

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 1/30

C07K 14/415

C07D311/40 C07D311/36

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94194206.6

[45]授权公告日 2000年8月30日

[11]授权公告号 CN 1055932C

[22]申请日 1994.9.21 [24]颁证日 2000.6.24

[21]申请号 94194206.6

[30]优先权

[32]1993.10.12 [33]US [31]08/135,196

[86]国际申请 PCT/US94/10697 1994.9.21

[87]国际公布 WO95/10530 英 1995.4.20

[85]进入国家阶段日期 1996.5.20

[73]专利权人 蛋白质技术国际公司

地址 美国密苏里

[72]发明人 J·L·申 B·A·布赖恩

[56]参考文献

JP-1-258669 1989.10.16 C07D311/40

审查员 周莉

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 张 闽

权利要求书 5 页 说明书 13 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 葡糖苷配基异黄酮富集的植物蛋白提取物和分离物及生产方法

[57]摘要

葡糖苷配基异黄酮富集的植物蛋白提取物、分离物及生产和回收方法。用 pH 约高于蛋白材料等电点的水提剂提取包含葡糖异黄酮的植物蛋白材料而生产一种水提物,并在一定时间、温度和 pH 下使葡糖异黄酮与足量 β -葡萄糖苷酶 或酯酶反应,足以使提取物中至少多数葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮,由此生产葡糖苷配基异黄酮富集的提取物。通过调节提取物的 pH 至约为植物蛋白材料等电点以沉淀蛋白材料,再分离此蛋白材料生成一种葡糖苷配基富集的蛋白分离物。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种生产葡糖苷配基异黄酮富集的提取物的方法，它包括：

用一种水提剂提取一种含葡糖异黄酮的植物蛋白材料以形成一种含蛋白质和葡糖异黄酮的提取物，所述水提剂的 pH 高于所述植物蛋白材料的等电点，在该 pH 下所述植物蛋白材料中的蛋白质基本上溶于所述提取剂中；

从所述提取物中除去不溶性材料；和

在一定的温度、pH 下，在一定时间内，使已从中除去所述不溶性材料的所述提取物中的所述葡糖异黄酮与有效量的至少 β - 葡糖苷酶或酯酶中的一种接触，所述条件足以使基本上全部所述葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮。

2.根据权利要求 1 所述的方法，它包括：

(a)用一种 pH 大约高于一种植物蛋白材料等电点的水提剂提取该植物蛋白材料，该植物蛋白材料含有葡糖异黄酮和足够的剩余酶，该剩余酶至少为 β - 葡糖苷酶和酯酶中的一种，以生产一种含有蛋白质和葡糖异黄酮的水提物；和

b)在一定时间内、温度和 pH 值下，使所述葡糖异黄酮与所述剩余酶反应，所述条件足以将所述提取物中至少多数所述葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮，由此产生一种葡糖苷配基异黄酮富集的提取物。

3.根据权利要求 1 所述的方法，它包括：

(a)用一种 pH 高于一种植物蛋白材料等电点的水提剂提取含

有葡糖异黄酮的植物蛋白材料，以生产一种含有蛋白质和葡糖异黄酮的水提取物；

(b)向所述提取物中添加补充酶，该补充酶至少是 β -葡萄糖苷酶和酯酶中的一种，以使所述提取物中的总酶浓度足够使所述提取物中至少多数所述葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮；和

(c)在一定时间内、温度和 pH 下，使所述葡糖异黄酮与酶反应，所述条件足以使所述提取物中至少多数所述葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮，由此生产一种葡糖苷配基异黄酮富集的提取物。

4.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中提取是在 pH 约 6 至约 10 下进行的。

5.根据权利要求 4 所述的方法，其中提取是在 pH 从约 6.7 至约 9.7 下进行的。

6.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中所述植物蛋白材料的提取包括两次提取。

7.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中所述提取剂与所述植物蛋白材料的重量比为约 8：1 至约 16：1。

