предусматривают выделения богатых изофлавоном веществ из соевой мелассы. Такие способа также не предлагают преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды или аглюконовые изофлавоны. Кроме того, эти способы позволяют достичь лишь среднего уровня преобразования изофлавоновых глюкозидов и

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

аглюконовых изофлавонов и требуют значительного времени для достижения этого среднего уровня преобразования.

Поэтому задачей настоящего изобретения является богатое изофлавоном вещество и способ его получения из соевой мелассы.

Другой задачей настоящего изобретения является вещество, богатое изофлавоновым глюкозидом, и способ его получения из соевой мелассы.

И еще одной задачей настоящего изобретения является вещество, богатое аглюконовым изофлавоном, и способ его получения из соевой мелассы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩЕСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к богатому изофлавоном веществу и способу его выделения из соевой мелассы, содержащей изофлавоны. Этот способ состоит в получении соевой мелассы, содержащей изофлавоны, и выделении жмыха из соевой мелассы при уровнях pH и температуре, достаточных для того, чтобы в жмыхе оказалась основная часть изофлавонов. Предпочтительный уровень pH был примерно 3.0 - 6.5, а температура находилась в диапазоне примерно 0. -35o C во время выделения. Жмых представлял собой вещество, богатое изофлавоном.

В одном из вариантов изобретения изофлавоновое вещество, обогащенное глюкозидом, получается из жмыха материала, богатого изофлавоном. Из этого, богатого изофлавоном вещества, делается водная взвесь. Эта взвесь обрабатывается при температуре в диапазоне примерно 2-120o C и при уровне pH примерно 6-13.5 в течение времени, достаточного для преобразования изофлавоновых коньюгатов в богатом изофлавоном веществе в изофлавоновые

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

глюкозиды. Затем из этой взвеси можно выделить жмых из вещества богатого изофлавоновым глюкозидом.

Другой вариант настоящего изобретения предлагает получение богатого аглюконовым изофлавоном вещества из жмыха вещества, богатого изофлавоном. Из вещества, богатого изофлавоном, получали водную взвесь. Эта взвесь обрабатывалась при температуре в диапазоне примерно 2-120oC и при уровне pH примерно 6-13.5 в течение времени, достаточного для преобразования изофлавоновых коньюгатов в богатом изофлавоном веществе в изофлавоновые глюкозиды. С изофлавоновыми глюкозидами, находящимися в этой взвеси, при температуре примерно 5-75oC и при уровне pH примерно 3-9 в течение времени, достаточного для преобразования изофлавоновых глюкозидов в аглюконовый изофлавон, приводился в контакт фермент, способный расщепить связи 1,4-глюкозида.

В другом варианте настоящего изобретения предлагается вещество, богатое аглюконовым изофлавоном, и способ его выделения из соевой мелассы. Соевая меласса обрабатывалась при температуре в диапазоне примерно 2-120oC и при уровне pH примерно 6-13.5 в течение времени, достаточного для преобразования изофлавоновых коньюгатов, содержащихся в соевой мелассе, в изофлавоновые глюкозиды. Жмых вещества, богатого изофлавоновым глюкозидом, выделялся из соевой мелассы при уровне pH и температуре, достаточных для преобразования основной доли изофлавоновых глюкозидов в жмых.

В другом варианте настоящего изобретения предлагается вещество, богатое аглюконовым изофлавоном, и способ его выделения из соевой мелассы. Соевая меласса обрабатывалась при температуре примерно 2-120oC и при уровне pH

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

примерно 6-13.5 в течение времени, досточного для преобразования изофлавоновых коньюгатов, содержащихся в соевой мелассе, в изофлавоновые глюкозиды. С изофлавоновыми глюкозидами, находящимися в соевой мелассе, при температуре примерно 5-75oC и при уровне pH примерно 3-9 в течение времени, досточного для преобразования изофлавоновых глюкозидов в аглюконовый изофлавон , приводился в контакт фермент, способный расщепить связи 1,4-глюкозида. Из соевой мелассы выделяется жмых вещества, богатого аглюконовым изофлавоном, при уровне pH и температуре, достаточных для преобразования большей части аглюконового изофлавона в жмых.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Исходным веществом для способа, описанного в данном документе, является соевая меласса. Соевая меласса представляет собой побочный продукт многих промышленных процессов, использующих соевые бобы или их производные, таких, как процессы получении белкового экстракта, белковой сыворотки и белковых концентратов. Поэтому соевую мелассу можно получать в больших количествах, так как она является сравнительно недорогим продуктом.

Соевая меласса обычно считается растворимым соевым продуктом, отделяемым от нерастворимых соевых продуктов путем вымывания с помощью спирта или кислоты. Соевая меласса, как правило, представляет собой водянистую смесь, содержащую примерно 50% или более твердых веществ, которые включают в себя примерно 6% (относительно общего веса соевой мелассы) белка, примерно 3% золы, примерно 5% жира и примерно 36% углеводородов. В данной области соевая меласса известна также, как растворимые продукты соевых бобов. "Соевая меласса" - термин, который используется в данном документе - означает

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

соединение, содержащее соевую мелассу и/или производные соевой мелассы, такие, как соевая меласса, богатая изофлавоновым глюкозидом и аглюконовым изофлавоном. Поэтому эти термины используются в данном тексте равнозначно.

