(19) **RU** (11) **2 142 957** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 07 K 1/30, 1/36, 14/415, C 07 D 311/36, C 12 P 17/06**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96109382/04, 21.09.1994

(24) Дата начала действия патента: 21.09.1994

(30) Приоритет: 12.10.1993 US 08/135.196

(46) Дата публикации: 20.12.1999

(56) Ссылки: SU 1151541 A, 1985. US 3870805 A, 1975. US 4064277 A, 1977. US 4259358 A, 1981. JP 1-258669 A, 1989. MATSUURA et al. - β- Glucosidases from soybeans Hydrolyzl Daidzin and Genistin. 1993, 58, N 1, c.144-147. Journal Food Sci.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 12.05.96

(86) Заявка PCT:
US 94/10697 (21.09.94)

(87) Публикация PCT:
WO 95/10530 (20.04.95)

(98) Адрес для переписки:
105023, Москва, Большая Семеновская, д.49, офис 404, Фирма патентных поверенных "ИННОТЭК", патентному поверенному Вахниной Т.А.

(71) Заявитель:
Протеин Текнолоджиз Интернэшнл, Инк. (US)

(72) Изобретатель: Шен Джером Л. (US), Брайан Барбара Л. (US)

(73) Патентообладатель:
Протеин Текнолоджиз Интернэшнл, Инк. (US)

RU 2142957 C1

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТА, ОБОГАЩЕННОГО ИЗОФЛАВОНОМ АГЛЮКОНА

(57) Реферат:

Способ получения экстракта, обогащенного изофлавоном аглюкона, путем экстракции материала растительного белка, содержащего изофлавоны глюкона, водным экстрагирующим веществом, имеющим значение pH выше изоэлектрической точки указанного белка, при котором белок и изофлавоны глюкона в принципе растворимы, и приведения в полученном экстракте в контакт изофлавонов глюкона с эффективным количеством не менее одного фермента бета-глюкосидазы и фермента эстеразы, отличающийся тем, что до контакта изофлавонов глюкона с указанным ферментом или ферментами удаляют из экстракта нерастворимые материалы, а контактирование изофлавонов глюкона с ферментом или с ферментами проводят при температуре, значении pH и в течение времени, достаточных для преобразования в принципе всех изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона. Технический результат - создание обогащенного изофлавоном аглюкона экстракта и выделенного вещества белка с использованием упрощенного способа. 3 с. и 25 з.п. ф-лы, 2 табл.

RU 2142957 C1

(19) **RU** (11) **2 142 957** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 07 K 1/30, 1/36, 14/415, C 07 D 311/36, C 12 P 17/06**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 96109382/04, 21.09.1994

(24) Effective date for property rights: 21.09.1994

(30) Priority: 12.10.1993 US 08/135.196

(46) Date of publication: 20.12.1999

(85) Commencement of national phase: 12.05.96

(86) PCT application:
US 94/10697 (21.09.94)

(87) PCT publication:
WO 95/10530 (20.04.95)

(98) Mail address:
105023, Moskva, Bol'shaja Semenovskaja, d.49, ofis 404, Firma patentnykh poverennykh "INNOTEhK", patentnomu poverennomu Vakhninoj T.A.

(71) Applicant:
Protein Teknolodzhiz Internehshnl, Ink. (US)

(72) Inventor: Shen Dzherom L. (US),
Brajan Barbara L. (US)

(73) Proprietor:
Protein Teknolodzhiz Internehshnl, Ink. (US)

(54) METHOD OF PREPARING EXTRACT ENRICHED WITH AGLUCONE ISOFLAVONES

(57) Abstract:

FIELD: biochemical methods. SUBSTANCE: method consisting in extraction of vegetable protein material containing glucone isoflavones with extracting substance having pH higher than isoelectric point of mentioned protein and ensuring solubility of protein and glucone isoflavones and bringing those isoflavones contained in extract solution into contact with effective amount at least one enzyme beta-glucosidase and enzyme esterase is distinguished by that, before glucone isoflavones are brought into contact with enzyme(s), insoluble materials are removed from extract solution and contact of glucone isoflavones with enzyme(s) is carried out at temperature, pH, and as long as to provide conversion of all glucone isoflavones into aglucone isoflavones. EFFECT: enabled enrichment of extract with aglucone isoflavones involving simplified procedure. 28 cl, 2 tbl

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

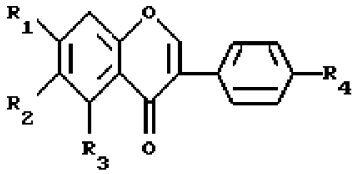
Настоящее изобретение относится к получению экстракта и выделенного вещества, обогащенных аглюкон-изофлавонами, путем экстрагирования растворимого материала из материала растительного белка и обработки одним или несколькими ферментами бета-глюкосидазы в таких условиях, что большинство глюкон-изофлавонов преобразуются в аглюкон-изофлавоны, которые удерживаются в выделенном веществе белка. Это частичное продолжение заявки па патент США N 08/135.196, поданной 12 октября 1993 г.