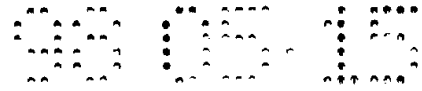
8.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中所述时间为从约 2 小时至约 24 小时。

9.根据权利要求 8 所述的方法，其中所述时间约为 24 小时。

10.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中所述温度是约 40 °C 至约 60 °C。

11.根据权利要求 10 所述的方法，其中所述温度约为 60 °C。

12.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中所述 pH 值是



从约 4 至约 8。

13.根据权利要求 12 所述的方法，其中所述 pH 约为 4.5。

14.根据权利要求 1，2 或 3 所述的方法，其中所述时间约为 24 小时，所述温度约为 60 °C 且所述 pH 约为 4.5。

15.一种生产葡糖苷配基异黄酮富集的植物蛋白分离物的方法，它包括：

用一种水提剂提取一种含葡糖异黄酮的植物蛋白材料以形成一种含蛋白质和葡糖异黄酮的提取物，所述水提剂的 pH 高于所述植物蛋白材料的等电点，在该 pH 下所述植物蛋白材料中的蛋白质基本上溶于所述提取剂中；

从所述提取物中除去不溶性材料；

在一定的温度、pH 下，在一定时间内，使已从中除去所述不溶性材料的所述提取物中的所述葡糖异黄酮与有效量的至少 β -葡糖苷酶或酯酶中的一种接触，所述条件足以使所述葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮；

把所述葡糖异黄酮转化成葡糖苷配基异黄酮之后，通过把含所述葡糖苷配基异黄酮的所述提取物的 pH 调节到大约所述蛋白质的等电点从所述提取物中沉淀出葡糖苷配基异黄酮富集的蛋白材料；和

从所述提取物中分离出所述的沉淀的葡糖苷配基异黄酮富集的蛋白材料。

16.根据权利要求 15 所述的方法，其中省去了对所述分离物的洗涤。

17.根据权利要求 15 所述的方法，其中所述分离物用重量小于

约 6 倍所述沉淀蛋白材料重量的水来洗涤。

18.根据权利要求 17 所述的方法,其中所述分离物用重量小于约 4 倍所述沉淀蛋白材料重量的水来洗涤。

19.根据权利要求 1, 2 或 3 所述的方法,其中所述植物蛋白材料包括一种大豆材料。

20.根据权利要求 1, 2 或 3 所述的方法,其中基本上全部葡萄糖异黄酮被转化为葡萄糖苷配基异黄酮。

21.根据权利要求 1, 2 或 3 的方法生产的葡萄糖苷配基异黄酮富集的提取物。

22.根据权利要求 15 的方法生产的葡萄糖苷配基异黄酮富集的蛋白分离物。

23.根据权利要求 22 的分离物,其中所述分离物是由大豆制成的。

24.一种植物蛋白分离物,具有约 1.5 至约 3.5 毫克/克的干基染料木黄酮含量和约 1.0 至约 3.0 毫克/克的干基黄豆苷原含量。

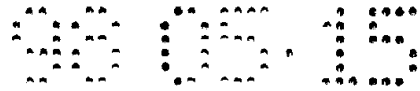
25.一种回收含植物蛋白材料中至少 50 % 异黄酮的分离物的方法,它包括:

(a)用一种 pH 大约高于所述植物蛋白材料等电点的水提剂提取一种含有异黄酮的植物蛋白材料,以生产一种含有蛋白质和异黄酮的水提物;

(b)在一定时间内、温度和 pH 下,使所述异黄酮与足够量的酶反应,所述条件足以使所述提取物中至少多数所述异黄酮转化为更不易溶的异黄酮,由此生产一种异黄酮富集的提取物;