В предпочтительном варианте изобретения исходные вещества соевой мелассы получают из обезжиренных соевых хлопьев, из которых удалено масло известным способом экстрагирования растворителя. Обезжиренные соевые хлопья экстрагируются (извлекаются) водой, уровень pH которой является кислотным и равен примерно 4-5, путем добавления одной или более растворимых кислот, таких как уксусная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, хлорная кислота или любой другой соответствующий реагент. Предпочтительные весовые соотношения кислотного экстракта из соевых хлопьев составляют примерно 16:1 - 20:1 . Для повышения эффективности экстрагирования температуру экстрактантов можно поднять выше комнатной, предпочтительно примерно до 32oC-35oC. После экстрагирования экстракт соевой мелассы удаляют из соевых нерастворимых продуктов.

В другом варианте для получения исходного вещества соевой мелассы обезжиренные соевые хлопья экстрагируются водным раствором спирта. Предпочтительно, чтобы хлопья экстрагировались водным раствором этанола при весовых соотношениях экстрактанта и соевых хлопьев примерно 16:1 - 20:1 . Температуру спиртового экстрактанта можно поднять выше комнатной, предпочтительно до 32oC-35oC с целью повышения эффективности экстрагирования. Экстракт соевой мелассы затем удаляется из нерастворимых соевых продуктов и используется как исходное вещество соевой мелассы.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Вещество, обогащенное изофлавоном, может быть получено из исходного вещества соевой мелассы. Соевую мелассу можно разбавить водой до концентрации твердых веществ примерно 6-13%; причем концентрация 13% наиболее предпочтительна. Разбавление вещества соевой мелассы не является обязательным условием процесса, хотя разбавление довольно густого вещества соевой мелассы упрощает его обработку.

Соевая меласса, предпочтительно разбавленная, обрабатывается при уровнях pH и температуре, которые позволяют отделиться большей части изофлавонов от соевой мелассы в результате процедуры отделения. В предпочтительном варианте изобретения соевая меласса обрабатывается при уровне pH примерно 3.0-6.5 и при температуре примерно 0oC-35oC, что повышает способность изофлавонов не растворяться в соевой мелассе. Изофлавоны могут быть отделены от соевой мелассы при уровнях pH, выходящих за пределы предпочтительных значений, и при температуре выше 35oC, однако, эти условия менее предпочтительны, так как меньшее количество изофлавона будет отделяться от соевой мелассы в результате процедуры отделения. При необходимости уровень pH соевой мелассы можно регулировать с помощью известных кислотных и основных реагентов. Наиболее предпочтителен уровень pH соевой мелассы, равный примерно 4.5. Желательно также остужать соевую мелассу до температуры примерно 0-10oC, а наиболее предпочтительно примерно до 4-7oC.

Затем соевая меласса проходит процедуру отделения с целью выделения жмыха, обогащенного изофлавоном, из соевой мелассы. Это выделение проводится при вышеуказанных температурных условиях и уровнях pH. В одном из вариантов изобретения жмых вещества, богатого изофлавоном, выделяется

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

центрифугированием соевой мелассы и декантированием (сцеживанием) над осадочной жидкости из жмыха. Центрифугирование желательно проводить со скоростью примерно 3,000 - 10,000 оборотов/мин в течение примерно 30 мин. при температуре примерно 0-10oC.

В другом варианте изобретения обогащенный изофлавоном жмых может выделяться из соевой мелассы путем фильтрации. Предпочтительно, чтобы фильтрация проводилась при ранее указанных температурных и pH режимах, а наиболее предпочтительным является уровень pH 4.5, а температура примерно 0-10oC.

В другом примере жмых богатого изофлавоновым глюкозидом вещества можно выделить из соевой мелассы. Исходное вещество соевой мелассы получается методом, описанным ранее. Хотя и не обязательно, но желательно, чтобы соевая меласса была разбавлена до концентрации твердых веществ в ней от примерно 6% до примерно 13%, а наиболее предпочтительно примерно 13%, что упростит обработку этого вещества.

Затем с соевой мелассой проводят операцию преобразования, то есть изофлавоновые коньюгаты соевой мелассы превращают в изофлавоновые глюкозиды. Значительную долю изофлавонов в соевой мелассе составляют изофлавоновые коньюгаты, поэтому это преобразование значительно увеличивает количество изофлавоновых глюкозидов в соевой мелассе. Выяснилось, что качество преобразования зависит от уровня pH и температуры соевой мелассы.

Уровень pH для преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды в соевой мелассе находится в диапазоне примерно от 6 до 13.5. При необходимости уровень pH соевой мелассы следует регулировать до желаемого

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

уровня с помощью соответствующего основания, щелочного вещества или основного реагента в случае, если уровень pH надо увеличить, а если уровень pH надо понизить, с помощью соответствующих кислот или кислотных реагентов. Выяснилось, что преобразование изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды катализируется с помощью основания, поэтому для проведения быстрого преобразования наиболее предпочтительно использовать высокие уровни pH. Наиболее предпочтительный уровень pH для преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды лежит в диапазоне примерно от 9 до 11.

