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

(10) **DE 697 01 842 T3** 2008.10.23

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 827 698 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 01 842.3**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 306 893.5**
(96) Europäischer Anmeldetag: **05.09.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.03.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.05.2000**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **09.04.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.10.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A23J 3/16*** (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01)
A23L 1/20 (2006.01)
A23L 1/211 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
709026 **06.09.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

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

(74) Vertreter:
Marks & Clerk, Luxembourg, LU

(72) Erfinder:
Bryan, Barbara A., University City, Missouri 63130, US; Allred, Maryann C., Collinsville, Illinois 62234, US

(54) Bezeichnung: **Aglukon-Isoflavon-angereicherter pflanzlicher Proteinextrakt und Proteinmaterial und Material mit hohen Anteil an Genistein und Daidzein und Herstellungsverfahren**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Pflanzenproteinextrakt und Proteinmaterial sowie ein Verfahren zum Bereitstellen derselben durch Ausführen eines Zweistufenverfahrens zum Umwandeln von Isoflavonkonjugaten in einem Pflanzenproteinmaterial zu Aglukon-Isoflavonen, auch betrifft diese Erfindung ein Material mit einem hohen Genisteingehalt und ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt sowie ein Verfahren zum Bereitstellen derselben aus einem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterial.

[0002] Isoflavone kommen in einer Vielzahl von Gemüsepflanzen vor, welche Pflanzenproteinmaterialien enthalten, wie z. B. Sojabohnen. Diese Verbindungen beinhalten Daidzin, 6''-OAc-Daidzin, 6''-OMal-Daidzin, Daidzein, Genistin, 6''-OAc-Genistin, 6''-OMal-Genistin, Genistein, Glycitin, 6''-OAc-Glycitin, 6''-OMal-Glycitin, Glycitein, Biochanin A, Formononentin und Coumestrol. Typischerweise werden diese Verbindungen mit dem anhaftenden bitteren Geschmack der Sojabohnen in Zusammenhang gebracht.

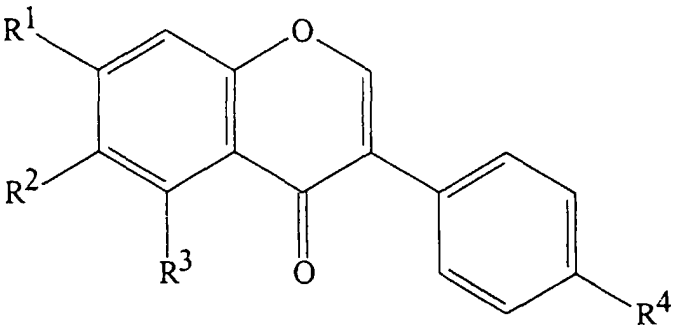
[0003] Die Isoflavone in den Pflanzenproteinmaterialien beinhalten Isoflavonglukoside (Glukone), Isoflavonkonjugate und Aglukon-Isoflavone. Isoflavonglukoside besitzen ein Glukosemolekül, welches an einen Isoflavonteil gebunden ist. Die Isoflavonkonjugate besitzen mehrere Teile, die an das Glukosemolekül eines Isoflavonglukosids gebunden sind, zum Beispiel, enthält 6''-OAc-Genistin eine Acetatgruppe, die an der sechsten Position des Glukosemoleküls von Genistin befestigt ist. Aglukon-Isoflavone bestehen einzig aus einem Isoflavonanteil.

[0004] Soja enthält drei "Familien" von Isoflavonverbindungen mit den entsprechenden Glukosid-, Konjugat- und Aglukonmitgliedern; die Genistein-Familie, die Daidzein-Familie und die Glycitein-Familie. Die Genstein-Familie beinhaltet das Glukosid Genistin; die Konjugate 6''-OMal-Genistin (6''-Malonsäureester von Genistin) und 6''-OAc-Genistin (6''-Essigsäureester von Genistin); und das Aglukon Genistein. Die Daidzein-Familie beinhaltet das Glukosid Daidzin; die Konjugate 6''-OMal-Daidzin und 6''-OAc-Daidzin; und das Aglukon Daidzein. Die Glycitein-Familie beinhaltet das Glukosid Glycitin; das Konjugat 6''-Omal-Glycitin; und das Aglukon Glycitin.

[0005] Bei der Herstellung von kommerziellen Produkten, wie z. B. Pflanzenproteinisolierungen und -konzentraten, liegt der Schwerpunkt darauf, diese Materialien zu entfernen. Zum Beispiel wird bei einem herkömmlichen Verfahren zum Herstellen einer Sojaproteinisolierung oder eines Sojaproteinkonzentrats, bei dem Sojaflocken mit einem wässrigen alkalischen Medium extrahiert werden, ein großer Anteil der Isoflavone in dem Extrakt zusammen mit dem Sojaprotein gelöst. Das Protein wird aus dem Extrakt durch Sauermachen des Extraktes ausgefällt und es wird abgetrennt um eine Isolierung oder ein Konzentrat herzustellen, auch hinterlässt es eine Molke, die einen großen Anteil der gelösten Isoflavone zurückhält. Die restlichen Isoflavone, die in dem sauer ausgefällten Protein zurückbleiben, werden normalerweise durch ausgiebiges Waschen beseitigt. Die Molke und die Waschlösungen werden typischerweise weggeworfen.

[0006] Es wurde kürzlich festgestellt, dass die in den Pflanzenproteinen, wie z. B. Sojabohnen, enthaltenen Isoflavone eine medizinische Bedeutung besitzen. Während alle Isoflavone bei der medizinischen Bewertung von Interesse sind, sind Aglukone die spezifischen Isoflavone die von größtem Interesse sind. Genistein und Daidzein können kardiovaskuläre Risikofaktoren entscheidend vermindern. "Plant und Mammalian Estrogen Effects an Plasma Lipids of Female Monkeys", Circulation, Band 90, S. 1259 (Okt. 1994). Von Genistein und Daidzein wird ebenso angenommen, dass sie die Symptome von Zuständen vermindern, die hervorgerufen werden durch verminderte oder verändernde Werte von endogenem Östrogen bei Frauen, wie z. B. in der Menopause oder bei dem prämenstruellen Syndrom. Ferner, es wurde kürzlich erkannt, dass Aglukon-Isoflavone das Wachstum von menschlichen Krebszellen, wie z. B. Brustkrebszellen und Prostatakrebszellen, hemmen können, wie in den folgenden Artikeln beschrieben "Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells, Independence from Estrogen Receptors und the Multi-Drug Resistance Gene" von Peterson und Barnes, Biochemical and Biophysical Research, Communications, Band 179, Nr. 1, S. 661–667, 30. Aug. 1991; "Genistein und Biochanin A Inhibit the Growth of Human Prostrate Cancer Cells but not Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Autophosphorylation" von Peterson und Barnes,. The Prostate, Band 22, S. 335–345 (1993); und "Soybean Inhibit Mammary Tumors in Models of Breast Cancer" von Barnes, u. a., Mutagens und Carcinogens in the Diet, S. 239–253 (1990).

[0007] Wie oben angegeben, es beinhalten Aglukon-Isoflavone Daidzein, Genistein und Glycitein. Diese Aglukone haben die folgende allgemeine Formel:



wobei R^1, R^2, R^3 und R^4 ausgewählt werden können aus der Gruppe, die aus H, OH und OCH_3 besteht.

[0008] Genistein besitzt die obige Formel mit R^1=OH, R^2=H, R^3=OH und R^4=OH, Daidzein besitzt die obige Formel mit R^1=OH, R^2=H, R^3=H und R^4=OH. und Glycitein besitzt die obige Formel mit R^1=OH, R^2=OCH_3, R^3=H und R^4=OH.

[0009] Aus diesem Grund sind es die Aglukone und die Anreicherung eines Pflanzenproteinextraktes und eines Pflanzenproteinmaterials mit diesen Verbindungen, und ebenso ist es ein Material mit einem hohen Genisteingehalt und ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt, auf welche die vorliegende Erfindung ausgerichtet ist. Die vorliegende Erfindung ist ebenso auf Verfahren zum Herstellen eines mit Aglukon angereicherten Pflanzenproteinextraktes, eines mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Pflanzenproteinmaterials, eines Materials mit einem hohen Genisteingehalt und eines Materials mit einem hohen Daidzeingehalt ausgerichtet.

[0010] Verfahren zum Umwandeln der Glukoside zu Aglukon-Isoflavonen sind bekannt. Ein Verfahren zum Umwandeln der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen, um so ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Pflanzenproteinextrakt und eine mit Aglukon-Isoflavon angereicherte Pflanzenproteinisolierung zu erzeugen, wird in WO95/10530 offenbart.

[0011] Andere Verfahren, um Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen umzuwandeln, sind ebenso in der Technik bekannt und z. B. in der Japanischen Patentanmeldung 258.669 von Obata, u. a. offenbart worden. Solche Verfahren sehen keine Umwandlung von Isoflavonkonjugaten zu Aglukon-Isoflavonen vor auch liefern sie kein Material mit einem hohen Genisteingehalt oder ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt, welche aus einer mit Aglukon angereicherten Pflanzenproteinisolierung gewonnen werden. Darüber hinaus erreichen diese Verfahren nur ein mittelmäßiges Ausmaß an Umwandlung der Glukoside zu Aglukonen, und sie benötigen eine beträchtliche Zeitdauer, um dieses mittelmäßige Ausmaß an Umwandlung zu bewirken. Deshalb sind solche Verfahren unannehmbar für einen kommerziellen Betrieb im Großmaßstab.

[0012] Es ist deshalb ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Pflanzenproteinextrakt und ein Verfahren zum Herstellen desselben bereitzustellen.

[0013] Es ist ferner ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Pflanzenproteinmaterial und ein Verfahren zum Herstellen desselben bereitzustellen.

[0014] Es ist auch noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Material mit einem hohen Genisteingehalt und ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt sowie Verfahren zum Herstellen derselben aus einem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Pflanzenproteinmaterial bereitzustellen.

[0015] Die Erfindung ist wie im Anspruch 1 definiert.

[0016] Bei einer Ausführungsform der Erfindung, wird die Extraktion bei einem pH von etwa 6 bis etwa 10 durchgeführt. Vorzugsweise liegt das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem pflanzlichen Proteinmaterial zwischen etwa 8:1 und etwa 16:1.