(c)调节所述提取物的 pH 至约为所述植物蛋白材料的等电

点，以使所述蛋白材料沉淀；和



(d)分离出沉淀的蛋白材料以回收含所述植物蛋白材料中至少50%所述异黄酮的分离物。

26.根据权利要求25所述的方法，其中所述酶选自 β -葡萄糖苷酶和酯酶。

27.根据权利要求25所述的方法，其中所述植物蛋白材料中至少65%所述异黄酮回收于所述分离物中。

28.根据权利要求25所述的方法，其中所述植物蛋白材料中至少80%所述异黄酮回收于所述分离物中。

29.根据权利要求25所述的方法，其中所述植物蛋白材料包括一种大豆材料。

30.根据权利要求25的方法生产的蛋白分离物。

31.权利要求30的蛋白分离物，它是根据权利要求27中的方法获得的。

32.权利要求30的蛋白分离物，它是根据权利要求28中的方法获得的。

33.根据权利要求1所述的方法，其中所述pH值处于酶与所述葡萄糖异黄酮发生反应前所述酶具有最大活性时的值。

34.根据权利要求2所述的方法，其中所述pH值处于剩余酶与所述葡萄糖异黄酮反应前所述剩余酶具有最大活性时的值。

35.根据权利要求3所述的方法，其中所述pH值处于补充酶与所述葡萄糖异黄酮反应前所述补充酶具有最大活性时的值。

说明书

葡糖苷配基异黄酮富集的植物蛋白 提取物和分离物及生产方法

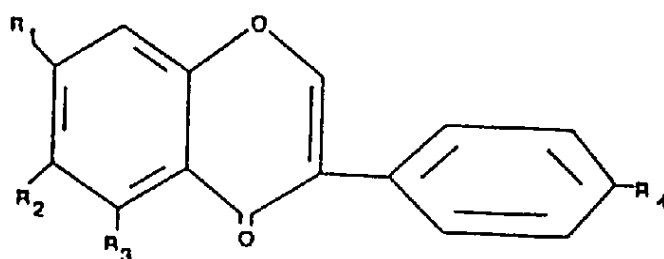
本发明涉及葡糖苷配基异黄酮富集的提取物和分离物的生产，方法是从一种植物蛋白材料中提取可溶物并在一定条件下用一种或多种 β -葡萄糖苷酶处理，以使大部分葡糖异黄酮转化成保留在蛋白分离物中的葡糖苷配基异黄酮。这是1993年10月12日递交的美国专利申请08/135,196的部分接续申请。

异黄酮存在于各种豆类植物中，包括植物蛋白材料如大豆中。这些化合物包括黄豆苷、6"-OAc-黄豆苷、6"-OMal-黄豆苷、黄豆苷原、染料木苷、6"-OAc染料木苷、6"-OMal-染料木苷、染料木黄酮、*glycitin*、6"-OAc-*glycitin*、6"-OMal-*glycitin*、*glycitein*、生原禅宁A，7-羟基-4'-甲氧异黄酮和拟雌内酯。这些化合物通常与大豆固有的苦味有关并且在商业产品，如分离物和浓缩物的生产中，除去这些物质已经成为焦点问题。例如，在传统方法中，大豆蛋白分离物的生产是用碱性介质水溶液提取大豆片，许多异黄酮被溶解在提取物中并且在乳清中保持溶解。其中异黄酮通常在蛋白质酸沉淀之后被除去以形成一种分离物。在酸沉淀的蛋白分离物中残余的异黄酮通常采用对分离物彻底洗涤而除去。

近来已发现，如大豆等植物蛋白中含有的异黄酮可以抑制人体癌细胞的生长，如下述文章所讲的乳腺癌细胞和前列腺癌细胞：
"Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer

Cells, Independence from Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance Gene”由 Peterson 和 Barnes 著, *Biochemical and Biophysical Research, Communications*, Vol. 179, No. 1, p. 661~667, 1991 年 8 月 30 日; “*Genistein and Biochanin A Inhibit the Growth of Human Prostate Cancer Cells but not Epidermal growth Factor Receptor Tyrosine Autophosphorylation*”由 Peterson 和 Barnes 著, *The Prostate*, Vol. 22, p. 335~345(1993); 和 “*Soybeans Inhibit Mammary Tumors in Models of Breast Cancer*”, Barnes 等著, *Mutagens and Carcinogens in the Diet*, p. 239~253(1990)。