Температура преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды в соевой мелассе лежит в диапазоне примерно от 2 до 120oC. Диапазон температур, при которых легко происходит это преобразование, зависит от уровня pH соевой мелассы. Изобретатели обнаружили, что преобразование проходит легко при низких температурах, если уровень pH сравнительно высок. Например, при уровне pH примерно 11 преобразование проходит быстро и эффективно при температуре в диапазоне примерно 5-50oC. При уровне pH примерно 9 преобразование проходит эффективно при температуре, находящейся в диапазоне примерно 45-75oC. Если уровень pH соевой мелассы сравнительно низок, преобразование проходит при более высоких температурах. Например, при уровне pH примерно 6 преобразование проходит при температурах в диапазоне примерно 80-120oC. В предпочтительном варианте изобретения преобразование проводится при температуре примерно 35oC и при уровне pH примерно 11. В другом предпочтительном варианте изобретения преобразование выполняется при температуре примерно 73oC и при уровне pH примерно 9.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Период времени, необходимый для преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды, зависит в основном от уровня pH и диапазона температур, которые имеет соевой меласса. Такой период времени преобразования обычно находится в диапазоне от примерно 15 мин. до нескольких часов или более. Быстрее преобразование проходит при более высоких уровнях pH и при более высокой температуре. При уровне pH примерно 9, преобразование фактически завершается через примерно от 4-х часов до 6-ти часов при температуре 73oC. В наиболее предпочтительном варианте изофлавоновые коньюгаты преобразуются в изофлавоновые глюкозиды через примерно 30 мин - примерно 1час, предпочтительно примерно через 45 мин., при уровне pH примерно 11 и при температуре примерно 35oC.

Особенно эффективно проходит преобразование изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды, когда преобразуется, как минимум, основная часть, а предпочтительно практически все изофлавоновые коньюгаты в изофлавоновые глюкозиды. Термин "Основная часть" означает степень преобразования, как минимум, 50%. Термин "Практически все" означает степень преобразования, как минимум, 80%, а наиболее предпочтительно 90%.

После преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды богатый изофлавоновым глюкозидом жмых можно отделять от соевой мелассы. Соевая меласса обрабатывается при таком уровне pH и такой температуре, при которых основная часть изофлавоновых глюкозидов отделяется от соевой мелассы. В процессе отделения. В предпочтительном варианте у соевой мелассы поддерживается уровень pH примерно равный 3-5, более предпочтительно 4.5 и температура 0-35oC, предпочтительно примерно 0-10oC, более

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

предпочтительно 4-7oC, в процессе отделения. При необходимости можно регулировать уровень pH соевой мелассы с помощью известного соответствующего кислотного или основного реагента.

Для отделения твердых веществ от жидкости можно использовать известные средства. Богатый изофлавоновым глюкозидом жмых предпочтительно отделяется методом центрифугирования или фильтрации, как указывалось выше по отношению к отделению богатого изофлавоном жмыха от соевой мелассы. В еще одном варианте изобретения можно отделить жмых богатого аглюконовым изофлавоном вещества от соевой мелассы. Исходные вещества соевой мелассы получают как описывалось выше и предпочтительно разбавляют водой до концентрации твердых веществ порядка 6-13%. Исходные вещества соевой мелассы обрабатываются для преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды, как указывалось выше.

Затем проводится операция ферментного преобразования над соевой мелассой, богатой изофлавоновым глюкозидом, путем добавления соответствующего фермента к изофлавоновому глюкозиду в соевой мелассе, при соответствующих уровне pH и температуре с целью преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон. Этот двухэтапный процесс преобразования позволяет эффективно преобразовать практически все изофлавоновые коньюгаты в изофлавоновые глюкозиды в соевой мелассе и затем в аглюконовый изофлавон, значительно повышая содержание аглюконового изофлавона в соевой мелассе.

Оказалось, что процесс преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон зависит от разнообразных факторов, в том числе от типа

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

ферментов, присутствующих в соевой мелассе, от распределения концентрации ферментов, от активности ферментов и от уровня pH и температуры соевой мелассы в процессе преобразования. Для проведения этого преобразования требуются ферменты, способные расщеплять глюкозидные связи между изофлавоновой частью и молекулой глюкозы изофлавонового глюкозида. В предпочтительном варианте ферментами являются сахаридаза или глюко-амилазовые ферменты, способные расщеплять связи 1,4-глюкозида. Эти ферменты могут изначально присутствовать в соевой мелассе или могут быть ферментами, которые легко приобрести, и которые добавляют в соевою мелассу. Изначально присутствующие ферменты в данном документе называются "Остаточными" ферментами, а ферменты, которые добавляются в соевою мелассу, в данном документе называются "Дополнительными" ферментами.