[0017] Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden die Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden umgewandelt, durch Behandeln des wässrigen Extraktes bei einer Temperatur von etwa 2°C bis etwa 121°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis etwa 13,5. Vorzugsweise wird die Umwandlung bei einem pH von etwa 11 und einer Temperatur von etwa 5°C bis etwa 50°C durchgeführt, oder, alternativ, bei einem pH von etwa 9 und einer Temperatur von etwa 45°C bis etwa 75°C.

[0018] Bei noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden die Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen umgewandelt, durch Zusammenbringen der Isoflavonglukoside mit einem Enzym in dem wässrigen Extrakt bei einer Temperatur zwischen etwa 5°C und etwa 75°C und einem pH-Wert zwischen etwa 3 und etwa 9. Vorzugsweise entspricht das Enzym einem Saccharindase-Enzym, das in der Lage ist 1,4-Glukosidbindungen zu spalten.

[0019] Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird der pH des mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extraktes auf etwa den isoelektrischen Punkt des Proteins in dem Extrakt eingestellt, um so das Proteinmaterial, welches das Protein und die Aglukon-Isoflavone enthält, auszufällen.

[0020] Hohe Umwandlungsraten der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden und der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen werden verwirklicht. In einer Ausführungsform wird ein Großteil, und vorzugsweise im Wesentlichen die gesamten Isoflavonkonjugate, zu Aglukon-Isoflavonen umgewandelt.

[0021] Unter einem anderen Gesichtspunkt ist die Erfindung wie im Anspruch 13 definiert.

[0022] Unter noch einem anderen Gesichtspunkt ist die Erfindung wie im Anspruch 24 definiert.

[0023] Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die Isoflavonglukoside in dem Extrakt mit einem Enzym zusammengebracht, unter Zugabe einer wirksamen Menge eines zusätzlichen Enzyms zu dem Extrakt, wobei das zusätzliche Enzym vorzugsweise ein Saccharindase-Enzym ist, das in der Lage ist die 1,4-Glukosidbindungen aufzubrechen.

[0024] Bei einer anderen Ausführungsform wird ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Proteinmaterial aus einem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt gebildet, durch Einstellen des pH des Extraktes nahe dem isoelektrischen Punkt des Proteins, um so ein Proteinmaterial auszufällen, welches das Protein und die Aglukon-Isoflavone enthält.

[0025] Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die Isoflavonglukoside in dem Schlamm mit einem Enzym zusammengebracht, durch Zugeben einer wirksamen Menge eines zusätzlichen Enzyms zu dem Schlamm, wobei das zusätzliche Enzym vorzugsweise ein Saccharindase-Enzym ist, das in der Lage ist die 1,4-Glukosidbindungen aufzubrechen.

[0026] Ein Material mit einem hohen Genisteingehalt kann aus einem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Pflanzenproteinmaterial zurückgewonnen werden. Ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Pflanzenproteinmaterial wird bereitgestellt und wird mit einem wässrigen alkoholischen Extraktionsmittel extrahiert, um einen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt zu erzeugen. Der Extrakt wird mit einem Adsorbermaterial während einer ausreichenden Zeitdauer zusammengebracht, um ein Material mit einem hohen Genisteingehalt von dem Extrakt abzutrennen.

[0027] Ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt kann aus einem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Pflanzenproteinmaterial erzeugt werden. Ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Pflanzenproteinmaterial wird bereitgestellt und wird mit einem wässrigen alkoholischen Extraktionsmittel extrahiert, um einen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt zu erzeugen. Der Extrakt wird mit einem Adsorbermaterial während einer ausreichenden Zeitdauer zusammengebracht, um ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt von dem Extrakt abzutrennen.

[0028] Das Ausgangsmaterial der bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist irgendein Gemüseproteinmaterial oder Pflanzenmaterial, welches Isoflavonkonjugate und ein Pflanzenprotein enthält. Bei einer bevorzugten Ausführungsform, ist das Ausgangsmaterial ein Sojabohnenmaterial, da das Verfahren insbesondere für die Erzeugung von mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakten und Proteinmaterialien aus Sojabohnenmaterial angepasst ist. Der Begriff "Sojabohnenmaterial" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Sojabohnen und jegliche Arten von Sojabohnenderivaten. Das am meisten bevorzugte Ausgangsmaterial sind Sojabohnenflocken, aus denen das Öl durch Lösungsmittel-Extraktion gemäß herkömmlichen Verfahren der Technik entfernt worden ist. Das vorliegende Verfahren ist, abgesehen von Soja und Sojabohnenmaterialien, im Allgemeinen anwendbar auf einen weiten Bereich von Pflanzenproteinmaterialien.

[0029] Abhängig von dem Typ des Gemüsepflanzenmaterials, welches Isoflavonkonjugate enthält, kann es in manchen Fällen notwendig sein, das Pflanzenmaterial in einer fein zerteilten Form zu verarbeiten. Dies kann wünschenswert sein, um die Isoflavonverbindungen, die in dem Pflanzenmaterial enthalten sind, für die ver-

schiedenen Reagenzien zugänglich zu machen, wie dies unten näher beschrieben wird. Das Material kann gemahlen, zerstoßen oder anderweitig durch herkömmliche, in der Technik bekannte Verfahren bearbeitet werden. Wenn das Pflanzenmaterial sich in einem Zustand solchen befindet, dass die Isoflavonverbindungen in dem Pflanzenmaterial leicht zugänglich für externe Reagenzien oder Reaktanten sind, wie z. B. kleine belaubte Teile von bestimmten Pflanzen, kann es überflüssig sein, das Pflanzenmaterial einer solchen Bearbeitung zu unterwerfen.

[0030] In einem ersten Schritt oder Vorgang, werden das Pflanzenprotein und die Isoflavonverbindungen, welche die Isoflavonkonjugate enthalten, aus dem Pflanzenproteinmaterial extrahiert. Die Flocken werden mit einem wässrigen Extraktionsmittel extrahiert, welches einen pH oberhalb etwa dem isoelektrischen Punkt des Proteinmaterials besitzt, vorzugsweise bei einem pH von etwa 6,0 bis etwa 10,0, und besonders vorzugsweise bei einem pH von etwa 6,7 bis etwa 9,7. Typischerweise können basische Reagenzien, wie z. B. Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid und Kalziumhydroxid eingesetzt werden, wenn notwendig, um den pH des wässrigen Extraktionsmittels auf einen höheren Wert zu bringen. Die begehrten Isoflavonverbindungen und Pflanzenproteine sind in dem wässrigen Extrakt löslich.

[0031] Man zieht es vor die Wiedergewinnung dieser Verbindungen in dem wässrigen Extrakt zu maximieren, indem das Gewichtsverhältnis der Sojabohnenflocken oder anderer Pflanzenproteinmaterialien zu dem Extraktionsmittel auf spezifische Werte geregelt wird, um somit soviel wie möglich der Isoflavone in dem Pflanzenmaterial zu lösen. Die Extraktion der Proteine und der Isoflavone kann mit herkömmlichen Extraktionsverfahren durchgeführt werden, einschließlich einer Gegenstrom-Extraktion des pflanzlichen Proteinmaterials, vorzugsweise bei einem Gewichtsverhältnis des wässrigen Extraktionsmittels zu dem pflanzlichen Proteinmaterial von etwa 8:1 bis etwa 16:1. Nach dem Extrahieren des pflanzlichen Proteinmaterials, ergibt das Extraktionsmittel einen wässrigen Extrakt des Proteins und der Isoflavone.

[0032] Alternativ kann ein zweistufiges Extraktionsverfahren verwendet werden, wobei vorzugsweise das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Pflanzenproteinmaterial in einer ersten Extraktion etwa 10:1 beträgt, und das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Pflanzenproteinmaterial in einer zweiten Extraktion etwa 6:1, oder weniger, ausmacht, so dass das kombinierte Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Pflanzenproteinmaterial in den beiden Extraktionen das Gesamtgewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Pflanzenproteinmaterial von etwa 16:1 nicht übersteigt. Andere Extraktionsverfahren können ebenso verwendet werden, bei denen sich das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Pflanzenproteinmaterial auf vorzugsweise 16:1 oder weniger beläuft.

[0033] In einem ersten Isoflavon-Umwandlungsschritt oder Vorgang wird ein Großteil der Isoflavonkonjugate in dem wässrigen Extrakt zu Isoflavonglukosiden umgewandelt, um so einen mit Isoflavonglukosid angereicherten Extrakt herzustellen. Es wurde gefunden, dass die Umwandlung abhängig ist von dem pH und der Temperatur des wässrigen Extraktes.

[0034] Der pH-Bereich zur Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden erstreckt sich von etwa 6 bis auf etwa 13,5. Der pH des wässrigen Extraktes sollte, wenn notwendig, auf den gewünschten pH eingestellt werden, mit einer geeigneten Base, einem Beizmittel oder einem alkalischen Reagenz, wenn der pH erhöht werden soll, oder, wenn der pH erniedrigt werden soll, mit einer geeigneten Säure oder einem sauren Reagenz. Es stellte sich heraus, dass die Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden basenkatalysiert ist, und so wird es besonders bevorzugt einen hohen pH zu nutzen, um eine schnelle Umwandlung zu erhalten. Der am meisten bevorzugte pH zur Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden ist ein pH von etwa 9 bis etwa 11.

[0035] Der Temperaturbereich zur Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden erstreckt sich von etwa 2°C bis auf etwa 121°C. Der Temperaturbereich, bei dem die Umwandlung mühelos abläuft, hängt von dem pH des wässrigen Extraktes ab. Die Erfinder haben gefunden, dass die Umwandlung mühelos bei einer niedrigen Temperatur ablauft, wenn der pH relativ hoch ist. Zum Beispiel, bei einem pH von etwa 11 läuft die Umwandlung schnell und effizient in einem Temperaturbereich von etwa 5°C bis etwa 50°C ab. Bei einem pH von etwa 9 findet die Umwandlung effizient innerhalb eines Temperaturbereiches von etwa 45°C bis etwa 75°C statt. Wenn der pH des wässrigen Extraktes relativ niedrig ist, findet die Umwandlung bei höheren Temperaturen statt. Zum Beispiel, bei einem pH von etwa 6, läuft die Umwandlung innerhalb eines Temperaturbereiches von etwa 80°C bis etwa 121°C ab. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Umwandlung bei etwa 35°C und einem pH von etwa 11 ausgeführt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Umwandlung bei einer Temperatur von etwa 73°C und einem pH von etwa 9 ausgeführt.