上述异黄酮中, 几种与一个葡萄糖分子连接, 以葡萄糖苷或葡萄糖形式存在。几种葡萄糖如 6”-OAc-染料木苷, 含有一个与自身葡萄糖分子的六位连接的乙酸基。虽然包括葡萄糖苷在内的所有这些异黄酮在医学价值上令人感兴趣, 但是其中葡萄糖分子未被连接的葡萄糖苷配基是最受关注的特殊的异黄酮。这些异黄酮与葡萄糖或异黄酮葡萄糖苷的水溶性不同。这类特殊的异黄酮是黄豆苷原、染料木黄酮和 *glycitein*。这些葡萄糖苷配基具有以下通式:



其中, R_1, R_2, R_3 和 R_4 可从含 H, OH 和 OCH_3 的组中选出。因此,

本发明所针对的是把葡糖苷配基和一种植物蛋白富集物从这些材料中分离出来。

本领域中已知把葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮的方法，Obata 等人描述于日本专利申请 258,669 中。这些方法只能完成中等程度转化而不适合需要，特别是对大规模工业化操作来说。另外，已知方法如 669 申请中只讲述从蛋白材料中除去异黄酮，而并未讲述如何制备葡糖苷配基异黄酮富集的蛋白提取物或分离物。因此，需要一种方法使至少多数和最好将大体上所有葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮并生产出一种葡糖苷配基异黄酮富集的蛋白提取物和分离物。

因此，本发明目的是提供一种葡糖苷配基异黄酮富集的提取物和蛋白分离物及其生产方法。这与其他目的将在本发明以下描述中得以实现。

本发明提供一种葡糖苷配基异黄酮富集的植物蛋白提取物和分离物及其生产方法。生产这些提取物的方法包括， pH 值大约高于植物蛋白材料等电点的水提剂提取含葡糖异黄酮的植物蛋白材料，和在一定时间内、温度和 pH 条件下用足够数量的一种或多种 β -葡糖苷酶与葡糖异黄酮反应，以至少使提取物中多数葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基异黄酮，由此生产出葡糖苷配基异黄酮富集的提取物。本发明还提供用于生产这类提取物的方法，其中补充的 β -葡糖苷酶被加入提取物中以生产葡糖苷配基异黄酮富集的提取物。本发明进一步提供了获得葡糖苷配基异黄酮富集的蛋白分离物的方法，即调节前述提取物 pH 至接近该蛋白材料的等电点，使蛋白材料沉淀并生产出富集葡糖苷配基异黄酮的蛋白分离物。所得到的葡

糖苷配基异黄酮富集的分离子能被分离并脱水而形成一种干燥的富集分离物。另外，本发明提供了从植物蛋白材料中以较高比例回收异黄酮的方法。

尽管本发明将讲述的是关于大豆产品、尽管此方法特别适用于由大豆材料中生产葡糖苷配基异黄酮富集的提取物和分离物，但是此方法也通常应用于从含有异黄酮的各种植物蛋白来源中生产蛋白提取物和分离物。这种来源的一个例子是含有黄豆或大豆材料的植物蛋白材料。这里所用的术语“大豆材料”是指大豆或任何大豆衍生物。

按照优选实施方案的提取或分离，起始材料为大豆片，其中的油已经通过溶剂提取而除掉。该片用一种 pH 值大约高于蛋白材料等电点的水提剂提取，优选 pH 约 6.0 至约 10.0，最优选 pH 为约 6.7 至约 9.7。如果想提高水提剂的 pH 值，可以使用象氢氧化钠、氢氧化钾和氢氧化钙这样的典型碱性试剂。所需异黄酮化合物一般溶解于水提液中。为了最大限度回收水提液中的这些化合物，还要求大豆片与提取液的重量比控制在一定水平，以尽可能多地溶解蛋白材料中固有的异黄酮。