Изофлавоны встречаются в разнообразных бобовых растениях, включая такие материалы растительного белка, как соевые бобы. Эти соединения включают в себя даидзин, 6"-OAc даидзин, 6"-OMal даидзин, даидзеин, генистин, 6"-OAc генистин, 6"-OMal генистин, генистеин, глицитин, 6"-OAc-глицитин, 6"-OMal глицитин, глицитеин. Биоханин А, формононетин и коуместрол. Обычно эти соединения ассоциируются с горьким привкусом, присущим соевым бобам, и в производстве коммерческих продуктов, таких как выделенные вещества и концентраты, внимание фокусировалось на удалении этих материалов. Например, в обычном процессе получения выделенного вещества белков сои, в котором хлопья сои экстрагируются водной щелочной средой, большинство изофлавонов переводится в экстракте в растворимую форму и остается переведенным в растворимую форму в сыворотке, которая обычно выбрасывается после кислотного осаждения белка для образования выделенного вещества.

Остаточные изофлавоны, покинувшие выделенное вещество белка, осажденное в кислоте, обычно удаляются исчерпывающей промывкой выделенного вещества.

Недавно было признано, что изофлавоны, содержащиеся в растительных белках, такие как соевые бобы, могут замедлить рост раковых клеток человека, таких как раковые клетки в груди и раковые клетки предстательной железы, как описано в следующих статьях: "Замедление генистеином роста раковых клеток в груди человека, независимость от рецепторов эстрогена и ген многолекарственного сопротивления" Питерсона и Барнса, Biochemical and Biophysical Research, Communications, Vol. 179, N 1, стр. 661 - 667, 30 авг. 1991; "Генистеин и Биоханин А замедляют рост раковых клеток предстательной железы человека, но не эпидермический фактор роста рецептора автофосфорилации тирозина "Питерсона и Барнса, The Prostate, Vol. 22, стр. 335 - 345 (1993): и "Соевые бобы замедляют опухоли грудной железы в моделях рака груди" Барнса и др., "Мутагены и карциногены в питании", стр. 239 - 253 (1990).

Из указанных изофлавонов несколько существуют как глюцосиды или как глюконы с прикрепленной молекулой глюкозы. Некоторые из глюконов, такие как 6"-OAc генистин, содержат группу ацетата, прикрепленную к 6 позиции самой молекулы глюкозы. Хотя все изофлавоны, включая глюкосиды, представляют интерес для медицинской оценки, конкретные наиболее интересные изофлавоны - это аглюконы, когда молекулы глюкозы не прикреплена. Эти изофлавоны не так растворимы в воде, как глюконы или глюкосиды изофлавона. Конкретные изофлавоны в этой категории - это даидзеин, генистеин и глицитеин. Эти аглюконы имеют следующую общую формулу



где R_1, R_2, R_3 и R_4 могут выбираться из группы, состоящей из H, OH и OCH_3. Поэтому настоящее изобретение направлено на аглюконы и обогащение выделенного вещества растительного белка этими материалами.

В технике известны способы преобразования изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона, такие как описанные в заявке на патент Японии N 258.669 на имя Обаты и др. Такие процессы позволяют достигать только умеренной степени преобразования и поэтому нежелательны, особенно для широкомасштабных коммерческих операций. Кроме того, известные процессы, такие как описаны в заявке 669, описывают удаление изофлавонов из материала белка и не описывают, как приготовить обогащенный изофлавоном аглюкона экстракт или выделенный материал белка. Таким образом, существует потребность в процессе преобразования, как минимум, большинства и предпочтительно в принципе всех изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона и для получения обогащенных изофлавоном аглюкона экстракта и выделенного вещества белка.

Поэтому целью настоящего изобретения является создание обогащенного изофлавоном аглюкона экстракта и выделенного вещества белка и процесс получения их. Эта и другие цели конкретно достигаются в подробном описании настоящего изобретения, изложенном ниже.