Для преобразования, как минимум, основной части, а практически всего количества изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон в соевой мелассе должно находится достаточное количество ферментов. Обычно, если остаточных ферментов в соевой мелассе недостаточное количество, для проведения преобразования необходимо в соевой мелассу добавить дополнительные ферменты. В предпочтительном варианте дополнительные ферменты добавляются в соевою мелассу независимо от того, достаточно ли остаточных ферментов в соевой мелассе, так как добавление дополнительных ферментов значительно сокращает время, требующееся для проведения практически полного преобразования глюкозида в аглюконы. Если дополнительные ферменты добавляются, то добавляться они должны так, чтобы общая концентрация присутствующих ферментов составляла 0.1%-10% от веса твердых веществ в сухой соевой мелассе.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Дополнительные ферменты выбираются с их оптимальной активностью при выбранных режимах pH и температуры, и руководствуясь соображением экономии. Дополнительные ферменты - это ферменты, способные расщеплять связи между изофлавоновой частью и молекулой глюкозы изофлавоновых глюкозидов, такие, как сахаридаза и глюко-амилазовые ферменты, способные расщеплять связи 1,4 глюкозида. Предпочтительными дополнительными ферментами являются альфа- и бета-глюкозидазовые ферменты, бета-галактозидазовые ферменты, глюко-амилазовые ферменты и пектиназовые ферменты, имеющиеся в продаже. А особенно предпочтительными являются такие ферменты, как Биопектиназа 100L (которую желательно применять при уровне pH примерно 3-6), Биопектиназа 300L (оптимальный уровень pH примерно 3-6), Биопектиназа OK 70L (оптимальный уровень pH 3-6), Биолактаза 30,000 (оптимальный уровень pH примерно 3-6), нейтральная Лактаза (оптимальный уровень pH 6-8), все это поставляется фирмой Quest International, 1833 57-th Street, Post Office Box 3917, Sarasota, Florida 34243. Также особенно предпочтительна Лактаза F (которую предпочтительно использовать при уровне pH 4-6) и Лактаза 50,000 (оптимальный уровень pH примерно 4-6), оба вещества предлагаются фирмой Amano International Enzyme Co.,Inc., Post Office Box 1000, Troy, Virginia 22974. Другие особенно предпочтиельные дополнительные ферменты включают в себя G-Zyme G990 (оптимальный уровень pH примерно 4-6) и концентрат Лактазы Enzeco Fungal Lactase Concentrate (оптимальный уровень pH примерно 4-6), предлагаемые фирмой Enzyme Development Corporation, 2 Penn Plaza, Suite 2439, New York 10121; Лактзим 300L (который предпочтительно употребляется при уровне pH 6-8) и Alpha-Gal 600L (который предпочтительно применяется при уровне pH 4-6.5), предлагаемые фирмой Novo Nordisk Bioindustrials,

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Inc., 33 Turner Road, Danbury, Connecticut 06813; Максилакт L2000 (который предпочтительно используется при уровне pH примерно 4-6), предлагаемый фирмой Gist Brocades Food Ingredients, Inc., King of Prussia, Pennsylvania, 19406; и Нейтральная Лактаза (которая предпочтительно используется при уровне pH примерно 6-8), предлагаемая фирмой Pfizer Food Science Group, 205 East 42-nd Street, New York, New York 10017 .

Уровень pH для преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон находится в диапазоне примерно 3-9. Используемый уровень pH зависит в основном от типа применяемого фермента и должен подбираться в соответствии с этим. Остаточный фермент активен при уровне pH в диапазоне примерно 7-9, хотя считается, что уровень pH соевой мелассы понижается во время процесса преобразования. Дополнительные ферменты активны при оптимальном уровне pH в диапазоне, указанном производителем фермента, как указано выше для некоторых конкретных ферментов. Обычно дополнительные ферменты являются активными либо в нейтральном диапазоне pH примерно от 6-8, либо в кислотном диапазоне pH примерно от 3-6.

Для проведении преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон уровень pH соевой мелассы может регулироваться до нужной величины. В большинстве случаев уровень pH понижается от сравнительно высокого уровня, необходимого для преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды путем добавления одной или нескольких соответствующих кислот, таких, как уксусная кислота, серная кислота, фосфорная кислота, хлорная кислота или любой другой подходящий реагент.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Температура соевой мелассы для преобразования глюкозидов в аглюконы находится в диапазоне примерно от 5-75oC. Температура серьезно влияет на активность ферментов, а, следовательно, на скорость преобразования. Дополнительные ферменты могут быть активными при температуре выше 70oC, например, Alpha-Gal 600L активен при 75oC, однако предпочтительно проводить преобразование при более низких температурах во избежание потери активности фермента. В предпочтительном варианте процесс преобразования проводится при температурах примерно 35-45oC.

Период времени, необходимый для проведения преобразования глюкозидов в аглюконы, зависит от факторов, связанных с ферментами, в частности, от концентрации, температуры и уровня pH системы. В большинстве случаев возможно достичь почти полное преобразование (превращение) в течение 24-х часов, однако, предпочтительно добавить дополнительный фермент для значительного повышения скорости реакции. Желательно, чтобы правильно выбранный дополнительный фермент, концентрация фермента, уровень pH и температура приводили к практически полному преобразованию в течение примерно 2-х часов, а наиболее предпочтительно в течение примерно одного часа.

Преобразование изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон очень эффективно, так как преобразуется, как минимум, основная часть, а предпочтительно практически все имеющиеся глюкозиды в аглюконы. Термин "Основная часть" означает степень преобразования, как минимум, примерно 50%. Термин "Практически весь" означает степень преобразования, как минимум, примерно 80%, а наиболее предпочтительно, как минимум, примерно 90%.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

После проведения преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон от соевой мелассы можно отделить жмых, обогащенный аглюконовым изофлавоном. Соевая меласса обрабатывается при таких уровнях pH и температуре, при которых в процессе отделения от соевой мелассы отделится основная часть аглюконового изофлавона. Предпочтительно, чтобы уровень pH соевой мелассы сохранялся примерно 3-6.5, а наиболее предпочтительно 4.5, а температура примерно 0-35oC, предпочтительно примерно 0-10oC, а наиболее предпочтительно примерно 4-7oC в течение процесса отделения. Уровень pH соевой мелассы можно регулировать с помощью соответствующих известных кислотных или основных реагентов, если это необходимо.

Это отделение можно проводить известными средствами для отделения твердых веществ от жидкости. Жмых, богатый аглюконовым изофлавоном, предпочтительно отделять центрифугированием или фильтрацией, как описывалось выше в отношении отделения богатого изофлавоном жмыха от соевой мелассы.