蛋白质和异黄酮的提取能以各种方式进行，这些方法包括在水提液与片的重量比为约 8 : 1 至约 16 : 1 时逆流提取这些片，其中初始提取液用于提取片，并提供一种蛋白质和异黄酮的水提液。另一方面，可以采用两步提取方法，其中第一步中提取剂与片的重量比组成约为 10 : 1，随后在提取剂与片的重量比约为 6 : 1 或更小的情况下用新鲜提取剂提取片，这样两步中提取剂与片的结合重量比不超过提取剂与片的总重量比 16 : 1。

除去不溶物质后，所得的含有溶解性异黄酮的含水蛋白提取物进一步与一种或多种 β -葡萄糖苷酶反应，使多数、更好为大体上全部以葡糖形式与一个葡萄糖分子连接的异黄酮转化成一种葡糖苷配基异黄酮。 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 范围将随所用特异 β -葡萄糖苷酶而变化，但一般在约 4 至约 8 之间变化。在与酶反应前提取物的 pH 值一般调节到这种特异酶具有最大活性的 pH 值范围。一般，通过添加一种可食用酸，如乙酸、硫酸、磷酸、盐酸或其他任何适合的试剂来调节 pH 值。

β -葡萄糖苷酶可以是自然存在于大豆材料中或是出现在微生物生长时，这里称之为“剩余”酶，或被加入蛋白质提取物中。所加酶在这里称为“补充酶”。通常，如果大豆材料或提取物中的剩余酶浓度不足以使多数、更好为大体上全部的异黄酮由葡糖形式转化为葡糖苷配基形式，则需加入补充酶。足以完成异黄酮转化反应的酶量是随着许多因素而变化的，包括存在的酶的种类，酶浓度分布、系统 pH 值、存在的酶的活性。一旦由剩余酶、补充酶或两者同时形成足够的酶浓度时，含有溶解异黄酮的蛋白质提取物将在一定时间内、温度和 pH 下，与 β -葡萄糖苷酶发生反应，使提取液中至少多数、最好基本上全部葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基形式。

补充的 β -葡萄糖苷酶最好包括 *Biopectinase 100L* 和 *300L*，*Biopectinase OK 70L*，*Lactase F* 和 *Lactozyme*。*Lactase F* 最佳 pH 范围为约 4 至约 6，可从 *Amano International Enzyme Co., Inc.*，*P. O. Box 1000, Troy, VA22974* 得到。而 *Lactozyme* 的最佳 pH 范围约为 7，可从 *Novo Industries, Enzyme Division, NOVO Alle, DK - 2880 Bagsvaerd, Denmark* 得到。*Biopectinase 100L*,

Biopectinase 300L 和 *Biopectinase OK 70L* 可从 *Quest International, Sarasota, Florida* 得到。补充酶的添加量要足以使至少多数、最好基本上全部葡糖异黄酮转化为葡糖苷配基。例如，在需要补充酶时，所加酶量以蛋白质沉淀物干基计约为 0.5% 至约 5% (重量)。

另一类适用酶是脂酶。这些酶被认为特别适用于这里讲述的优选实施方法，其通过移去异黄酮结合物中的乙酸根和丙二酸根基团，使乙酸和丙二酸结合物转变为葡糖异黄酮。在最优选实施方式中，同时利用 β -葡萄糖苷酶和脂酶这两种类型的酶。

优选实施方法是优选的一步过程，在相对短的时间内完成异黄酮的高度转化(从葡糖形式到葡糖苷配基形式)，方法相对简便且经济。这里所用的术语“一步”反应过程是指在反应过程中某些过程参数通常保持不变。这些过程参数包括 *pH* 和温度。

很高程度的转化是指，大豆材料提取物中以葡糖形式存在的异黄酮至少多数、最好是基本上全部被转化为葡糖苷配基形式。术语“多数”是指葡糖异黄酮转化成葡糖苷配基异黄酮的程度至少大约为 50%。术语“基本上全部”是指葡糖异黄酮转化成葡糖苷配基异黄酮的程度至少约为 80% 且最优选至少约为 90%。