Настоящее изобретение обеспечивает обогащенный изофлавоном аглюкона экстракт и выделенное вещество растительного белка и процессы для их получения.

Способы получения таких экстрактов включают в себя экстрагирование материала растительного белка, содержащего изофлавоны глюкона, с водным экстрагирующим веществом, имеющим pH выше приблизительно изоэлектрической точки материала растительного белка, и путем реагирования изофлавонов глюкона с достаточным количеством одного или большего числа ферментов бета-глюкосидазы в течение периода времени, с температурой и pH, достаточными, чтобы преобразователь, как минимум, большинство изофлавонов глюкона в экстракте в изофлавоны аглюкона с получением обогащенного изофлавоном аглюкона экстракта. Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения таких экстрактов, где дополнительная бета-глюкосидаза добавляется к экстракту для получения обогащенного изофлавоном аглюкона экстракта. Это изобретение, кроме того, обеспечивает способы получения

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

обогащенного аглюконом выделенного вещества белка путем регулирования pH ранее описанного экстракта до приблизительно изоэлектрической точки материала белка для осаждения материала белка и получения выделенного вещества белка, обогащенного изофлавонами аглюкона. Затем получившееся обогащенное изофлавоном аглюкона выделенное вещество можно отделить и обезводить с образованием сухого обогащенного выделенного вещества. Кроме того, это изобретение обеспечивает способы извлечения, в относительно высоких пропорциях, изофлавонов из материалов растительного белка.

Хотя это изобретение будет описано в отношении продуктов из соевых бобов и хотя процесс особенно пригоден для получения обогащенных изофлавоном аглюкона экстрактов и выделенных веществ из материала соевых бобов, тем не менее этот процесс в общем применим для получения экстрактов и выделенных веществ белка из разных источников растительного белка, содержащих изофлавоны.

Пример такого источника - это материал растительного белка, содержащий сою или материалы соевых бобов. Термин "материал соевых бобов", как он здесь используется, означает соевые бобы или производную соевых бобов.

Исходный материал в соответствии с экстрактом или выделенным веществом предпочтительных примеров осуществления - это хлопья соевых бобов, из которых масло было удалено экстракцией в растворителе. Хлопья экстрагируются водным экстрагирующим веществом, имеющим pH выше приблизительно изоэлектрической точки материала белка, предпочтительно pH приблизительно 6,0 - 10,0 и наиболее предпочтительно pH приблизительно 6,7 - 9,7. При желании можно применять обычные щелочные реагенты для повышения pH водного экстрагирующего вещества, такие как гидроокись натрия, гидроокись калия и гидроокись кальция. Желаемые соединения изофлавона обычно делаются растворимыми в водном экстракте. Также желательно для повышения извлечения этих соединений в водном экстракте, чтобы весовое отношение хлопьев соевых бобов к экстракту контролировалось до конкретных уровней, чтобы сделать растворимыми как можно больше изофлавонов, присущих материалу белка.

Экстракцию белков и изофлавонов можно приводить многими способами, включая экстракцию противотоком хлопьев при весовом отношении водного экстрагирующего вещества к хлопьям приблизительно от 8:1 до 16:1, в котором начальный экстракт используется для экстрагирования хлопьев и для получения водного экстракта белка и изофлавонов. В качестве альтернативы можно использовать двухэтапный процесс экстракции, в котором весовое отношение экстрагирующего вещества к хлопьям на начальном этапе составляет около 10:1, и затем имеет место вторая экстракция хлопьев со свежим экстрагирующим веществом при весовом отношении экстрагирующего вещества к хлопьям около 6:1 или менее, так что комбинированное весовое отношение экстрагирующего вещества к хлопьям на обоих этапах не превышает общего весового отношения экстрагирующего вещества к хлопьям около 16:1.

После удаления нерастворимых материалов затем получившийся водный экстракт белков, содержащий ставшие способными растворяться изофлавоны, реагируют с одним или большим числом ферментов бета-глюкосидазы, чтобы преобразовать большинство, и предпочтительно в принципе все, изофлавоны в форме глюкона с прикрепленной молекулой глюкозы в изофлавон аглюкона. Оптимальный диапазон pH для ферментов бета-глюкосидазы будет меняться в зависимости от конкретного типа используемого фермента бета-глюкосидазы, но обычно он колеблется в диапазоне приблизительно 4 - 8. Значение pH экстракта обычно устанавливается в диапазоне pH, в котором конкретный фермент наиболее активен до реакции с ферментом. Значение pH обычно регулируется добавлением столовой кислоты, такой как уксусная, серная, фосфорная, соляная или другого подходящего реагента.