Вещество, богатое аглюконовым изофлавоном, можно также получить из богатого изофлавоном вещества, выделенного из соевой мелассы; способ выделения богатого изофлавоном вещества из соевой мелассы рассмотрен выше. Для образования взвеси вещества, богатого изофлавоном, к выделенному жмыху богатого изофлавоном вещества добавляется вода. Предпочтительно разбавлять эту взвесь до концентрации твердых веществ примерно 6-13%, хотя можно применять и более высокую концентрацию твердых веществ. Затем изофлавоновые коньюгаты во взвеси преобразуются в изофлавоновые глюкозиды посредством обработки этой взвеси при тех же условиях, которые рассматривались

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

выше в отношении преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды в соевой мелассе. В частности, эту взвесь обрабатывают при уровне pH примерно 6-13.5, предпочтительно примерно 9-11, и при температуре примерно 2-120oC в течение 15-ти минут - нескольких часов. Наиболее предпочтительно обрабатывать взвесь при уровне pH примерно 11 и температуре примерно 5-50oC, предпочтительно примерно 35oC, в течение примерно 30мин-1час; или при уровне pH примерно 9 и при температуре примерно 45-75oC, предпочтительно примерно 73oC, в течение примерно 4-х часов - 6-ти часов. При желании богатое изофлавоновыми глюкозидами вещество можно отделять от этой взвеси способом, аналогичным отделению богатого изофлавоном вещества от соевой мелассы, который описан выше.

Затем изофлавоновый глюкозид во взвеси преобразуются в аглюконовый изофлавон при тех же условиях, которые приводились выше в отношении преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон в соевой мелассе. В частности, к изофлавоновому глюкозиду во взвеси добавляется фермент, способный расщепить глюкозидовые связи между изофлавоновой частью и молекулой глюкозы изофлавонового глюкозида при соответствующем уровне pH и температуре в течение времени, достаточного для преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон. Предпочтительные ферменты, уровни pH, температуры и периоды времени представлены выше. Вещество, богатое аглюконовым изофлавоном, можно отделить от взвеси способом, аналогичным отделению богатого изофлавоном вещества от соевой мелассы, которое описано выше.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Богатое аглюконовым изофлавоном вещество можно также получить из богатого изофлавоновым глюкозидом вещества, выделенного из соевой мелассы; способ выделения вещества, богатого изофлавоновым глюкозидом, из соевой мелассы рассмотрен выше. Для образования взвеси богатого изофлавоновым глюкозидом вещества к выделенному жмыху богатого изофлавоновым глюкозидом вещества добавляется вода. Предпочтительно разбавлять эту взвесь до концентрации твердых веществ примерно 6-13%, хотя можно применять и более высокую концентрацию твердых веществ. Изофлавоновый глюкозид во взвеси преобразуется в аглюконовый изофлавон тем же способом, который описан выше в отношении богатой изофлавоновым глюкозидом взвеси, получаемой из взвеси, богатой изофлавоном. Вещество, богатое аглюконовым изофлавоном, можно отделить от взвеси после преобразования, проведенного способом, аналогичным отделению богатого изофлавоном вещества от соевой мелассы, которое рассмотрено выше.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Более подробно настоящее изобретение иллюстрируется с помощью следующих примеров. Примеры рассчитаны на иллюстративность и не должны рассматриваться в качестве ограничений области данного изобретения.

Как указывалось выше, соевые продукты, в том числе соевая меласса, содержат семейства генистеина, даидзеина, и семейства глицитеина изофлавонов, имеющие соответствующие глюкозидные, коньюгатные и аглюконовые элементы; генистеиновое семейство содержит коньюгатные 6"-OMal генистин, 6"-OAc генистин, глюкозидный генистин и аглюконовый генистин; даидзеиновое семейство содержит коньюгатный 6"-OMal даидзин, 6"-OAc даидзин, глюкозидный даидзин

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

и аглюконовый даидзеин; и глицитеиновое семейство содержит коньюгатный 6"-OMal глицитин, глюкозидный глицитин и аглюконовый глицитеин. В приведенных ниже примерах относительная концентрация изофлавонов измеряется либо, как общая концентрация изофлавонового семейства, либо как самостоятельное процентное содержание каждого изофлавона в семействе изофлавонов. Например, общая концентрация генистеинового семейства изофлавонов представляет собой сумму концентрации 6"-OMal генистина, 6"-OAc генистина, генистина и генистеина, а процентное содержание каждого изофлавона в генистеиновом семействе определяется относительно других изофлавонов генистеинового семейства: % генистина+ %6OMal генистина + %6"OAc генистина + %генистеина = 100%

ПРИМЕР 1

В первом примере выделение вещества, богатого изофлавоном, из соевой мелассы исследуется при различных концентрациях соевой мелассы. Общая концентрация каждого изофлавонового семейства измеряется на образце соевой мелассы, имеющем выбранную (заранее определенную) концентрацию, в жмыхе, выделенном из образца соевой мелассы, в соответствии со способом по данному изобретению, и в жидкой сыворотке, из которой удален жмых в результате процесса отделения.

Соевая меласса анализируется в отношении общей концентрации всех видов изофлавонов, присутствующих в ней. Образцы соевой мелассы разбавляются водой до концентрации в ней твердых веществ 28% (1:2 разведения), 13.7% (1:4 разведения), и 6.6% (1:8 разведения). Во всех образцах устанавливается уровень pH 4.5. Обработанные образцы затем центрифугируются со скоростью 3000 об/мин. в течение 30-ти минут для

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

осуществления отделения и получения жидкой сыворотки и части жмыха из этих образцов. Одна группа образцов центрифугируется при температуре 0.6oC. Образцы, имеющие концентрацию твердых веществ в соевой мелассе 28% и 13.7%, центрифугируются при температуре 60oC для сравнения с образцами, имеющими ту же концентрацию твердых веществ в соевой мелассе, которые отделяются при 0.6oC. Полученные доли жидкости и жмыха из этих образцов анализируются с точки зрения общей концентрации всех присутствующих видов изофлавонов.