尽管不想受到某一特别理论的束缚，但是相信，这里所述方法的令人惊奇和意想不到的高转化度是一步反应过程中所用过程参数共同造成的。优选的反应系统 *pH* 值是保持或大约保持在约 4 到约 8 数值内，且在一步反应过程，最优选的是在与异黄酮结合物反应前酶最有活性时的 *pH* 值。优选反应系统的温度是保持或基本上保持在约 40°C 到约 60°C 的温度内，且在一步反应过程中最优选温度

为约 60℃。通常，这里所述由一步反应过程完成基本上使全部葡萄糖异黄酮转化为葡萄糖苷配基所必需的时间，是从约 2 小时到约 24 小时。

与一种或多种 β -葡萄糖苷酶反应后，调节 pH 值至大豆蛋白等电点，通常通过加酸调节在约 4.0 至约 5.0 之间，优选约 4.4 至约 4.6 之间。调节 pH 值至等电点可使蛋白质以凝乳形式沉淀，凝乳中富集不易溶的葡萄糖苷配基。沉淀后，凝乳或沉淀蛋白质通过如离心法从乳清中分离，形成富集葡萄糖苷配基异黄酮的蛋白分离物。

在优选实施方式中，沉淀的蛋白质材料的洗涤或者完全免除，或者减到最小程度，以减少葡萄糖苷配基异黄酮从蛋白质沉淀物中脱除，由此提供一种葡萄糖苷配基异黄酮富集的分选物，尽管葡萄糖苷配基比其他异黄酮难溶于水。因此，可以完全避免用水对酸沉淀蛋白进行洗涤，或将其限制在单一水洗过程，其中水与沉淀蛋白材料的重量比为约 2:1 至约 6:1 之间。缺少酸沉淀凝乳的洗涤提供一种富集所需水平异黄酮的分选物，而进行过多数度的洗涤将使异黄酮回收率更低。适量的洗涤提供一种蛋白分离物，其具有约 1.5 至约 3.5 毫克/克染料木黄酮的干基含量和约 1.0 至约 3.0 毫克/克的黄豆苷原含量。

酸沉淀的蛋白质随后通过离心或浓缩的结合使用而脱水，并采用常规方法干燥。优选实施方式不受某种特殊脱水方法限制，但优选使用常规干燥技术如喷雾干燥形成干燥分选物。这里所述方法提供葡萄糖苷配基异黄酮量增加了的分选物。

本发明还提供了从植物蛋白材料如大豆材料中以非常高比例回收异黄酮的方法。这里所述方法获得的回收水平，基于起始植物蛋

白材料中各种特定异黄酮的总和，一般至少为 50%，优选为 65%，最优选为 80%。尽管不想受任何特别理论的限制，但认为高回收率来自这里所述的转化反应以及伴随发生的所述各种工艺操作。通过在一特定加工阶段，将相对易溶的葡糖异黄酮结合物转化为更不易溶的葡糖苷配基形式，可以从原料中回收高百分比异黄酮的最终产品。

下列实施例提供本发明的特定实施方式而不是限制性实施方式。

实验

通过添加 5 克提取的脱脂大豆片(粉末)至 5 克水中并调 pH 值至 7 和 8 来制备样品。0.25 克 *Lactase F* 或 *Lactozyme* 被加进每种悬浮液中，以使每个样品中的酶浓度约为 5% (以固体重量计)。样品在 40°C 和 60°C 温育培养。在加入酶之前 ($t=0$) 和在预定温度下温育 24 小时后，取出子样品。表 1 显示了与 *Lactase F* 或 *Lactozyme* 温育 24 小时后，大豆片(粉状)中异黄酮的变化和百分比分布。在加入补充酶前样品未消毒，且微生物和污染物生长不受抑制。