[0036] Die benötigte Zeitdauer zur Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden in dem ersten Umwandlungsschritt hängt in erster Linie von dem verwendeten pH und dem Temperaturbereich ab. Derartige Umwandlungszeiten reichen typischerweise von etwa 15 Minuten bis hinauf zu mehreren Stunden oder länger. Die Umwandlung läuft bei einem höheren pH und bei einer höheren Temperatur schneller ab. Bei einem pH von etwa 9, wird die Umwandlung im Wesentlichen innerhalb von etwa 4 Stunden bis etwa 6 Stunden bei 73°C abgeschlossen sein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden in etwa 30 Minuten bis etwa 1 Stunde umgewandelt, vorzugsweise in etwa 45 Minuten, bei einem pH von etwa 11 und bei einer Temperatur von etwa 35°C.

[0037] Der erste Umwandlungsschritt wird vorzugsweise in einem wässrigen System durchgeführt. Andere wasserverträgliche Komponenten können in dem System ebenso gut vorhanden sein, wie z. B. Alkohole mit einem niedrigen Molekulargewicht und andere wasserlösliche Lösungsmittel.

[0038] Der erste Isoflavon-Umwandlungsschritt ist bemerkenswert effizient, wobei ein Großteil von etwa 80% bis etwa 100% der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden umgewandelt wird. Bei Einsatz der bevorzugten vorher beschriebenen Reaktionsparameter ist es möglich Umwandlungen von 95% oder höher zu erreichen. Diese hohe Umwandlungsraten sind besonders attraktiv für den kommerziellen Betrieb im Großmaßstab.

[0039] In einem zweiten Isoflavon-Umwandlungsschritt oder Vorgang werden die in dem ersten Umwandlungsschritt hergestellten Isoflavonglukoside, sowie auch die vorher in dem wässrigen Extrakt vorhandenen Isoflavonglukoside, durch enzymatische Reaktion zu Aglukon-Isoflavonen umgewandelt. Die Umwandlung erzeugt einen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt aus dem mit Isoflavonglukosid angereicherten Extrakt.

[0040] Es wurde gefunden, dass der zweite Umwandlungsschritt abhängig ist von der Konzentration der in dem Extrakt vorhandenen Enzyme und den Merkmalen derselben. Die Enzyme, die benötigt werden um die Umwandlung zu bewirken, sind Enzyme, die in der Lage sind die Glukosidbindung zwischen der Isoflavonhälfte und dem Glukosemolekül der Isoflavonglukoside zu spalten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Enzyme Saccharindase-, Esterase- oder Glukoamylase-Enzyme verwendet, die fähig sind die 1,4-Glukosidbindungen zu spalten.

[0041] Die benötigte Konzentration an Enzymen, um die Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen umzuwandeln, ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich von den in dem wässrigen Extrakt vorhandenen Arten von Enzymen, der Verteilung der Enzymkonzentrationen, den Enzymaktivitäten und dem pH und der Temperatur des Extraktes während der Umwandlung. Die Enzyme können in dem Extrakt von Natur aus vorhanden sein, entweder aus dem Pflanzenproteinmaterial selbst, oder aus dem mikrobiellen Wachstum in dem Extrakt. Solche von Natur aus vorhandenen Enzyme werden hierin als "verbliebene" Enzyme bezeichnet, und Enzyme die zu dem Extrakt hinzugegeben worden sind, werden hierin als "zusätzliche" Enzyme bezeichnet.

[0042] Es sollte eine ausreichende Menge an Enzym in dem Extrakt vorhanden sein, um zumindest einen Großteil und vorzugsweise im Wesentlichen alles an Isoflavonglukosiden zu Aglukon-Isoflavonen umzuwandeln. Im Allgemeinen, wenn die Enzyme in dem Extrakt nicht ausreichend sind, um die Umwandlung zu bewirken, sollten zusätzliche Enzyme zu dem Extrakt zugegeben werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden zusätzliche Enzyme zu dem Extrakt hinzugegeben, ungeachtet ob ausreichend verbliebene Enzyme in dem Extrakt vorhanden sind, da das Zugeben von zusätzlichen Enzymen die Zeit dramatisch vermindert, die benötigt wird, um eine vollständige Umwandlung der Glukoside zu Aglukonen zu bewirken. Wenn zusätzliche Enzyme zugegeben werden sollten die zusätzlichen Enzyme derart zugegeben werden, dass sich die Gesamtkonzentration des vorhandenen Enzyms auf etwa 0,1% bis etwa 10 Gew.% des Pflanzenproteinmaterials, bezogen auf die Trockenmasse, beläuft.

[0043] Die zusätzlichen Enzyme werden unter Bezugnahme auf eine optimale Wirksamkeit bei den gewählten pH- und Temperaturbedingungen sowie in Bezug auf die Kostenwirksamkeit ausgewählt. Die zusätzlichen Enzyme sind Enzyme, die in der Lage sind die Bindungen zwischen der Isoflavonhälfte und dem Glukosemolekül der Isoflavonglukoside zu spalten, wie z. B. Saccharidase-, Esterase- und Glukoamylase-Enzyme, die in der Lage sind 1,4-Glukosidbindungen zu spalten. Bevorzugte zusätzliche Enzyme sind käuflich erhältliche alpha- und beta-Glusosidase-Enzyme, beta-Galactosidase-Enzyme, Glucoamylase-Enzyme und Pektinase-Enzyme. Besonders bevorzugt werden Enzyme wie z. B. Biopectinase 100 L (welches vorzugsweise in einem pH-Bereich von etwa 3 bis etwa 6 verwendet wird), Biopectinase 300 L (optimaler pH-Bereich von etwa 3 bis etwa 6), Biopectinase OK 70 L (optimaler pH-Bereich von etwa 3 bis etwa 6), Biolactase 30.000 (optimaler

pH-Bereich von etwa 3 bis etwa 6), Neutral Lactase (optimaler pH-Bereich von etwa 6 bis etwa 8), die alle bei Quest International, 1833 57th Street, Post Office Box 3917, Sarasota, Florida 34243 erhältlich sind. Ebenso besonders bevorzugt sind Lactase F (welches vorzugsweise in einem pH-Bereich von etwa 4 bis etwa 6 verwendet wird), und Lactase 50.000 (optimaler pH-Bereich von etwa 4 bis etwa 6), beide bei Amano International Enzym Co, Inc., Post Office Box 1000, Troy, Virginia 22974 erhältlich. Andere besonders bevorzugte zusätzliche Enzyme beinhalten G-Zyme G990 (optimaler pH von etwa 4 bis etwa 6) und Enzeco Fungal Lactase Konzentrat (optimaler pH von etwa 4 bis etwa 6) erhältlich bei Enzym Development Corporation, 2 Penn Plaza, Suite 2439, New York, New York 10121; Lactozyme 3000 L (welches vorzugsweise in einem pH-Bereich von etwa 6 bis etwa 8 verwendet wird), und Alpha-Gal 600 L (welches vorzugsweise in einem pH-Bereich von etwa 4 bis etwa 6,5 verwendet wird), erhältlich bei Novo Nordisk Bioindustrials, Inc, 33 Turner Road, Danbury, Connecticut 06813; Maxilact L2000 (welches vorzugsweise in einem pH-Bereich von etwa 4 bis etwa 6 verwendet wird), erhältlich bei Gist Brocades Food Ingredients, Inc., King of Prussia, Pennsylvania, 19406; und Neutral Lactase (welches vorzugsweise in einem pH-Bereich von etwa 6 bis etwa 8 verwendet wird), erhältlich bei Pfizer Food Science Group, 205 East 42nd Street, New York, New York 10017.

[0044] Der pH-Bereich zur Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen liegt bei etwa 3 bis etwa 9. Der pH, der verwendet wird, hängt in erster Linie von der Art des verwendeten Enzyms ab, und sollte dementsprechend ausgewählt werden. Das verbliebene Enzym ist innerhalb eines pH-Bereiches von etwa 7 bis etwa 9 aktiv, obwohl es angenommen wird, dass der pH des Extraktes im Laufe der Umwandlung erniedrigt wird. Die zusätzlichen Enzyme sind innerhalb eines optimalen pH-Bereiches aktiv, der durch den Hersteller des Enzyms spezifisiert wird, wie oben für mehrere spezifische Enzyme dargestellt. Typischerweise sind die zusätzlichen Enzyme entweder in einem neutralen pH-Bereich von etwa 6 bis etwa 8, oder in einem sauren pH-Bereich von etwa 3 bis etwa 6 aktiv.

[0045] Der pH kann bei dem gewünschten Wert eingestellt werden zum Durchführen des zweiten Isoflavon-Umwandlungsschrittes. In den meisten Fällen wird der pH von einem relativ hohen oder alkalischen pH des ersten Isoflavon-Umwandlungsschrittes durch Zugabe von einer oder von mehreren geeigneten Säuren vermindert, wie z. B. Essigsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salzsäure oder irgendeinem anderen geeigneten Reagenz.

[0046] Der Temperaturbereich für den zweiten Isoflavon-Umwandlungsschritt liegt bei etwa 5°C bis etwa 75°C. Die Temperatur wirkt sich deutlich auf die Aktivität der Enzyme aus, und somit auf die Umwandlungsrate. Die zusätzlichen Enzyme können oberhalb von 70°C aktiv sein, zum Beispiel ist Alpha-Gal 600 L bei 75°C aktiv, jedoch wird es bevorzugt die Umwandlung bei niedrigeren Temperaturen durchzuführen, um eine Deaktivierung des Enzyms zu vermeiden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Umwandlung zwischen etwa 35°C und etwa 45°C durchgeführt.