В таблице 1 приведены концентрации изофлавонов в различных фракциях жмыха и жидкости, полученных в результате ранее описанных исследований. Указанные суммы представляют собой суммы всех видов отдельных изофлавонов, в том числе коньюгатов, глюкозидов и аглюконов, выраженные в миллиграммах изофлавона на грамм жмыха или твердых веществ в жидкой фракции.

ТАБЛИЦА 1

Образец	Суммарный генистеин (семейство) мг/г	Суммарный даидзеин (семейство) мг/г	Суммарный глицитеин (семейство) мг/г
Исходное кол-во в соевой мелассе			
Невыделенное	6.1	4.8	1.0
Разбавленное 1:2 (28% тверд. в-ва) Сыворотка отделяемая при 0.6oC	2.8	3.0	0.6
Разбавленное 1:2 Жмых отделяемый при 0.6oC	16.9	10.9	1.9
Разбавленное 1:2			

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Сыворотка отделяемая при 60oC	3.8	4.0	0.8
Разбавленное 1:2 Жмых отделяемый при 60oC	14.1	8.2	1.5
Разбавленное 1:4 (13.7% тверд. в-ва) Сыворотка отделяемая при 0.6oC	3.0	3.4	0.7
Разбавленное 1:4 Жмых отделяемый при 0.6oC	18.3	11.0	2.0
Разбавленное 1:4 Сыворотка отделяемая при 60oC	4.4	4.3	0.8
Разбавленное 1:4 Жмых отделяемый при 60oC	13.4	7.2	1.5
Разбавленное 1:8 (6.6% тверд. в-ва) Сыворотка отделяемая при 0.6oC	4.3	4.5	0.9
Разбавленное 1:8 Жмых отделяемый при 0.6oC	20.1	10.2	2.1

Во всех разделенных образцах концентрация изофлавонов значительно выше в жмыхе, чем в исходном веществе соевой мелассы, и гораздо выше, чем концентрация изофлавонов в твердых веществах фракции жидкой сыворотки. Образцы, отделенные при 0.6oC, имели более высокую концентрацию изофлавонов в жмыхе, чем соответствующие образцы, отделенные при 60oC, в которых выше концентрация изофлавонов в твердых веществах фракции сыворотки.

ПРИМЕР 2

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

В другом эксперименте исследуется выделение богатого изофлавоновым глюкозидом вещества из соевой мелассы. Изофлавоновые коньюгаты в соевой мелассе преобразуются в изофлавоновые глюкозиды, а богатый изофлавоновым глюкозидом жмых отделяется от соевой мелассы. Степень преобразования определяется количественным уменьшением процентного содержания и концентрации эфиров малоновой и уксусной кислот изофлавонового семейства с одновременным соответствующим количественным увеличением процентного содержания глюкозидов в том же изофлавоновом семействе.

Исходные вещества соевой мелассы исследовались на концентрацию отдельных изофлавоновых соединений. Изготавливаются два образца соевой мелассы путем разбавления соевой мелассы водой в следующих пропорциях: 1:4 (100г мелассы + 300г воды); и 1:8 (50г мелассы + 350г воды). Уровень pH образцов устанавливается 11, а температура образцов сохраняется при 35oC в течение 30 мин. Затем уровень pH образцов устанавливается 4.5, а температура устанавливается 4oC. Для разделения образцов мелассы на жмых и жидкую сыворотку эти образцы центрифугируются при скорости 10,000 об/мин при 4oC. Проводится анализ концентрации отдельных изофлавоновых соединений в сыворотке и в жмыхе.

В таблице 2 отражены изменения в пропорциях между различными видами изофлавонов, получаемых в результате преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды, в сравнении с исходным веществом соевой мелассы. Концентрации изофлавонов указаны в частях на миллион (ppm) в образце и в процентах от общего количества отдельного изофлавона

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

(суммарного от коньюгатного глюкозитного и аглюконового типов) в жидкой или жмыховой части.

ТАБЛИЦА 2

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Соевая мелясса (ppm)	467877	132922	00	881	353374	92820	2104	842	50052	10511	36037
% изофлавона											
Разбав. 1:4 сыворотка (ppm)	222198	171	00	301	265292	1796	291	211	34192	288	00
% изофлавона											
Разбав. 1:4 жмых (ppm)	282199	680	00	2611	1613397	1921	00	2321	144296	00	664
% изофлавона											
Разбав. 1:8 сыворотка (ppm)	285298	241	00	361	335694	1875	00	271	40694	286	00
% изофлавона											
Разбав. 1:8 жмых (ppm)	2751799	1010	00	2721	1261797	1381	00	2452	1146100	00	00
% изофлавона											

1 - генистины

2 - 6"-OMal генистин

3 - 6"-OAc генистин

4 - генистеин

5 - даидзин

6 - 6"-OMal даидзин

7 - 6"-OAc даидзин

8 - даидзеин

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

9 - глицитин

10 - 6"-OMal глицитин

11 - глицитеин

Во всех образцах, помещенных в условия преобразования изофлавоновых коньюгатов в изофлавоновые глюкозиды, процентное содержание изофлавоновых глюкозидов, как в жмыховой части, так и в жидкой части, значительно выше, чем в соответствующем не преобразованном образце соевой мелассы, а процентное содержание соответствующих изофлавоновых коньюгатов в этих образцах значительно ниже, что указывает на то, что большая часть изофлавоновых коньюгатов преобразуется в глюкозидную форму. Кроме того, после отделения большая часть глюкозидных изофлавонов выделяется в жмых с образованием вещества, обогащенного изофлавоновыми глюкозидами, что видно из относительной концентрации исходного вещества соевой мелассы и сывороточной и жмыховой частей каждого образца.