表 1

| 样品 | 6"-OMal-6"-OAc- | | | | 6"-OMal-6"-OAc- | | | | 6"-OMal- | | | | |
|---|-----------------|----------|----------|----------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 染料 木苷 | 染料 木苷 | 染料 木苷 | 染料 木苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 |
| <u>pH 7.0, 40°C, t=24</u> 未添加酶 Lactase F Lactozyme | 16 | 80 | 0 | 4 | 16 | 79 | 1 | 3 | 22 | 62 | 16 | | |
| | 4 | 48 | 0 | 48 | 3 | 51 | 0 | 46 | 0 | 42 | 58 | | |
| | 2 | 39 | 0 | 59 | 2 | 41 | 0 | 57 | 0 | 30 | 70 | | |
| | 3 | 45 | 0 | 51 | 2 | 49 | 1 | 48 | 0 | 40 | 60 | | |
| <u>pH 7.0, 60°C, t=24</u> 未添加酶 Lactase F Lactozyme | 5 | 22 | 0 | 73 | 7 | 33 | 0 | 60 | 4 | 21 | 75 | | |
| | 10 | 32 | 0 | 59 | 10 | 35 | 3 | 52 | 6 | 23 | 71 | | |
| | 4 | 22 | 0 | 74 | 5 | 33 | 0 | 62 | 0 | 23 | 77 | | |
| <u>pH 8.0, 40°C, t=24</u> 未添加酶 Lactase F Lactozyme | 4 | 49 | 0 | 47 | 3 | 50 | 2 | 45 | 0 | 43 | 57 | | |
| | 3 | 39 | 0 | 58 | 3 | 40 | 3 | 55 | 0 | 29 | 71 | | |
| | 5 | 46 | 0 | 49 | 4 | 48 | 0 | 47 | 0 | 40 | 60 | | |
| <u>pH 8.0, 60°C, t=24</u> 未添加酶 Lactase F Lactozyme | 2 | 14 | 0 | 84 | 3 | 26 | 3 | 70 | 0 | 15 | 85 | | |
| | 6 | 24 | 0 | 80 | 8 | 30 | 3 | 59 | 5 | 22 | 74 | | |
| | 2 | 14 | 0 | 84 | 3 | 24 | 6 | 67 | 0 | 16 | 84 | | |

这些数据指出了通过结合使用剩余酶和补充酶可得到的转化程序。剩余酶的来源可以是微生物生长产生的或大豆内源酶。当大豆片(粉末)在 pH 为 8, $60^{\circ}C$ 和温育 24 小时时,可发生异黄酮结合物向葡糖苷配基的明显转化。这里所述每类异黄酮的浓度是基于这种异黄酮类型的各种形式的总和。

另一组样品是通过形成 16% 脱脂大豆片的水悬浮液而制备的。样品调 pH 值至 4.5 和 7, 并在 $45^{\circ}C$ 下温育 24 小时。子样品在 0 和 24 小时时取出。分析所有样品的异黄酮含量。表 2 显示了在 pH 值为 4.5 和 7, 温度为 $45^{\circ}C$ 下温育 24 小时后, 脱脂片中计算的异黄酮的百分比分布的变化。

表 2

| 样品 | 6"-OMal-6"-OAc- | | | | 6"-OMal-6"-OAc- | | | | 6"-OMal- | | |
|-------------------------|-----------------|----------|----------|---------|-----------------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|-----------|
| | 染料 木苷 | 染料 木苷 | 染料 木酮 | 染料 木 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | 黄 豆 苷 | GLYCITIN | GLYCITIN | GLYCITEIN |
| 1-0 片 | 49 | 46 | 0 | 4 | 49 | 44 | 3 | 3 | 44 | 33 | 22 |
| 52°S.P.M. 1.0.1-24 片 | 3 | 28 | 0 | 69 | 2 | 35 | 5 | 59 | 0 | 28 | 73 |
| 52°S.P.M. 4.5.1-24 片 | 19 | 42 | 0 | 39 | 17 | 48 | 4 | 31 | 14 | 37 | 49 |