[0047] Die für den zweiten Isoflavon-Umwandlungsschritt benötigte Zeit hängt von den enzymbezogenen Faktoren ab, insbesondere von der Konzentration, der Temperatur und dem pH des Systems. In den meisten Fällen ist es möglich eine im Wesentlichen vollständige Umwandlung innerhalb von 24 Stunden zu erhalten, jedoch wird es bevorzugt, dass das zusätzliche Enzym zugegeben wird, um die Geschwindigkeit der Reaktion drastisch zu erhöhen. Das gewählte zusätzliche Enzym, die Enzym-Konzentration, der pH und die Temperatur führen zu einer vollständigen Umwandlung innerhalb von vorzugsweise 2 Stunden, und insbesondere innerhalb 1 Stunde.

[0048] Die sehr hohen Umwandlungswerte mit diesem Verfahren sind derart, dass zumindest ein Großteil, und vorzugsweise im Wesentlichen alle der in dem Extrakt vorhandenen Isoflavonglukoside, in die Aglukonform umgewandelt werden. Der Begriff "ein Großteil" bezieht sich auf ein Ausmaß der Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen von mindestens etwa 50%. Der Begriff "im Wesentlichen alle" bezieht sich auf ein Ausmaß der Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen von mindestens etwa 80%, und insbesondere von mindestens etwa 90%. Derart hohe Umwandlungsraten auf einer zuverlässigen Basis sind bemerkenswert und sie sind wünschenswert für gewerbliche Anwendungen.

[0049] Ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Proteinmaterial kann aus dem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt gewonnen werden. Nach dem Abschluss des zweiten Isoflavon-Umwandlungsschrittes wird der pH durch Zugabe einer Säure, wenn notwendig, auf etwa den isoelektrischen Punkt des Pflanzenproteins eingestellt, für das Sojaprotein im Allgemeinen zwischen etwa 4,0 und etwa 5,0 und vorzugsweise zwischen etwa 4,4 und etwa 4,6. Das Protein wird aus dem Extrakt mit eingestelltem pH Wert in der Form eines käsigen Niederschlages ausgefällt. Ein deutlicher Teil der Aglukon-Isoflavone ist in dem käsigen Niederschlag eingefangen. Nach der Ausfällung wird der käsige Niederschlag oder das ausgefällte Protein von dem Extrakt ab-

getrennt, um ein mit Aglukon-Isoflavonen angereichertes Proteinmaterial zu bilden. Vorzugsweise wird das mit Aglukon-Isoflavon angereicherte Proteinmaterial durch Zentrifugieren oder Filtrieren von dem Extrakt abgetrennt.

[0050] In der am meisten bevorzugten Ausführungsform wird das Waschen des abgetrennten Proteinmaterials entweder völlig vermieden oder minimiert, um im Wesentlichen die Entfernung der Aglukon-Isoflavone aus dem Proteinmaterial zu vermindern. Das Waschen des Proteinmaterials mit Wasser sollte deshalb vollständig vermieden werden oder auf ein einmaliges Waschen mit Wasser beschränkt werden, während welchem das Gewichtsverhältnis des Wassers zu dem Proteinmaterial zwischen etwa 2:1 bis etwa 6:1 liegt. Das Fehlen des Waschens des ausgefällten käsigen Niederschlages liefert ein Proteinmaterial, das mit dem gewünschten Wert an Isoflavonen angereichert ist, wenn auch mehr ausgedehntes Waschen durchgeführt werden kann, wobei aber dann weniger Isoflavone gewonnen werden können.

[0051] Das abgetrennte Proteinmaterial kann entwässert werden, durch Zentrifugieren oder Aufkonzentration, oder einer Kombination dieser Verfahren, und wird in einer herkömmlichen Art und Weise getrocknet. In der bevorzugten Ausführungsform ist es nicht beabsichtigt auf eine bestimmte Entwässerungsart eingeschränkt zu sein, obwohl es bevorzugt wird, herkömmliche Entwässerungs- und Trockentechniken zu benutzen, wie z. B. das Zentrifugieren und Sprühtrocknen, um ein trockenes Proteinmaterial zu bilden.

[0052] Das vorher beschriebene Verfahren aus der bevorzugten Ausführungsform benutzt sowohl den ersten als auch den zweiten Isoflavon-Umwandlungsschritt direkt nachdem der Extrakt erhalten worden ist. Die vorliegende Erfindung beinhaltet ebenso ein Verfahren, in dem ein Pflanzenmaterial, das Isoflavonkonjugate und Protein enthält, mit einem wässrigen Extraktionsmittel extrahiert wird, das einen pH besitzt, der über etwa dem isoelektrischen Punkt des Proteins liegt; der erste Isoflavon-Umwandlungsschritt wird an dem Extrakt durchgeführt; ein Proteinmaterial, das Isoflavonglukoside enthält wird von dem Extrakt abgetrennt; und der zweite Isoflavon-Umwandlungsschritt wird an dem Proteinmaterial durchgeführt. Die Schritte in diesem Verfahren können in der gleichen allgemeinen Art durchgeführt werden, wie oben beschrieben.

[0053] Die vorliegende Erfindung beinhaltet ferner ein Verfahren, bei dem ein wässriger Schlamm aus einem Pflanzenmaterial, das Isoflavonkonjugate und Protein enthält, gebildet wird, wobei der erste Isoflavon-Umwandlungsschritt an dem wässrigen Schlamm durchgeführt wird; das Pflanzenmaterial mit einem wässrigen Extraktionsmittel extrahiert wird, welches einen pH oberhalb etwa dem isoelektrischen Punkt des Proteins besitzt; und der zweite Isoflavon-Umwandlungsschritt an dem Isoflavonglukosid in dem Extrakt durchgeführt wird. Der wässrige Schlamm des Pflanzenmaterials enthält vorzugsweise bis zu 20 Gew.% Pflanzenmaterial. Die Schritte dieses Verfahrens können in der gleichen allgemeinen Art durchgeführt werden wie dies oben beschrieben worden ist. Darüber hinaus kann ein Proteinmaterial, das Aglukon-Isoflavone enthält, nach dem zweiten Isoflavon-Umwandlungsschritt in der oben beschriebenen Art von dem Extrakt abgetrennt werden.

[0054] Die vorliegende Erfindung beinhaltet ebenso ein Verfahren, im dem ein Pflanzenproteinmaterial, das Isoflavonkonjugate und Protein enthält, mit einem wässrigen Extrakt extrahiert wird, der einen pH oberhalb etwa dem isoelektrischen Punkt des Proteins besitzt; ein Proteinmaterial, das Isoflavonkonjugate enthält, wird von dem Extrakt abgetrennt; ein wässriger Schlamm wird aus dem Proteinmaterial gebildet; und der erste und der zweite Isoflavon-Umwandlungsschritt werden jeweils an dem wässrigen Schlamm des Proteinmaterials durchgeführt. Der wässrige Schlamm des Proteinmaterials enthält vorzugsweise bis zu 30 Gew.% an Proteinmaterial. Die Schritte dieses Verfahrens können in der gleichen allgemeinen Art wie oben beschrieben durchgeführt werden.

[0055] Es ist beabsichtigt, dass sowohl der erste als auch der zweite Isoflavon-Umwandlungsschritt an dem wässrigen Schlamm des Pflanzenmaterials, welches Isoflavonkonjugate und Protein enthält, an einem Extrakt eines solchen Pflanzenmaterials, und an einem Proteinmaterial, welches von solch einem Extrakt abgetrennt wurde, durchgeführt werden können. Die vorliegende Erfindung beinhaltet Kombinationen von einigen der vorhergehenden Schritte, um einen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt oder ein angereichertes Proteinmaterial zu bilden.

[0056] Ein Material mit einem hohen Genisteingehalt und ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt können aus dem gewonnenen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterial hergestellt werden. Gemäß dem hierin vorgesehenen Einsatz wird ein Material mit einem hohen Genisteingehalt als ein Pflanzenmaterial definiert, das mindestens 40% Genistein enthält, und insbesondere mindestens 90% Genistein, neben restlichem Pflanzenmaterial, welches ein übriggebliebenes Sojamaterial ist, wenn das Material mit einem hohen Genisteingehalt aus dem Sojamaterial gewonnen wurde. Ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt enthält

mindestens 40% Daidzein neben restlichem Pflanzenmaterial, welches Sojamaterial ist, wenn das Material mit einem hohen Daidzeingehalt aus Sojamaterial gewonnen wurde.

[0057] Das mit Aglukon-Isoflavon angereicherte Proteinmaterial kann zu Beginn gewaschen und abfiltriert werden, um unerwünschte Salze und Zucker zu entfernen. Das mit Aglukon-Isoflavon angereicherte Proteinmaterial wird mit Wasser vermischt, wobei das Wasser bis zu einem Verhältnis von 6:1 auf das Proteinmaterial bezogen vorhanden ist. Das Wasser sollte kalt sein, um die Löslichkeit der Aglukon-Isoflavone in dem Wasser zu minimieren, und vorzugsweise besitzt es eine Temperatur von etwa 5°C bis etwa 30°C. Das Proteinmaterial wird während etwa 15 bis etwa 30 Minuten in dem Wasser gemischt, und dann wird das Proteinmaterial mit Hilfe einer herkömmlichen Filtervorrichtung von dem Wasser abgetrennt, vorzugsweise durch Filtrieren der Mischung durch herkömmliches Filterpapier. Der Wasch- und Filtrationsschritt kann vermieden werden, wenn gewünscht, um irgendeinen möglichen Verlust von Aglukon-Isoflavonen in das Waschwasser zu verhindern.

[0058] Das mit Aglukon-Isoflavon angereicherte Proteinmaterial kann dann mit einem Extraktionsmittel aus wässrigen Alkohol extrahiert werden, um die Aglukon-Isoflavone von dem Proteinmaterial abzutrennen und um ein Aglukon-Isoflavon Extrakt zu erzeugen. Alkohole mit einem niedrigen Molekulargewicht, wie z. B. Methanol, und insbesondere Ethanol, werden als Alkoholkomponente des Extraktionsmittels bevorzugt. Es wurde gefunden, dass die Aglukon-Isoflavone bei fast allen Alkoholkonzentrationen des Extraktionsmittels löslich sind. Die Aglukon-Isoflavone sind besonders löslich, wenn das Extraktionsmittel zwischen etwa 30% Alkohol und etwa 90% Alkohol, und insbesondere wenn das Extraktionsmittel zwischen etwa 60% Alkohol und etwa 80% Alkohol enthält Obwohl wässriger Alkohol als Lösungsmittel bevorzugt wird, können andere Lösungsmittel, einschließlich Wasser, Acetonitril, Methylenchlorid, Aceton und Ethylacetat verwendet werden, um die Extraktion der Aglukon-Isoflavone aus dem Proteinmaterial zu bewirken.