ПРИМЕР 3

В другом эксперименте исследовалось преобразование изофлавонов в аглюконовые изофлавоны в соевой мелассе. Изофлавоновые коньюгаты в соевой мелассе преобразуются в изофлавоновые глюкозиды, а изофлавоновый глюкозид затем преобразуются в аглюконовый изофлавон. Степень преобразования изофлавонового глюкозида в аглюконовый изофлавон определяется по количественному снижению концентрации глюкозидов изофлавонового семейства при соответствующем количественном увеличении процентного содержания аглюкона того же изофлавонового семейства.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

Исходное вещество соевой мелассы разбавляется в пропорции 1:4 водой и проводится исследование концентраций отдельных изофлавоновых соединений. Затем устанавливается уровень pH мелассы на 11. Для получения соевой мелассы, богатую глюкозидом соевую мелассу содержат при комнатной температуре в течение одного часа. Богатая глюкозидом соевая меласса исследуется на концентрацию отдельных изофлавоновых соединений. После установки уровня pH 4.5 из богатой глюкозидом соевой мелассы приготавливают четыре образца. В каждый образец вносится заправка в виде фермента; в образцы добавляются следующие ферменты соответственно по 10% от веса твердых веществ мелассы в каждом образце: G-Zyme 990, Биопектиназа 100L, Лактаза 50,000 и Alpha-Gal 600L. Затем эти образцы обрабатываются при температуре 50oC в течение 6-ти часов и получается соевая меласса, обогащенная аглюконовым изофлавоном. Затем исследуется содержание изофлавона в соевой мелассе, богатой аглюконовым изофлавоном.

В таблице 3 представлено распределение различных видов изофлавонов по результатам ранее описанного исследования. Концентрации изофлавонов выражены в частях на миллион (ppm) в образце и в процентах от общего количества каждого изофлавона (сумма коньюгатных, глюкозидных и аглюконовых видов).

ТАБЛИЦА 3

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Соевая мелясса (ppm)	4678	1329	0	88	3533	928	210	84	500	105	360
% изофлавона	77	22	0	1	74	20	4	2	52	11	37
Соевая мелясса богат. глюкозид.ppm	6763	0	0	104	4377	0	0	43	433	0	0
% изофлавона	98	0	0	2	99	0	0	1	100	0	0

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

G_Zyme 990 10% (ppm)	3903	0	0	1993	840	0	82	2331	346	0	114
% изофлавона	66	0	0	44	27	0	2	71	75	0	25
Биопектиназа 100L ppm	2865	0	0	2919	541	0	94	2701	195	0	237
% изофлавона	50	0	0	50	16		3	81	45	0	55
Лактаза 50,000 10% (ppm)	0	0	0	4601	0	0	92	2875	0	0	366
% изофлавона	0	0	0	100	0	0	3	97	0	0	100
Alpha_Ga 600L, 10% (ppm)	28	0	0	4566	0	0	89	2882	0	0	356
% изофлавона	1	0	0	99	0	0	3	97	0	0	100

1 - генистины

2 - 6"-OMal генистин

3 - 6"-OAc генистин

4 - генистеин

5 - даидзин

6 - 6"-OMal даидзин

7 - 6"-OAc даидзин

8 - даидзеин

9 - глицитин

10 - 6"-OMal глицитин

11 - глицитеин

Содержание аглюконового изофлавона в образцах, обработанных ферментами, значительно выше, чем в соевой мелассе и обогащенной глюкозидом

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

соевой мелассе, это указывает на то, что ферментная обработка преобразовала (превратила) значительное количество изофлавоновых глюкозов в аглюконовые изофлавоны. Правильный выбор фермента, концетрации фермента, уровня pH и температуры для проведения преобразования делает возможным преобразование практически всего количества изофлавоновых глюкозидов в аглюконовые изофлавоны, что продемонстрировано распределением изофлавонов в образцах Лактазы 50,000 и Alpha-Gal 600L.

ПРИМЕР 4

В последнем эксперименте исследовалось содержание богатого изофлавонами вещества, богатого изофлавоновым глюкозидом вещества и богатого аглюконовыми изофлавонами вещества, а также сравнивалось распределение изофлавонов в этих веществах. Соевая меласса разбавляется водой в пропорции 1:4. Для выделения жмыха богатого изофлавоном вещества образец разбавленной соевой мелассы устанавливался на уровень pH 4.5, охлаждается до температуры 0.6oC в ледяной ванне в течение 30 мин. и центрифугируется со скоростью 3000 об/мин в течение 30 мин. Оставшуюся разбавленную соевую мелассу затем устанавливают на уровень pH, равный 11, с помощью гидроокиси натрия и обрабатывают при температуре 50oC в течение одного часа для преобразования изофлавоновых коньюгатов в мелассе в изофлавоновые глюкозиды. В образце богатой глюкозидами мелассе устанавливается pH 4.5, он охлаждается до температуры 0.6oC в ледяной ванне в течение 30 мин. и центрифугируется со скоростью 3000 об/мин в течение 30 мин для выделения жмыха, богатого изофлавоновым глюкозидом. В оставшейся богатой изофлавоновым глюкозидом соевой мелассе устанавливается pH 4.5, к ней добавляют фермент G-Zyme 990 при