这些数据表明依靠蛋白材料中的剩余酶所能达到的转化程度。在 pH 为 7 和温度为 45℃ 条件下温育 24 小时后，可发生异黄酮结合物向葡萄糖苷配基的明显转化。

在其他系列实验中，研究了从大豆得到的蛋白分离物中的染料木黄酮和黄豆苷原的百分回收率。百分回收率是通过测定分离物中染料木黄酮(或黄豆苷原)的量而得到的，以基于大豆起始材料中各种形式染料木黄酮(或黄豆苷原)的总量的百分数形式表示其数量。用 1000 克温度为 32℃、加氢氧化钠调 pH 为 9.7 的水提取 100 克脱脂大豆片。得到水与粉末重量比为 10:1。粉末从提取液中分离，用 600 克 pH9.7、温度 32℃ 的水提剂再次提取。第二次提取步骤得到水与粉末重量比为 6:1。离心分离粉末，使第一和第二提取物混合，pH 调至 4.5，形成大豆乳清和酸沉淀凝乳的浆液。浆液被加热到 50℃ 并加入 2% (以凝乳干重计) 的 *Lactase F*。让浆液在 50℃ 反应 16 小时以保证葡萄糖异黄酮完全转化成葡萄糖苷配基形式。酸沉淀的凝乳可通过离心法从乳清中分离以形成葡萄糖苷配基富集的分​​离物。可避免用水对沉淀凝乳的进一步洗涤。分离物中回收的染料木黄酮的量是起始大豆材料(脱脂大豆粉末)中各种形式染料木苷和染料木黄酮的总和的 86%。与之相似，分离物中回收的黄豆苷原的量为 75%。

下面是对一种测定黄豆产品中异黄酮的方法的说明。异黄酮可通过 0.75 克样品(喷雾干燥或精细研磨粉末)下 50ml 80/20 甲醇/水溶剂相混合而从大豆产品中提取。混合物用一个轨道摇动器于室温下摇动 2 个小时。两小时后，剩余的未溶解材料通过 *Whatman*

42号滤纸过滤除去。5ml滤液用4ml水和1ml甲醇稀释。

提取的异黄酮用 Beckman C18 反相柱通过高效液相色谱法(HPLC)分离。异黄酮被注入柱中,在起始为88%甲醇,10%水和2%冰醋酸至终止为98%甲醇和2%冰醋酸的溶剂梯度中洗脱。当流速为0.4毫升/分钟,所有异黄酮—染料木苷,6"-0-Acety-genistin, 6"-0-丙二酰染料木苷,染料木黄酮,黄豆苷,6"-0-乙酰黄豆苷,6"-0-丙乙酰黄豆苷,黄豆苷, glycitin 和其衍生物和 glycitein 可明显分离。峰的测量用紫外吸光度262nm。峰的测定可由质谱仪完成。

可通过使用购自 Indofine Chemical Company, Sommerville, NJ. 的纯标准物(染料木苷、染料木黄酮、黄豆苷和黄豆苷原)来进行定量。每种上述化合物被测出响应因子(积分面积/浓度)并用以定量未知样品。对于得不到纯标准物的结合形式,响应因子假定为母体分子的响应因子,并由分子量差异予以修正。glycitin 的响应因子假定为染料木苷的响应因子,用分子量差异做过修正。

这种方法提供每种单独异黄酮的量。为了方便起见,如果全部结合形式转化成它们相应的非结合形式,全部染料木苷、全部黄豆苷原和全部 glycitein 能被算出并代表这些化合物的聚集重量。这些总量也可采用一种利用酸水解作用转化结合形式的方法直接测量。

当然,应理解前述只是本发明的优选实施方式,在不违背其精神实质的情况下可做各种变化和改变,以及在附加权利要求中会涉及其更加广泛的方面,其中将会依据包括等效理论在内的专利法原则对权利要求予以说明。