[0059] Die Extraktion wird unter Einsatz einer minimalen Menge an Extraktionsmittel durchgeführt. Es wird bevorzugt, dass das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterial den Wert von 11:1 nicht übersteigt. Die Extraktion kann mit Hilfe irgendeines herkömmlichen Extraktionsverfahrens durchgeführt werden, einschließlich einer Gegenstrom-Extraktion oder einer Doppelextraktion, wobei das Gewichtsverhältnis der zusammengefassten Extrakte zu dem Proteinmaterial den Wert von 11:1 nicht überschreitet.

[0060] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Proteinmaterial zu Beginn mit 80%-igem Ethanol extrahiert, wobei das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Proteinmaterial bei etwa 6:1 liegt. Das Extraktionsmittel wird mit Hilfe eines herkömmlichen Abtrennungsweg von dem Proteinmaterial abgetrennt, wie z. B. einer Zentrifuge oder einer Filterpresse, und der Extrakt wird aufgefangen. Das Proteinmaterial wird erneut mit 80%-igem Ethanol extrahiert, wobei das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Proteinmaterial bei etwa 4:1 liegt. Das Extraktionsmittel wird erneut aufgefangen und zu dem anfänglich aufgefangenen Extrakt gegeben. Das Proteinmaterial wird dann mit einer Wasserspülung gewaschen, wobei das Gewichtsverhältnis des Wassers zu dem Proteinmaterial bei etwa 4:1 liegt, und das Wasser wird mit den aufgefangenen Extrakten vereinigt.

[0061] Obwohl die Extraktion bei jedem pH durchgeführt werden kann, wird es bevorzugt, dass das Extraktionsmittel einen pH von etwa 7 bis etwa 10 besitzt. Die Bildung eines Proteingels wird innerhalb des bevorzugten pH-Bereichs vermieden, und falls sowohl das Proteinmaterial als auch der Aglukon-Isoflavon Extrakt gewonnen werden sollen, wird innerhalb des bevorzugten pH-Bereichs die Bildung von unerwünschten Aminosäurenebenprodukten in dem Proteinmaterial vermieden.

[0062] Die Extraktion kann bei jeder Temperatur bis hoch zu dem Siedepunkt des Extraktionsmittels durchgeführt werden, und vorzugsweise wird sie zwischen etwa 25°C und etwa 70°C durchgeführt. Um die maximale Entfernung der Aglukon-Isoflavone aus dem Proteinmaterial zu bewirken, wird es bevorzugt, dass die Extraktion bei einer Temperatur von etwa 50°C bis etwa 70°C, insbesondere bei etwa 60°C durchgeführt wird.

[0063] Im Anschluss an die Extraktion kann ein Material mit einem hohen Genisteingehalt und ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt aus dem Aglukon-Isoflavon Extrakt abgetrennt werden, und zwar durch Zusammenbringen des Extraktes mit einem Adsorbermaterial während einer ausreichenden Zeit, um das Material mit einem hohen Genisteingehalt und das Material mit einem hohen Daidzeingehalt aus dem Extrakt abzutrennen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Material mit einem hohen Genisteingehalt und das Material einem hohen Daidzeingehalt aus dem Extrakt durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) abgetrennt. Genistein und Daidzein werden von den anderen Isoflavonen und den Verunreinigungen in dem Extrakt abgetrennt durch Eluieren des Extraktes durch die Partikel eines Adsorberma-

terials, welches das Genistein, Daidzein, andere Isoflavone und Verunreinigungen in einer verbindungsspezifischen Art auf eine wieder lösliche Weise an sich bindet, wodurch es ermöglicht wird jede der Verbindungen abzutrennen.

[0064] Das Aglukon-Isoflavon-Extrakt wird zu Beginn filtriert, um unlösliches Material, das eine HPLC-Säule verstopfen könnte, zu entfernen. Der Extrakt kann mit Hilfe eines jeden herkömmlichen Filtrierverfahrens filtriert werden. Insbesondere wird der Extrakt mit Hilfe eines herkömmlichen Ultrafiltrationsverfahrens filtriert, welches ebenso restliches Protein entfernt, das in dem Extrakt sein könnte.

[0065] Eine HPLC-Säule wird durch Packen einer herkömmlichen käuflich erhältlichen HPLC-Säule mit einem partikulären Adsorbermaterial hergestellt, welches das Genistein, Daidzein, andere Isoflavone und Verunreinigungen in einer verbindungsspezifischen Art auf eine wieder lösliche Weise bindet. Das Adsorbermaterial kann jedes Packmaterial zur Umkehrphasen-HPLC sein, obwohl ein bevorzugtes Packmaterial aufgrund von Kriterien wie Beladungskapazität, Abtrennungswirksamkeit und Kosten ausgewählt werden kann. Ein solches bevorzugtes Packmaterial ist Kromasil C18 16 □m 100 Å Perlen, erhältlich bei Eka Nobel, Nobel Industries, Schweden.

[0066] Der filtrierte Extrakt wird durch die gepackte HPLC-Säule geleitet bis alle Bindungsorte der Säule vollständig mit Isoflavonen gesättigt sind, was durch das Auftreten von Isoflavonen in dem Abwasser der Säule festgestellt wird. Die HPLC-Säule kann dann mit einem polaren Elutionsmittel gespült werden, um eine Abtrennung zu bewirken. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Elutionsmittel ein wässriger Alkohol. Das Elutionsmittel aus wässrigem Alkohol kann einen Alkoholgehalt zwischen etwa 30% und etwa 90% Alkohol enthalten, und vorzugsweise besitzt es einen Alkoholgehalt von etwa 50% Alkohol, um sowohl eine gute Abtrennung als auch eine gute Löslichkeit der Isoflavone bereitzustellen. Der Alkohol ist vorzugsweise Methanol oder Ethanol, wobei Ethanol besonders bevorzugt wird, wenn die Produkte mit einem hohen Genistein- oder einem hohen Daidzeingehalt in Lebensmitteln oder in Arzneimitteilanwendungen benutzt werden sollen.

[0067] Die Materialien mit entweder einem hohen Genstein- oder einem hohen Daidzeingehalt werden in dem Säulenabwasser angesammelt. Eine Fraktion des Abwassers, welche Daidzein enthält, löst sich als erste aus der Säule heraus, gefolgt von einer Glycitein-Fraktion, auf welche die polare Genstein-Fraktion folgt. Die Daidzein- und Genstein-Fraktionen werden aufgefangen, wenn sie aus der Säule herausgelöst werden. Die Glycitein-Fraktion kann ebenso aufgefangen werden, wenn gewünscht.

[0068] Der in den Fraktionen vorliegende Alkohol kann durch Verdampfen entfernt werden, wonach die Materialien mit einem hohen Genistein- und Daidzeingehalt sowie ein Material mit einem hohen Glyciteingehalt, mit Hilfe von herkömmlichen Abtrennungsverfahren abgetrennt werden können, wie z. B. Zentrifugieren oder Filtrieren. Das gewonnene Material mit einem hohen Genisteingehalt enthält mindestens 40% Genistein und vorzugsweise mindestens 90% Genistein, zusammen mit restlichem Pflanzenmaterial, welches restliches Sojamaterial ist, wenn das Genistein aus Sojamolke gewonnen wurde. Das gewonnene Material mit einem hohen Daidzeingehalt enthält mindestens 40% Daidzein, zusammen mit restlichem Pflanzenmaterial.

EXPERIMENTE

[0069] Die vorliegende Erfindung wird detaillierter durch die folgenden Beispiele dargestellt, welche ein Sojamaterial als Pflanzenmaterial nutzen. Die Beispiele sind zur Erläuterung bestimmt und sollten nicht als Begrenzungen oder andere Beschränkungen des Gegenstandes der Erfindung in irgendeiner Weise interpretiert werden.

[0070] Wie oben angesprochen enthält Sojamaterial die Genistein-, Daidzein-, und Glycitein- "Familien" der Isoflavone mit den entsprechenden Glukosid-, Konjugat-, und Aglukonmitgliedern, wobei die Genistein-Familie die Konjugate 6'-OMal-Genistin und 6''-OAc-Genistin, das Glukosid Genistin, und das Aglukon Genistein enthält, die Daidzein-Familie die Konjugate 6''-OMal-Daidzin und 6''-OAc-Daidzin, das Glukosid Daidzin, und das Aglukon Daidzein enthält, und die Glycitein-Familie das Konjugat 6''-OMal-Glycitin, das Glukosid Glycitin, und das Aglukon Glycitein enthält. In den folgenden Tabellen werden die relativen Konzentrationen der Isoflavone als ein Prozentsatz einer Familie der Isoflavone gemessen. Zum Beispiel, in der Genistein-Familie:% Genistin +% 6''-OMal-Genistin +% 6''-OAc-Genistin +% Genistein = 100%. Der Grad der Umwandlung der Konjugate zu Glukosiden, und der Glukoside zu Aglukonen kann durch Vergleichen der Prozentsätze jeder einzelnen Verbindungsart in einer Isoflavon-Familie bestimmt werden.

BEISPIEL 1

[0071] In einem ersten Experiment wird die Umwandlung von Isoflavonkonjugaten zu Isoflavonglukosiden in einem Soja-Extrakt untersucht. Der Umfang der Umwandlung wird bestimmt durch die quantitative Erniedrigung des Prozentsatzes an Malonsäure- und Essigsäureester einer Isoflavonfamilie gekoppelt mit der entsprechenden quantitativen Zunahme des Prozentsatzes eines Glukosids der gleichen Isoflavonfamilie.

[0072] Ein Soja-Extrakt wird hergestellt durch Aufschlämmen von 400 g feingemahlenen entfetteten Sojaflocken mit 4000 g Wasser. Der pH wird mit Natriumhydroxid auf 9,7 eingestellt und der Schlamm wird 15 Minuten auf 38°C unter Rühren erwärmt. Der Schlamm wird dann zentrifugiert und der Extrakt sammelt sich als obenstehende Flüssigkeit an.