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

концентрации 2.6г фермента/100г мелассы. Затем для преобразования изофлавоновых глюкозидов в аглюконовые изофлавоны фермент и богатая изофлавоновыми глюкозидами соевая меласса обрабатываются при температуре 50оС в течение 18-20 часов. Образец соевой мелассы, обогащенный аглюконовыми изофлавонами, охлаждается до температуры 0.6оС в ледяной ванне в течение 30 мин и центрифугируется со скоростью 3000 об/мин в течение 30 мин для выделения жмыха вещества, богатого аглюконовым изофлавоном. Затем анализируется содержание изофлавона в выделенных жмыхах, вещества, богатого изофлавоном, вещества, богатого изофлавоновым глюкозидом, и вещества, богатого аглюконовым изофлавоном.

В таблице 4, приведенной ниже, показано распределение изофлавонов в жмыхах, веществ, богатых изофлавоном, изофлавоновым глюкозидом и аглюконовым изофлавоном. Изофлавоновое распределение представлено в процентах от общего количества отдельных изофлавонов (сумма коньюгатовых, глюкозидовых и аглюконовых видов).

ТАБЛИЦА 4

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
В-во богат. изофлавонами % изофлавона	83	16	0	1	81	12	5	1	40	8	52
В-во богат. глюкозидамии % изофлавона	99	0	0	1	99	0	0	1	95	0	5
В-во богат. аглюконами % изофлавона	3	0	0	97	0	0	0	100	54	18	28

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

1 - генистины

2 - 6"-OMal генистин

3 - 6"-OAc генистин

4 - генистеин

5 - даидзин

6 - 6"-OMal даидзин

7 - 6"-OAc даидзин

8 - даидзеин

9 - глицитин

10 - 6"-OMal глицитин

11 - глицитеин

По распределению изофлавона этих веществ можно судить об эффективности стадии преобразования. Вещество, богатое изофлавоновым глюкозидом, содержит значительно большее количество изофлавонового глюкозида, чем вещество, богатое изофлавоном и вещество богатое аглюконовым изофлавоном, в которых содержание изофлавона состоит почти полностью из изофлавонового глюкозида.

Во всех, представленных выше примерах, процентное содержание 6"-OMal генистина, 6"-OAc генистина, 6"-OMal диадзина, 6"-OAc диадзина, глицитина, 6"-OMal глицитина и глицитеина являются расчетными величинами. Ниже приведено описание способа определения количества изофлавона в соевых продуктах. Изофлавоны извлекаются из соевых продуктов путем смешивания 0.75г образца (высушенный распылением или мелко размолотый порошок) с 50 мл раствора 80/20 метанол/вода. Эту смесь встряхивают в течение 2-х часов при

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

комнатной температуре в качающемся сите. По истечении 2-х часов оставшиеся неразбавленные вещества удаляются путем фильтрации через фильтровальную бумагу Ватман N 42. Пять мл. фильтрата разбавляются 4 мл. воды и одним мл. метанола.

Экстагированные изофлавоны выделяются путем HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии) с помощью противофазной хроматографической колонки Hewlett Packard C18 Hypersil. Изофлавоны впрыскиваются в колонку и вымываются при градиенте растворителя, начиная с 88% метанола 10% воды и 2% ледяной (безводной) уксусной кислоты и кончая 98% метанола и 2% ледяной уксусной кислоты. При скорости потока 0.4 мл/мин все изофлавоны - генистин, 6"-0-ацетилгенистин, 6"-0-малонил генистин, генистеин, диадзин, 6"-0-ацетилдаидзин, 6"-0-малонилдаидзин, даидзин, глицитин и его производные и глицитеин - полностью растворяются. Максимум определяется ультрафиолетовым поглощением на 260 мм. Определение максимумов проводилось на HPLC - масс-спектрометре. Количественное определение проводится с помощью чистых эталонных образцов (генистин, генистеин, даидзин и даидзеин), полученных от фирмы Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ. Коэффициенты чувствительности (суммарная площадь/концентрация) рассчитываются для каждого из указанных выше соединений и используются для количественной характеристики неизвестных образцов. Для парных видов, для которых чистые эталонные образцы имеются в наличии, за коэффициенты чувствительности принимаются коэффициенты исходной молекулы, но скорректированные на разницу в молекулярном весе. Коэффициент чувствительности для глицитина предполагается таким же, как для генистина, с корректировкой на разницу в молекулярном весе. Этот способ дает количественные характеристики каждого

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2

отдельного изофлавона. Для удобства суммарные количества генистеина, даидзеина и глицитеина можно рассчитать и выразить совокупный вес этих соединений, если все парные виды преобразуются в соответствующие им непарные виды. Эти суммарные величины также могут быть измерены непосредственно способом, в котором применяется кислотный гидролиз для преобразования парных видов.

Выше представлены предпочтительные варианты данного изобретения. Можно делать различные изменения и добавления без отступления от сущности изобретения и расширять сферу притязаний, как сделано в прилагаемой формуле, пункты которой следует трактовать в соответствии с принципами патентного законодательства.

RU 2219785 C2

RU 2219785 C2