Фермент бета-глюкосидазы может естественно присутствовать в материале соевых бобов или присутствовать из-за роста микробов, что называется здесь "остаточным" ферментом, или же он может добавляться к экстракту белков. Добавленный фермент называется здесь "дополнительным ферментом". В общем случае, если концентрация остаточного фермента в материале соевых бобов или в экстракте недостаточна для преобразования большинства (предпочтительно в принципе всех) изофлавонов в форме глюкона в форму аглюкона, то нужно добавить дополнительный фермент. Количество фермента, достаточное для осуществления преобразования изофлавонов, меняется от многих факторов, включая виды присутствующих ферментов, распределение концентраций ферментов, значение pH системы и активность присутствующих ферментов.

Если достаточные концентрации ферментов имеются, либо посредством остаточных ферментов, либо посредством дополнительных ферментов, либо посредством обоих, экстракт белков со способными растворяться изофлавонами реагирует с ферментами бета-глюкосидазы в течение периода времени, при температуре и значении pH, достаточных чтобы преобразователь, как минимум, большинство изофлавонов глюкона, и предпочтительно в принципе их всех, содержащихся в экстракте, в форму аглюкона.

К числу предпочтительных дополнительных ферментов бета-глюкосидазы относятся биопектиназа 100L и 300L, биопектиназа OK 70L, лактаза F и лактозим. Лактаза F поставляется фирмой Amano International Enzyme Co., Inc., а/я 1000, Трой, Вирджиния 22974, она имеет оптимальный диапазон pH приблизительно 4 - 6, а лактозим поставляется фирмой Novo Industries, Enzyme Division, Ново Алле, DK-2880, Багсвэрд, Дания, и имеет оптимальный диапазон pH около 7. Биопектиназа 100L, биопектиназа 300L и биопектиназа OK 70L поставляются фирмой Quest International, Сарасота, Флорида.

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

Дополнительные ферменты добавляются в количествах, достаточных для преобразования, как минимум, большинства изофлавонов глюкона, и предпочтительно в принципе их всех, в аглюконы. В тех случаях, когда необходимо добавить дополнительные ферменты, количество добавляемого фермента составляет приблизительно 0,5% - 5% по весу от осадка белков на сухой основе.

Другой класс пригодных ферментов - это класс ферментов эстеразы. Считается, что эти ферменты хорошо подходят для процессов предпочтительных примеров осуществления, описанных здесь, так как они преобразуют сопряжения ацетата и малоната в изофлавоны глюкона путем удаления групп ацетата и малоната из сопряжений изофлавона. В большинстве предпочтительных примеров используются оба типа ферментов, ферменты глюкосидазы и эстеразы.

Процессы в предпочтительных примерах осуществления это предпочтительно одноэтапные процессы, и они достигают очень высоких степеней преобразования изофлавонов (из формы глюкона в форму аглюкона) за относительно короткое время и с относительной легкостью и экономичностью. Используемый здесь термин "одноэтапный" процесс реакции означает процесс реакции, в котором определенные значения параметров процесса обычно поддерживаются в ходе процесса реакции. К числу этих параметров процесса относятся pH и температура. Очень высокие степени преобразования - это такие, что, как минимум, большинство изофлавонов в форме глюкона, и предпочтительно в принципе все они, присутствующие в экстракте материала соевых бобов, преобразуются в форму аглюкона. Термин "большинство" обозначает степень преобразования изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона как минимум около 50%. Термин "в принципе все" обозначает степень преобразования изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона, как минимум, 80% и наиболее предпочтительно, как минимум, около 90%. Хотя мы не хотим связывать себя с какой-либо конкретной теорией, считается, что удивительно и неожиданно высокие степени преобразования в описанных здесь процессах возникают из комбинации параметров процесса, используемых в течение процесса одноэтапной реакции. Предпочтительно, чтобы pH системы реакции поддерживался, или приблизительно поддерживался, на значении приблизительно 4 - 8 и наиболее предпочтительно на значении, при котором фермент(ы) наиболее активны до реакции с сопряжением (сопряжениями) изофлавона во время процесса одноэтапной реакции. Предпочтительно, чтобы температура реакционной системы поддерживалась, хотя бы приблизительно, приблизительно от 40°C до 60°C и наиболее предпочтительно около 60°C во время процесса одноэтапной реакции.

В общем случае периоды времени, необходимые для достижения преобразования в принципе всех изофлавонов глюкона в аглюконы описанными здесь одноэтапными процессами, составляют приблизительно 2 - 24 часа.

После реакции с одним или большим числом ферментов бета-глюкосидазы значение pH устанавливается на изоэлектрическую точку для соевого белка, в общем случае приблизительно 4,0 - 5,0 и предпочтительно приблизительно 4,4 - 4,6 путем добавления кислоты. Установление pH на изоэлектрическую точку осаждает белок в виде свернувшегося молока, которое обогащено менее растворимыми аглюконами. После осаждения свернувшаяся молокообразная масса или осажденный белок отделяется от сыворотки, например центрифугированием, с образованием выделенного вещества белка, обогащенного изофлавонами аглюкона.

В предпочтительном примере осуществления промывание осажденного материала белка либо исключается полностью, либо сводится до минимума, чтобы значительно уменьшить удаление изофлавонов аглюкона из осадка белка, чтобы обеспечить получение обогащенного изофлавоном аглюкона выделенного вещества, даже если аглюконы менее растворимы в воде, чем другие изофлавоны. Поэтому промывание кислотного осажденного белка водой можно полностью исключить или ограничить одним промыванием водой, во время которого весовое отношение воды к осажденному материалу белка составляет приблизительно от 2:1 до 6:1. Это недостаточное промывание кислотной осажденной творогообразной массы дает выделенное вещество, обогащенное желательными уровнями изофлавонов, даже если более экстенсивное промывание можно было выполнить с меньшим извлечением изофлавонов. Умеренное количество промывания дает выделенное вещество белка, имеющее содержание сухой основы приблизительно 1,5 - 3,5 мг/г генистеина и содержание даидзеина приблизительно 1,0 - 3,0 мг/г.

Затем кислотный осажденный белок обезвоживается сочетанием центрифугирования или концентрирования и сушится обычным образом. Предпочтительный пример осуществления не предназначен ограничиваться конкретным способом обезвоживания, хотя предпочтительно применять традиционные методы сушки, такие как сушка распылением, для образования высушенного выделенного вещества. Описанные здесь процессы дают выделенные вещества, имеющие повышенные количества изофлавонов аглюкона.

Настоящее изобретение также предусматривает способы извлечения изофлавонов в очень высоких пропорциях из материала растительного белка, такого как материал соевых бобов. Уровни извлечения, получаемые описанными здесь процессами, обычно составляют, как минимум, 50%, предпочтительно 65% и наиболее предпочтительно 80% на основании суммы всех видов конкретного изофлавона в исходном материале растительного белка. Хотя мы не желаем быть связанными какой-либо конкретной теорией, считается, что высокие уровни извлечения являются результатом описанных здесь реакций преобразования в сочетании с также описанными разными операциями обработки.

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

Путем преобразования сопряжений изофлавона аглюкона, которые относительно растворимы, в менее растворимые виды аглюкона на конкретном этапе обработки можно извлечь в получающийся продукт высокую процентную составляющую изофлавонов из подаваемого материала.

Следующие примеры описывают конкретные, но не являющиеся ограничительными примеры осуществления этого изобретения.

Образцы готовились добавлением 5 г экстрагированных, обезжиренных хлопьев сои (муки) к 5 г воды и pH устанавливался на 7 и на 8.

0,25 г лактазы F или лактозима добавлялись к каждой из суспензий, так что концентрация фермента составляла около 5% по весу от твердых веществ в каждом образце. Образцы выдерживались в термостате при 40°C и 60°C. Подобразец удалялся до добавления фермента (t=0) и спустя 24 часа выдержки при требуемой температуре. Изменение и процентное распределение изофлавонов в соевых хлопьях (муке) после 24 часов выдержки либо с лактазой F, либо с лактозимом показаны в таблице 1. Образцы не стерилизовались до добавления дополнительного фермента, и рост микробов и примесей не замедлялся.

Данные таблицы 1 показывают степень преобразования, достижимую комбинаций остаточного фермента (ферментов) и дополнительного фермента (ферментов).

Источником остаточного фермента может быть рост микробов или эндогенные ферменты сои. Значительное преобразование сопряженных изофлавона в аглюконы произошло в соевых хлопьях (муке), выдержанных при pH 8, 60°C в течение 24 часов. Концентрация каждого описанного здесь типа изофлавона основана на общей сумме всех форм этого типа изофлавона.