[0073] Die Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden wird bei verschiedenen pH-Bedingungen und verschiedenen Temperaturen untersucht. 600 g-Proben des Extraktes werden mit Salzsäure oder Natriumhydroxid auf einen pH von 6, 7, 9 bzw. 11 eingestellt. Für jeden pH wird die 600 g-Probe in zwei 300 g-Proben aufgeteilt und diese Proben werden 24 Stunden bei 45°C und 72,5°C inkubiert. Eine periodische Analyse wird an jeder Probe nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden durchgeführt, um den Isoflavongehalt der Probe zu bestimmen. Die unten aufgeführte Tabelle 1 stellt die Umwandlung und die Verteilung der Isoflavone im Verlauf des Experimentes dar.

TABELLE 1

Probe	Genistin	6''-OMal Genistin	6''-OAc Genistin	Genistein	Daidzin	6''-OMal Daidzin	6''-OAc Daidzin	Daidzein	Glycitin	6''-OMal Glycitin	Glycitein
PROZENTSÄTZE											
pH 6, 45°C											
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 Min.	42	49	0	9	39	49	1	11	41	37	22
t=2 Std.	29	51	0	19	27	49	1	22	37	36	27
t=4 Std.	25	50	0	25	22	49	1	28	36	35	29
t=6 Std.	23	50	0	27	19	48	1	31	35	35	30
t=24 Std.	15	43	1	40	12	42	0	46	30	32	37
pH 7, 45°C											
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=0 Min.	43	48	0	9	40	48	1	11	42	36	22
t=2 Std.	38	48	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=4 Std.	37	47	0	16	32	47	1	20	41	36	23
t=6 Std.	36	46	0	18	31	46	1	22	41	35	24
t=24 Std.	18	42	0	39	13	41	0	46	31	34	35
pH 9, 45°C											
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 Min.	46	46	0	8	43	46	1	10	45	33	23
t=2 Std.	51	41	0	8	49	40	1	10	49	30	21
t=4 Std.	57	36	0	7	54	35	1	10	52	27	21

t=6 Std.	60	33	0	7	58	31	0	10	54	25	21	
t=8 Std.	58	26	0	15	55	25	0	20	50	23	27	
pH 11, 45°C												
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23	
t=10 Min.	73	20	0	8	71	19	0	10	62	19	19	
t=2 Std.	92	0	0	7	91	0	0	9	82	0	18	
t=4 Std.	93	0	0	7	90	0	0	10	82	0	18	
t=6 Std.	93	0	0	7	90	0	0	10	81	0	19	
t=24 Std.	95	0	0	5	87	0	0	13	78	0	22	
pH 6, 72,5°C												
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23	
t=10 Min.	42	48	0	9	40	48	1	12	40	35	24	
t=2 Std.	50	41	0	9	47	40	1	12	47	29	24	
t=4 Std.	56	34	0	9	53	34	1	12	52	23	24	
t=6 Std.	61	30	0	9	58	29	2	12	53	23	25	
t=24 Std.	84	7	0	9	80	6	2	12	66	5	29	
pH 7, 72,5°C												
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23	
t=10 Min.	45	40	0	9	41	47	1	11	43	36	22	
t=2 Std.	54	21	0	8	50	38	1	10	47	30	23	
t=4 Std.	61	11	0	8	58	30	1	10	52	24	24	
t=6 Std.	67	6	0	8	63	25	1	10	56	20	24	
t=24 Std.	90	0	0	5	85	4	1	9	68	4	28	
pH 9, 72,5°C												

t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 Min.	53	40	0	7	50	39	1	10	47	31	22
t=2 Std.	73	21	0	6	70	20	0	9	58	22	20
t=4 Std.	83	11	0	6	80	10	0	9	67	14	19
t=6 Std.	88	6	0	5	85	6	0	9	73	8	19
t=24 Std.	96	0	0	4	91	0	0	9	80	0	20
pH 11, 72,5°C											
t=0	44	47	0	13	35	48	1	16	40	37	23
t=10 Min.	89	3	0	8	87	3	0	9	79	3	18
t=2 Std.	94	0	0	6	90	0	0	10	81	0	19
t=4 Std.	94	0	0	6	87	0	0	13	75	3	22
t=6 Std.	94	0	0	6	86	0	0	14	74	3	23
t=24 Std.	95	0	0	3	78	0	2	20	70	4	27

[0074] Wie durch die relative Konzentrationsabnahme der Verbindungen 6''-OMal- und 6''-OAc-Isoflavonkonjugat und der entsprechenden Konzentrationszunahme der Glukoside Genistin, Daidzin und Glycitin angezeigt, ist der erste Umwandlungsschritt schneller und vollständiger bei höheren, mehr basischen pH-Bedingungen und höheren Temperaturen. Im Wesentlichen findet eine vollständige Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden bei den Proben mit einem pH von 9 und 11, bei sowohl 45°C als auch 72,5°C statt, jedoch entstehen weniger Daidzin und Glycitin bei einem pH von 11 und 72,5°C. Die Umwandlung läuft ebenso bis fast zur Vervollständigung bei den Proben mit einem pH von 6 sowie 7 und bei 72,5°C ab. Eine beträchtliche Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen durch verbliebenes Enzym in dem Extrakt findet bei den Proben mit einem pH von 6 sowie 7 und bei 45°C statt, obwohl die Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Isoflavonglukosiden nicht besonders wirksam unter diesen Bedingungen ist.

BEISPIEL 2

[0075] In einem zweiten Experiment wird die Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen untersucht. Der Grad der Umwandlung wird bestimmt durch die quantitative Abnahme des Prozentsatzes des Glukosids der Isoflavon-Familie gekoppelt mit einer entsprechenden quantitativen Zunahme des Prozentsatzes des Aglukons der gleichen Isoflavon-Familie.

[0076] Ein mit Isoflavon-Glukosid angereicherter Extrakt wird aus Sojaflocken durch Einstellen des pH Wertes eines Soja-Extraktes auf etwa 11 bei einer Temperatur von etwa 35°C während etwa 1 Stunde hergestellt. In den ersten Proben wird die Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen durch das Verwenden von verbliebenem Enzym, welches in einem mit Isoflavonglukosid angereicherten Extrakt vorliegt, durch Einstellen des pH Wertes der Proben auf pH 7,0 und pH 9,0 und durch Halten der Proben während 24 Stunden bei 45°C bewirkt. Die Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen wird bewirkt durch Verwenden eines zusätzlichen Enzyms durch Dosieren der Proben eines mit Isoflavonglukosid angereicherten Extraktes mit den folgenden kommerziell erhältlichen zusätzlichen Enzymen Biolactase 30.000, Quest Neutral Lactase, Lactase 50.000, Biopectinase 100 L, und Alpha Gal 600. Die Menge an Enzym, die zu jeder Probe zugegeben wird, wird in der unten aufgeführten Tabelle 2 angezeigt. Jede Probe wird auf einen pH Wert eingestellt, bei dem das zusätzliche Enzym wirksam ist, entweder 4,0 oder 4,5 oder 7.0. Die Proben werden bei Temperaturen von 35°C bis 75°C inkubiert. Proben werden zu ausgewählten Zeiten entnommen und bzgl. des Isoflavongehaltes gemessen.

TABELLE 2

Probe	Genistin	6"-OMal Genistin	6"-OAc Genistin	Genistein	Daidzin	6"-OMal Daidzin	6"-OAc Daidzin	Daidzein	Glycitin	6"-OMal Glycitin	Glycitein
PROZENTSATZ											
Verbliebenes Enzym, pH 7,0, 45°C											
t=0	94	1	1	5	93	1	0	6	75	2	23
t=3 Std.	94	1	1	5	93	1	0	6	75	2	22
t=6 Std.	84	1	1	14	86	1	1	13	73	3	24
t=24 Std.	29	1	1	69	42	2	2	54	45	3	53
Verbliebenes Enzym, pH 9,0, 45°C											
t=0	94	1	1	5	93	1	0	6	75	2	23
t=3 Std.	93	1	1	5	94	1	0	6	74	2	24
t=6 Std.	93	1	1	5	94	1	0	6	74	2	24
t=24 Std.	0	1	0	99	1	1	4	93	18	5	77
Lactase 50.000, pH 4,0, 50°C											
0,12g/100g Extrakt											
t=0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0
t=1 Std.	6	0	0	94	30	0	0	70	40	19	41
Biolactase 30.000, pH 4,5, 35°C											
0,05g/100g Extrakt											
t=0	93	4	0	4	93	3	0	5	100	0	0
t=1 Std.	26	4	0	70	16	3	0	80	40	0	60
t=2 Std.	10	4	0	85	4	3	0	92	26	0	74
t=3 Std.	5	4	0	91	0	3	0	97	19	0	81
Alpha Gal 600, pH 4,5, 75°C											

10g/100g												
t=0	91	0	0	9	89	0	0	11	78	0	22	
t=24 Std.	1	0	0	99	0	0	2	98	0	0	100	
Biopectinase 100L, pH 4,0, 50°C												
0,2g/100g Extrakt												
t=0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	
t=1 Std.	67	0	0	33	58	0	0	42	87	13	0	
Quest Neutral Lactase, pH 7,0, 35°C												
0,05g/100g Extrakt												
pH 4,5												
t=0	93	4	0	4	93	3	0	5	100	0	0	
t=1 Std.	66	4	0	30	66	3	0	31	77	0	23	
t=2 Std.	50	4	0	46	51	3	0	46	67	0	33	
t=3 Std.	36	4	0	59	37	3	0	59	58	0	42	
t=24 Std.	1	4	0	95	0	3	0	97	0	0	100	

[0077] Wie durch die Umwandlung von Genistin, Daidzin und Glycitin zu Genistein, Daidzein bzw. Glycitein gezeigt wird, findet eine im Wesentlichen vollständige Umwandlung der Isoflavonglukoside zu Aglukon-Isoflavonen statt. Ausgewählte zusätzliche Enzyme erhöhen erkennbar die Rate der Umwandlung, im Verglichen mit der Umwandlung durch ein verbliebenes Enzym in dem Extrakt, was eine im Wesentlichen vollständige Umwandlung innerhalb 1 Stunde bei wirksamen Werten der Konzentration, Temperatur und des pH Wertes bewirkt.

BEISPIEL 3

[0078] In einem anderen Experiment wird ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Proteinmaterial aus einem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt gewonnen und ein herkömmliches Proteinmaterial wird aus einem herkömmlichen Extrakt gewonnen. Der Isoflavongehalt in den gewonnenen Proteinmaterialien eines jeden Extraktes wird durch eine Abtrennung bei einem pH von 4,0, 4,5 und 5,0 bestimmt.

[0079] Ein mit Aglukon-Isoflavon angereicherter Soja-Extrakt wird hergestellt durch 1) Extrahieren entfetteter Sojaflocken mit einer wässrigen basischen Lösung; 2) Einstellen des pH Wertes des Extraktes auf 11 und Halten des Extraktes bei 35°C während 1 Stunde, um ein mit Isoflavonglukosid angereichertes Extrakt zu erzeugen; und 3) Zugeben von 0,1 Gew.% an Lactase 50.000 (Amano International Enzym Co) zu dem Extrakt, wobei die Gewichtsprozente sich auf die Feststoffe in dem mit Isoflavonglukosid angereicherten Extrakt beziehen, und Behandeln der Mischung bei 50°C und einem pH Wert von 4,5 während 1 Stunde, um einen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt zu produzieren. Ein herkömmlicher Soja-Extrakt wird ebenso hergestellt, wobei der herkömmliche Extrakt durch Extrahieren der entfetteten Sojaflocken mit einer wässrigen basischen Lösung erzeugt wird.

[0080] Eine Probe, welche 10 g an Feststoffen enthält, wurde aus jedem Extrakt erhalten, und die Proben eines jeden Extraktes wurden auf einen pH Wert von 4,5 eingestellt. Ein Proteinmaterial wurde aus jeder Probe durch Zentrifugieren der Probe und Dekantieren der obenstehenden Molke von dem Proteinmaterial abgetrennt. Der Isoflavongehalt des abgetrennten Proteinmaterials einer jeden Probe wurde dann bestimmt. Die unten aufgeführte Tabelle 3 zeigt den gesamten Isoflavongehalt in Milligramm pro Probe und den Prozentsatz einer jeden Isoflavonart einer Isoflavon-Familie, welche in dem Proteinmaterial einer jeden der Proben vorhanden war.

TABELLE 3

Probe	Genistin	6"-OMal Genistin	6"-OAc Genistin	Genistein	Daidzin	6"-OMal Daidzin	6"-OAc Daidzin	Daidzein	Glycitin	6"-OMal Glycitin	Glycitein
mg/PROBE											
Aglukon-Isoflavon angereichertes Proteinmaterial, Abtrennung pH 4,5											
Protein	1,4	0,0	0,0	9,7	0,0	0,0	0,0	5,8	0,4	0,0	0,5
Herkömmliches Proteinmaterial, Abtrennung pH 4,5											
Protein	1,6	4,3	0,0	1,6	0,7	2,3	0,0	1,2	0,0	0,4	0,4
PROZENTSATZ											
Aglukon-Isoflavon angereichertes Proteinmaterial, Abtrennung pH 4,5											
Protein	13	0	0	87	0	0	0	100	49	0	51
Herkömmliches Proteinmaterial, Abtrennung pH 4,5											
Protein	21	58	0	21	16	55	0	28	0	52	48

[0081] Wenn man den Isoflavongehalt des Proteinmaterials aus dem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt und das Proteinmaterial aus dem herkömmlichen Extrakt miteinander vergleicht, kann es erkannt werden, dass das Proteinmaterial aus dem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt wesentlich höhere Mengen an Aglukon-Isoflavonen, insbesondere Genistein und Daidzein, enthält als das Proteinmaterial aus dem herkömmlichen Extrakt. Das Proteinmaterial aus dem herkömmlichen Extrakt enthält beträchtliche Mengen an Isoflavonkonjugaten, welche in dem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterial aufgrund der Umwandlung der Isoflavonkonjugate zu Aglukon-Isoflavonen in dem mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extrakt fehlen.

[0082] In den obigen Beispielen sind alle angegebenen Prozentsätze für 6''-OMal-Genistin, 6''-OAc-Genistin, 6''-OMal-Daidzin, 6''-OAc-Daidzin, Glycitin, 6''-OMal-Glycitin, und Glycitein berechnete Werte. Die angegebenen Prozentsätze oder die Enzymkonzentration werden berechnet aus den Grammen der kommerziellen Enzymzusammensetzung pro 100 Gramm Feststoff in jeder Probe. Das Folgende ist eine Beschreibung eines Verfahrens zum quantitativen Bestimmen der Isoflavone in den Sojaprodukten. Die Isoflavone werden aus den Sojaprodukten durch Mischen von 0,75 Gramm einer Probe (sprühgetrocknet oder feingemahlenes Pulver) mit 50 ml eines 80/20 Methanol/Wasser-Lösungsmittels extrahiert. Die Mischung wird 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem gewöhnlichen Schüttler geschüttelt. Nach 2 Stunden werden die verbliebenen ungelösten Materialien durch Filtration durch ein Whatman No. 42 Filterpapier entfernt. Fünf ml des Filtrates werden mit 4 ml Wasser und 1 ml Methanol vermischt.

[0083] Die extrahierten Isoflavone werden durch HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) unter Einsatz einer Hewlett Packard C18 Hypersil Umkehrphasensäule abgetrennt. Die Isoflavone werden auf die Säule gespritzt und mit einem Lösungsmittelgradienten beginnend mit 88% Methanol, 10% Wasser und 2% Eisessig und abschließend mit 98% Methanol und 2% Eisessig eluiert. Bei einer Durchfließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min werden alle Isoflavone – Genistin, 6''-O-Acetylgenistin, 6''-O-Malonylgenistin, Genstein, Daidzin, 6''-O-Acetyldaidzin, 6''-O-Malonyldaidzin, Daidzin, Glycitin und deren Derivate und Glycitein – voll aufgelöst. Die Peakbestimmung erfolgte durch UV-Absorption bei 260 mm. Die Identifizierung der Peaks wurde mit Hilfe von HPLC-Massenspektrometern durchgeführt.

[0084] Die quantitative Bestimmung wurde durchgeführt unter Einsatz von reinen Standards (Genistin, Genistein, Daidzin und Daidzein), vertrieben durch Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ. Der Empfindlichkeitsfaktor (integrierter Bereich/Konzentration) wird für jede der obigen Verbindungen berechnet und wird für mengenmäßig unbekannte Proben verwendet. Für die Konjugatformen für die kein reiner Standard erhältlich war, wurde angenommen dass die Empfindlichkeitsfaktoren diejenigen des Ursprungsmoleküls sind, jedoch korrigiert bzgl. des Unterschiedes des Molekulargewichtes. Der Empfindlichkeitsfaktor für Glycitin wird angenommen als derjenige des Genistin, korrigiert bzgl. des Unterschiedes des Molekulargewichtes. Dieses Verfahren liefert die Mengen eines jeden einzelnen Isoflavons. Zur Einfachheit können das gesamte Genistein, das gesamte Daidzein und das gesamte Glycitein berechnet werden, und sie stellen das Gruppengewicht dieser Verbindungen dar, wenn alle konjugierten Formen in ihre entsprechenden unkonjugierten Formen umgewandelt worden sind. Diese Gesamtwerte können auch direkt mit Hilfe einer Methode gemessen werden, welche die Säurehydrolyse zum umzuwandeln der konjugierten Formen nutzt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extraktes aus einem Pflanzenmaterial, Verfahren das die nachfolgenden Schritte enthält:
ein Extrahieren eines Pflanzenmaterials, das Isoflavonkonjugate und Protein enthält, mit einem wässrigen Extraktionsmittel, das einen pH besitzt, der über etwa dem isoelektrischen Punkt des Proteins in dem Pflanzenmaterial liegt;
in einem ersten Umwandlungsschritt, ein Behandeln dieses wässrigen Extraktes während einer ausreichenden Zeit bei einer Temperatur von 2°C bis 121°C und einem pH von 9 bis 11, um von 80% bis 100% der Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln; und
in einem zweiten Umwandlungsschritt, ein Hinzufügen einer effektiven Menge von zusätzlichem Enzym, das in der Lage ist, die Glukosidbindungen zu spalten, mit den Isoflavonglukosiden in dem wässrigen Extrakt während einer ausreichenden Zeit bei einer Temperatur von 5°C bis 75°C und einem pH von 3 bis 9, um diese Isoflavonglukoside in Aglukon-Isoflavone umzuwandeln.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, in welchem die Extraktion bei einem pH von 6 bis 10 durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, in welchem das wässrige Extrakt bei einem pH von etwa 9 und einer Temperatur von 45°C bis 75°C behandelt wird, um die besagten Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, in welchem das wässrige Extrakt bei einem pH von etwa 11 und einer Temperatur von 5°C bis 50°C behandelt wird, um die besagten Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln.

5. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, in welchem das zusätzliche Enzym ein alpha-Galaktosidase-Enzym, ein Beta-Galaktosidase-Enzym, ein Glukoamylase-Enzym, ein Pektinase-Enzym

oder eine Kombination derselben ist.

6. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, in welchem das zusätzliche Enzym derart zugegeben wird, dass die Gesamtkonzentration des in diesem wässrigen Extrakt vorhandenen Enzyms zwischen 0,1 Gew.% und 10 Gew.% des Pflanzenmaterials, bezogen auf die Trockenmasse, liegt.

7. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, in welchem das Pflanzenmaterial ein Sojabohnenmaterial enthält.

8. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, in welchem der Großteil der Isoflavonkonjugate und der Isoflavonglukoside in Aglukon-Isoflavone umgewandelt wird.

9. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, in welchem im Wesentlichen alle Isoflavonkonjugate und Isoflavonglukoside in Aglukon-Isoflavone umgewandelt werden.

10. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, welches ferner ein Einstellen des pH Wertes des mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Extraktes auf etwa den isoelektrischen Punkt des Proteins beinhaltet, um ein Proteinmaterial auszufällen, das Protein und Aglukon-Isoflavone enthält.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, in welchem das Waschen des Proteinmaterials vermiedet wird.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, in welchem das Proteinmaterial mit Wasser in einer Gewichtsmenge, die geringer ist als etwa das Sechsfache des Gewichtes des ausgefällten Proteinmaterials, gewaschen wird.