Другой набор образцов готовился образованием 16% водных суспензий обезжиренных соевых хлопьев. Значение pH образцов было установлено на 4,5 и 7, и они выдерживались при 45°C в течение 24 часов. Подобразцы отбирались при 0 и 24 часах. Все образцы анализировались на содержание изофлавона. В таблице 2 показано изменение процентного распределения рассчитанных изофлавонов в обезжиренных хлопьях после выдержки в течение 24 часов при pH 4,5 и 7 и при 45°C.

Данные таблицы 2 показывают степень преобразования, достижимую остаточным ферментом (ферментами) в материале белка. Значительное преобразование сопряженных изофлавона в аглюконы произошло при pH 7 и температуре 45°C после 24 часов выдержки.

В другой серии экспериментов исследовалось процентное извлечение генистеина и даидзеина в выделенном веществе белка, полученном из соевых бобов. Процент извлечения находился путем определения количества генистеина (или дадзеина) в выделенном веществе и путем выражения этого количества как процентного содержания на основании общего количества всех форм генистеина (или даидзеина) в исходном материале соевых бобов. 100 г обезжиренной соевой муки экстрагировалось 1000 г воды, которая устанавливалась на pH 9,7 добавлением гидроокиси натрия при температуре 32°C. Это давало весовое отношение воды к муке 10:1. Мука отделялась от экстракта и снова экстрагировалась 600 г водного экстракта, имеющего pH 9,7 и температуру 32°C. 2-ой этап экстракции дал весовое отношение воды к муке 6:1. Мука отделялась центрифугированием, 1-й и 2-й экстракты комбинировались и pH устанавливался на 4,5 с образованием суспензии соевой сыворотки и кислотно осажденной массы типа свернувшегося молока. Суспензия нагревалась до 50 °C и добавлялось 2% по сухому весу массы фермента лактазы F. Суспензии разрешали реагировать в течение 16 часов при 50°C для обеспечения полного преобразования изофлавонов глюкона в форму аглюкона. Кислотная осажденная творогообразная масса отделялась от сыворотки центрифугированием для образования обогащенного аглюконом выделенного вещества. Дальнейшее промывание осажденной творогообразной массы водой исключалось. Количество генистеина, извлеченного в выделенном веществе, было 86% от общего количества всех форм генистина и генистеина в исходном материале соевых бобов (обезжиренной соевой муке).

Аналогичным образом количество извлеченного даидзеина в выделенном веществе было 75%.

Ниже следует описание способа квантифицирования изофлавонов в соевых продуктах. Изофлавоны экстрагируются из соевых продуктов путем перемешивания 0,75 7 образца (высушенного распылением или мелко перемолотого порошка) с 50 мл растворителя 80/20 метанол/вода. Смесь встряхивается в течение 2 часов при комнатной температуре орбитальным встряхивателем. Спустя 2 часа остальные нерастворенные материалы удаляются фильтрацией через фильтровальную бумагу Whatman N 42. 5 мл фильтрата разводятся 4 мл воды и 1 мл метанола.

Экстрагированные изофлавоны отделяются посредством ВЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) с использованием колонны с обратной фазой Beckman C18. Изофлавоны впрыскиваются в колонну и элюируются градиентом растворителя, начиная с 88% метанола, 10% воды и 2% ледяной уксусной кислоты и кончая 98% метанола и 2% ледяной уксусной кислоты. При скорости течения 0,4 мл/мин все изофлавоны - генистин, 6-0-ацетигенистин, 6-0-малонилгенистин, генистеин, даидзин, 6-0-ацетидаидзин, 6-0-малонилдаидзин, даидзеин, глицитин и его производные и глицитеин - явно растворяются. Амплитудное детектирование проводится удельным поглощением в УФ при 262 мм. Идентификация пиков проводится масс-спектрометром.

Квантификация достигается использованием чистых эталонов (генистин, генистеин, даидзин и даидзеин), приобретенных у фирмы Indofine Chemical Company, Соммервилл, Нью-Джерси. Факторы чувствительности (отклика) (интегральная площадь/концентрация) рассчитываются для каждого из указанных соединений и используются для квантирования неизвестных

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

образцов. Для сопряженных форм, для которых нет чистых эталонов, считается, что факторы чувствительности - это факторы исходной молекулы, но скорректированные по разнице молекулярного веса. Фактор чувствительности для глицитина принимается как фактор для генистина, скорректированный по разнице молекулярных весов.

Этот способ дает количества для каждого отдельного изофлавона. Для удобства весь генистин, весь даидзеин и весь глицитеин можно рассчитать как представление суммарного веса этих соединений, если все сопряженные формы преобразованы в их соответствующие несопряженные формы. Эти суммарные количества можно также измерить непосредственно некоторым методом с использованием кислотного гидрилиза для преобразования сопряженных форм.

Конечно, нужно понимать, что вышеизложенное - это только предпочтительные примеры осуществления изобретения и что можно сделать различные изменения и модификации, не отступая от характера и более широких аспектов изобретения, как они изложены в прилагаемой формуле изобретения, которые нужно интерпретировать в соответствии с принципами Патентного закона, включая понятие об эквивалентах.

Формула изобретения:

1. Способ получения экстракта, обогащенного изофлавоном аглюкона, путем экстракции материала растительного белка, содержащего изофлавоны глюкона, водным экстрагирующим веществом, имеющим значение pH выше изоэлектрической точки указанного белка, при котором белок и изофлавоны глюкона в принципе растворимы, и приведения в полученном экстракте в контакт изофлавонов глюкона с эффективным количеством не менее одного фермента бета-глюкосидазы и фермента эстеразы, отличающийся тем, что до контакта изофлавонов глюкона с указанным ферментом или ферментами удаляют из экстракта нерастворимые материалы, а контактирование изофлавонов глюкона с ферментом или с ферментами проводят при температуре, значении pH и в течение времени, достаточных для преобразования в принципе всех изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что проводят экстракцию материала растительного белка, содержащего изофлавоны глюкона, и достаточного количества остаточного фермента, являющегося, по крайней мере, одним из ферментов бета-глюкосидазы и ферментов эстеразы, указанным водным экстрагирующим веществом, а контактирование изофлавонов глюкона с остаточным ферментом проводят в течение времени, при температуре и значении pH, достаточных для преобразования в принципе всех изофлавонов глюкона в экстракте в изофлавоны аглюкона.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что после экстракции материала растительного белка указанным водным экстрагирующим веществом, в полученный водный экстракт добавляют дополнительный фермент, являющийся, по крайней мере, одним из ферментов бета-глюкосидазы и ферментов эстеразы, в таком количестве, чтобы общая концентрация фермента в экстракте была достаточна для преобразования в принципе всех изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона, затем приводят в контакт изофлавоны глюкона с ферментом в течение времени, при температуре и значении pH, достаточных для преобразования в принципе всех изофлавонов глюкона в экстракте в изофлавоны аглюкона.

4. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что экстракцию проводят при значении pH, равном 6 - 10.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что экстракцию проводят при значении pH, равном 6,7 - 9,7.

6. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что экстракция материала растительного белка включает в себя двойную экстракцию.

7. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что весовое отношение экстрагирующего вещества к материалу растительного белка составляет 8 : 1 - 16 : 1.

8. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что указанный период времени составляет 2 - 24 ч.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что указанный период времени составляет около 24 ч.

10. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что указанная температура составляет 40 - 60°C.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что указанная температура равна 60°C.

12. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что значение pH равно 4 - 8.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что значение pH равно около 4,5.

14. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что указанный период времени составляет около 24 ч, указанная температура около 60°C и указанное значение pH около 4,5.

15. Способ по пп. 1, 2 или 3, отличающийся тем, что он дополнительно включает в себя установление значения pH экстракта, обогащенного изофлавоном аглюкона, на изоэлектрическую точку материала растительного белка для осаждения материала белка и отделение осажденного материала белка с получением обогащенного изофлавоном аглюкона выделенного вещества белка.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что его проводят без промывки выделенного вещества.

17. Способ по п.15, отличающийся тем, что выделенное вещество промывают водой в количестве по весу, в 6 раз меньшем веса осажденного материала белка.

18. Способ по п.15, отличающийся тем, что выделенное вещество промывают водой в количестве по весу, в 4 раза меньшем веса осажденного материала белка.

19. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что в качестве материала растительного белка используют материал соевых бобов.

20. Способ по п.1, отличающийся тем, что pH имеет значение, при котором фермент наиболее активен до реакции с изофлавонами глюкона.

21. Способ по п.2, отличающийся тем, что pH имеет значение, при котором остаточный фермент наиболее активен до реакции с изофлавонами глюкона.

22. Способ по п.3, отличающийся тем, что

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

pH имеет значение, при котором дополнительный фермент наиболее активен до реакции с изофлавоном глюкона.

23. Способ образования изолята (выделенного вещества) растительного белка, обогащенного изофлавоном аглюкона, путем экстракции растительного материала, содержащего изофлавоны глюкона, водным экстрагирующим веществом с образованием экстракта, содержащего белок и изофлавоны глюкона, причем это экстрагирующее вещество имеет значение pH выше изоэлектрической точки белка в этом материале растительного белка, при котором этот белок в принципе нерастворим, и приведения в контакт изофлавона глюкона в экстракте с эффективным количеством не менее одного фермента бета-глюкосидазы и фермента эстеразы при температуре, значении pH и в течение времени, достаточных для преобразования изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона, отличающийся тем, что до контактирования изофлавонов глюкона с ферментом или ферментами удаляют нерастворимые материалы из экстракта, а материал белка, обогащенный изофлавоном аглюкона, осаждают и отделяют от экстракта после преобразования изофлавонов глюкона в изофлавоны аглюкона путем установки значения pH этого экстракта на значение pH, при котором материал белка, обогащенный изофлавоном аглюкона, в принципе нерастворим с последующим извлечением нерастворимого материал белка с изофлавонами аглюкона из экстракта.

24. Способ извлечения не менее 50% изофлавона из материала растительного белка путем экстракции материала растительного белка, содержащего изофлавоны, водным экстрактом с получением водного экстракта, содержащего белок и изофлавоны, отличающийся тем, что материал растительного белка, содержащий изофлавоны, экстрагируют водным щелочным экстрактом, выбираемым из водных растворов гидроокиси натрия, гидроокиси калия и гидроокиси кальция, имеющим значение pH выше приблизительно изоэлектрической точки материала растительного белка, реакцию изофлавонов с достаточным количеством фермента ведут в течение времени, при температуре и значении pH, достаточных для преобразования, по крайней мере, большинства изофлавонов в экстракте в менее растворимые изофлавоны с получением обогащенного изофлавоном экстракта, устанавливают значения pH экстракта около изоэлектрической точки материала растительного белка для осаждения материала белка и отделяют осажденный материал белка для извлечения выделенного вещества, содержащего не менее 50% изофлавонов материала растительного белка.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что фермент выбирают из группы, состоящей из ферментов бета-глюкосидазы и ферментов эстеразы.

26. Способ по п.24, отличающийся тем, что не менее 65% изофлавонов материала растительного белка извлекают в выделенном веществе.

27. Способ по п.24, отличающийся тем, что не менее 80% изофлавонов материала растительного белка извлекают в выделенном веществе.

28. Способ по п.24, отличающийся тем, что в качестве материала растительного белка используют материал соевых бобов.

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

RU 2142957 C1

Таблица 1

Образец	6"-OMAL-6"-OAC				6"-OMAL-6"-OAC				6"-OMAL-		
	генистин %	генистин %	генистин %	генистеин %	даидзин %	даидзин %	даидзеин %	даидзин %	глицитин %	глицитин %	глицитеин %
t=0	16	80	0	4	16	79	1	3	22	62	16
pH 7,0, 40°C, t=24, нет добавки фермента	4	48	0	48	3	51	0	46	0	42	58
Лактаза F	2	39	0	59	2	41	0	57	0	30	70
Лактозим	3	45	0	51	2	49	1	48	0	40	60
pH 7,0, 60°C, t=24, нет добавки фермента	5	22	0	73	7	33	0	60	4	21	75
Лактаза F	10	32	0	59	10	35	3	52	6	23	71
Лактозим	4	22	0	74	5	33	0	62	0	23	77
pH 8,0, 40°C, t=24, нет добавки фермента	4	49	0	47	3	50	2	45	0	43	57
Лактаза F	3	39	0	58	3	40	3	55	0	29	71
Лактозим	3	46	0	49	4	48	0	47	0	40	60
pH 8,0, 60°C, t=24, нет добавки фермента	2	14	0	84	3	26	3	70	0	15	85
Лактаза F	6	24	0	80	8	30	3	59	5	22	74
Лактозим	2	14	0	84	3	24	6	67	0	16	84

Таблица 2

	6"-OMAL-6"-OAC				6"-OMAL-6"-OAC				6"-OMAL-		
	генистин %	генистин %	генистин %	генистеин %	даидзин %	даидзин %	даидзин %	даидзеин %	глицитин %	глицитин %	глицитеин %
t=0 хлопья	49	46	0	4	49	44	3	3	44	33	22
45°C, pH 7,0, t=24 хлопья	3	28	0	69	2	35	5	59	0	28	73
45°C, pH 4,5, t=24 хлопья	19	42	0	39	17	48	4	31	14	37	49