13. Verfahren zur Herstellung eines mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterials aus einem Pflanzenmaterial, Verfahren das die nachfolgenden Schritte enthält:
ein Extrahieren eines Pflanzenmaterials, das Isoflavonkonjugate und Protein enthält, mit einem wässrigen Extraktionsmittel, das einen pH besitzt, der über etwa dem isoelektrischen Punkt des besagten Proteins in dem Pflanzenmaterial liegt;
in einem ersten Umwandlungsschritt, ein Behandeln dieses wässrigen Extraktes während einer ausreichenden Zeit bei einer Temperatur von 2°C bis 121°C und einem pH von 9 bis 11, um von 80% bis 100% der Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln;
ein Abtrennen eines Proteinmaterials, das die Isoflavonglukoside aus dem wässrigen Extrakt enthält, und
in einem zweiten Umwandlungsschritt, ein Zusammenbringen der Isoflavonglukoside in dem Proteinmaterial mit einem Enzym, das in der Lage ist, die Glukosidbindungen zu spalten, während einer ausreichenden Zeit bei einer Temperatur von 5°C bis 75°C und einem pH von 3 bis 9, um diese Isoflavonglukoside in Aglukon-Isoflavone umzuwandeln, worin ein Kontaktieren mit dem Enzym das Hinzufügen einer effektiven Menge von zusätzlichem Enzym zum Protein umfasst.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, in welchem die Extraktion bei einem pH von 6 bis 10 durchgeführt wird.

15. Verfahren gemäß Anspruch 13 oder Anspruch 14, in welchem das wässrige Extrakt bei einer Temperatur von 5°C bis 75°C behandelt wird, um die besagten Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln.

16. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 13 bis 15, in welchem das Abtrennen des Proteinmaterials, welches die Isoflavonglukoside aus dem wässrigen Extrakt enthält, ferner ein Einstellen des pH Wertes des wässrigen Extraktes auf etwa den isoelektrischen Punkt des Proteinmaterials umfasst, um das Proteinmaterial aus dem Extrakt auszufällen.

17. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 13 bis 16, in welchem das zusätzliche Enzym ein alpha-Galaktosidase-Enzym, ein Beta-Galaktosidase-Enzym, ein Glukoamylase-Enzym, ein Pektinase-Enzym oder eine Kombination derselben ist.

18. Verfahren gemäß Anspruch 16, in welchem das zusätzliche Enzym zu den Proteinmaterial in einer Konzentration zwischen 0,1 Gew.% bis 10 Gew.% des Proteinmaterials, bezogen auf die Trockenmasse, zugegeben wird.

19. Verfahren gemäß Anspruch 13, in welchem das Pflanzenmaterial ein Sojabohnenmaterial ist.

20. Verfahren gemäß Anspruch 13, in welchem der Großteil der Isoflavonkonjugate in Aglukon-Isoflavone umgewandelt wird.

21. Verfahren gemäß Anspruch 13, in welchem im Wesentlichen alle Isoflavonkonjugate in Aglukon-Isoflavone umgewandelt werden.

22. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, in welchem das extrahierte Pflanzenmaterial in der Form eines wässrigen Schlammes vorliegt, der Protein und Isoflavonkonjugate enthält.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, in welchem der wässrige Schlamm bis zu 20 Gew.% des Pflanzenmaterials enthält.

24. Verfahren zur Herstellung eines mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterials am einem Pflanzenmaterial, Verfahren das die nachfolgenden Schritte enthält:
ein Extrahieren eines Pflanzenmaterials, das Isoflavonkonjugate und Protein enthält, mit einem wässrigen Extraktionsmittel, das einen pH besitzt, der über etwa dem isoelektrischen Punkt des besagten Proteins in dem Pflanzenmaterial liegt;
ein Abtrennen eines Proteinmaterials, das diese Isoflavonkonjugate aus dem Extrakt enthält;
ein Bilden eines wässrigen Schlammes des Proteinmaterials;
in einem ersten Umwandlungsschritt, ein Behandeln dieses wässrigen Schlammes während einer ausreichenden Zeit bei einer Temperatur von 2°C bis 121°C und einem pH von 9 bis 11, um von 80% bis 100% der Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln;
in einem zweiten Umwandlungsschritt, ein Zusammenbringen der Isoflavonglukoside in diesem wässrigen Schlamm mit einem Enzym, das in der Lage ist, die Glukosidbindungen zu spalten, während einer ausreichenden Zeit bei einer Temperatur von 5°C bis 75°C und einem pH von 3 bis 9, um diese Isoflavonglukoside in Aglukon-Isoflavone umzuwandeln, worin ein Kontaktieren der Glukoside mit dem Enzym das Hinzufügen einer effektiven Menge von zusätzlichem Enzym zum Schlamm umfasst.

25. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem die Extraktion bei einem pH von 6 bis 10 durchgeführt wird.

26. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem das Proteinmaterial von dem Extrakt abgetrennt wird, durch Einstellen des pH Wertes des Extraktes auf etwa den isoelektrischen Punkt des Proteins, um das Proteinmaterial aus dem Extrakt auszufällen.

27. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem der wässrige Schlamm bis zu etwa 30 Gew.% des Proteinmaterials enthält.

28. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem der wässrige Schlamm bei einer Temperatur von 5°C bis 75°C behandelt wird, um die besagten Isoflavonkonjugate in Isoflavonglukoside umzuwandeln.

29. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche 24 bis 28, in welchem das zusätzliche Enzym ein alpha-Galaktosidase-Enzym, ein Beta-Galaktosidase-Enzym, ein Glukoamylase-Enzym, ein Pektinase-Enzym oder eine Kombination derselben ist.

30. Verfahren gemäß Anspruch 29, in welchem das zusätzliche Enzym zu dem wässrigen Schlamm in einer Konzentration von 0,1 Gew.% bis 10 Gew.% des Pflanzenmaterials, bezogen auf die Trockenmasse, zugegeben wird.

31. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem das Pflanzenmaterial ein Sojabohnenmaterial ist.

32. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem ein Großteil der Isoflavonkonjugate in Aglukon-Isoflavone umgewandelt wird.

33. Verfahren gemäß Anspruch 24, in welchem im Wesentlichen alle Isoflavonkonjugate in Aglukon-Isoflavonen umgewandelt werden.

34. Verfahren gemäß irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, welches ferner die nachfolgenden Schritte enthält:
ein Extrahieren des mit Aglukon-Isoflavon angereicherten pflanzlichen Proteinmaterials mit einem Extraktionsmittel, um ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Extrakt zu erzeugen; und

ein Zusammenbringen dieses Extraktes mit einem Adsorbermaterial während einer ausreichenden Zeit, um ein Material mit einem hohen Genisteingehalt aus diesem Extrakt abzutrennen.

35. Verfahren gemäß Anspruch 34, in welchem dieses Extraktionsmittel ein wässriger Alkohol ist, der 30% bis 90% Alkohol enthält.

36. Verfahren gemäß Anspruch 34, in welchem das Extraktionsmittel einen pH Wert besitzt der etwa bei dem isoelektrischen Punkt des Proteins in dem besagten pflanzlichen mit Aglukon-Isoflavon angereicherten Proteinmaterial liegt.

37. Verfahren gemäß Anspruch 34, in welchem das mit Aglukon-Isoflavon angereicherte pflanzliche Proteinmaterial mit dem Extraktionsmittel extrahiert wird, wobei das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Material nicht über etwa 11:1 liegt.

38. Verfahren gemäß Anspruch 34, in welchem dieses Extrakt mit einem Eluierungsmittel durch das Adsorbermaterial eluiert wird, um dieses Extrakt mit dem Adsorbermaterial in Kontakt zu bringen, um ein Material mit einem hohen Genisteingehalt am dem Extrakt dadurch abzutrennen, dass das Genistein in diesem Extrakt auf eine unterschiedlich loslösbare Art und Weise an das Adsorbermaterial gebunden wird.

39. Verfahren gemäß Anspruch 34, in welchem das Material mit dem hohen Genisteingehalt mindestens 40% Genistein enthält.

40. Verfahren gemäß Anspruch 39, in welchem das Material mit dem hohen Genisteingehalt mindestens 90% Genistein enthält.

41. Verfahren gemäß Anspruch 34, das außerdem das Entfernen von restlichem pflanzlichem Proteinmaterial aus dem Extrakt enthält.

42. Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 33, welches ferner die nachfolgenden Schritte enthält:
ein Extrahieren des mit Aglukon-Isoflavon angereicherten pflanzlichen Proteinmaterials mit einem Extraktionsmittel, um ein mit Aglukon-Isoflavon angereichertes Extrakt zu erzeugen; und
ein Zusammenbringen dieses Extraktes mit einem Adsorbermaterials während einer ausreichenden Zeit, um ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt aus diesem Extrakt abzutrennen.

43. Verfahren gemäß Anspruch 42, in welchem dieses Extraktionsmittel ein wässriger Alkohol ist, der 30% bis 90% Alkohol enthält.

44. Verfahren gemäß Anspruch 42, in welchem das Extraktionsmittel einen pH-Wert besitzt der etwa bei dem isoelektrischen Punkt des Proteins in dem besagten mit Aglukon-angereichertem Isoflavon pflanzlichen Proteinmaterial liegt.

45. Verfahren gemäß Anspruch 42, in welchem das mit Aglukon-Isoflavon angereicherte pflanzliche Proteinmaterial mit dem Extraktionsmittel extrahiert wird, wobei das Gewichtsverhältnis des Extraktionsmittels zu dem Material nicht über etwa 11:1 liegt.

46. Verfahren gemäß Anspruch 42, in welchem dieses Extrakt mit einem Eluierungsmittel durch das Adsorbermaterial eluiert wird, um dieses Extrakt mit dem Adsorbermaterial in Kontakt zu bringen, um ein Material mit einem hohen Daidzeingehalt aus dem Extrakt dadurch abzutrennen, dass das Daidzein auf eine unterschiedlich loslösbare Art und Weise an das Adsorbermaterial gebunden wird.

47. Verfahren gemäß Anspruch 42, in welchem das Material mit dem hohen Daidzeingehalt mindestens 40% Daidzein enthält.

48. Verfahren gemäß Anspruch 42, das außerdem das Entfernen von restlichem pflanzlichem Proteinmaterial aus dem Extrakt enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen