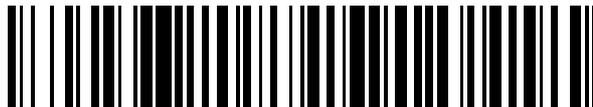


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 151**

51 Int. Cl.:

A23J 3/16 (2006.01)

A23L 3/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2010 E 10733187 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2389073**

54 Título: **Producción de productos de proteína de soja solubles a partir de la masa micelar de proteína de soja ("S200Ca")**

30 Prioridad:

26.01.2009 US 202055 P

08.09.2009 US 272289 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.10.2014

73 Titular/es:

BURCON NUTRASCIENCE (MB) CORP. (100.0%)
1388 Waller Avenue
Winnipeg, Manitoba R3T 1P9, CA

72 Inventor/es:

SEGALL, KEVIN I.;
SCHWEIZER, MARTIN;
GREEN, BRENT E.;
MEDINA, SARAH y
GOSNELL, BRANDY

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 507 151 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de productos de proteína de soja solubles a partir de la masa micelar de proteína de soja ("S200Ca").

Campo de la invención

La invención se refiere a la producción de productos de proteína de soja.

5 Antecedentes de la invención

En las solicitudes provisionales de Patentes de los Estados Unidos Nos. 61/107,112 (7865-373), presentada el 21 de octubre de 2008 61/193,457 (7865-374) presentada el 2 de diciembre de 2008, 61/202,070 (7865-376), presentada el 26 de enero de 2009, 61/202,553 presentada el 12 de marzo 2009 (7865-383), 61/213,717 (7865-389) presentada el 7 de julio de 2009 61/272,241 presentada el 3 de septiembre de 2009 y la solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 12/603,087 presentada el 21 de octubre, 2009, equivalente a WO2010/045727, se describe la preparación de un producto de proteína de soja, preferiblemente un aislado de proteína de soja, que es completamente soluble y es capaz de proveer soluciones transparentes y estables al calor a valores bajos de pH. Este producto de proteína de soja se puede utilizar para la fortificación de la proteína, en particular, de refrescos y bebidas deportivas, así como otros sistemas acuosos ácidos, sin precipitación de la proteína. El producto de proteína de soja se produce mediante la extracción de una fuente de proteína de soja con solución acuosa de cloruro de calcio a pH natural, opcionalmente, diluyendo la solución acuosa de proteína de soja resultante, ajustando el pH de la solución acuosa de proteína de soja a un pH de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4.4, preferiblemente de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 4.0, para producir una solución de proteína de soja acidificada clara, que puede ser opcionalmente concentrada y/o diafiltrada antes del secado.

20 La US2005/255226 revela la reducción de ácido fítico en aislado de proteína de canola mediante el uso de extracción a alta Temperatura, extracción con cloruro de calcio o una combinación de las dos. Se revela además que la proteína se puede recuperar a partir del sobrenadante resultante de la formación de la masa micelar de proteína posterior a la extracción. La proteína del sobrenadante se recupera por medio de la concentración, diafiltración y secado opcional.

25 La WO02/089597 describe el aislamiento de la proteína a partir del sobrenadante resultante de la formación de masa micelar de proteína por medio de la concentración del sobrenadante y del secado para obtener proteínas.

La US2007/065567 describe la formación de precipitados isoelectrónicos a partir de las soluciones de proteína de canola o de la conversión de masa micelar de proteína en un precipitado isoelectrónico volviendo a disolverlo en esta.

30 La US3736147 describe la eliminación del ácido fítico a partir de soluciones de proteínas por ultrafiltración, la cual se lleva a cabo en presencia de diferentes agentes químicos dependiendo de las condiciones en las que se realiza la ultrafiltración. Cuando la ultrafiltración se lleva a cabo a un pH entre 2 y 4.5, un gran exceso de cationes divalentes tales como iones de calcio y de magnesio deben estar presentes; cuando el pH está entre 4 y 7, la enzima fitasa debe estar presente; entre pH 7 y 11, se debe utilizar un fuerte agente quelante tal como EDTA. Se dice que el método más eficiente de eliminación de fósforo del fitato a partir de una solución de proteína, es llevar a cabo la ultrafiltración a pH 5 en presencia de fitasa.

Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado que las corrientes de proceso derivadas de la precipitación de una masa micelar de proteína de soja pueden procesarse adicionalmente para proporcionar productos de proteína de soja que tienen un contenido de proteína de al menos aproximadamente 60% en peso (N x 6.25) b.s., que son solubles en medios ácidos y producir soluciones estables al calor, transparentes a valores bajos de pH, y, por lo tanto, que se pueden utilizar para la fortificación de la proteína, en particular, de refrescos y bebidas deportivas, así como otros sistemas acuosos, sin la precipitación de proteínas. El producto de proteína de soja es preferiblemente un aislado que tiene un contenido de proteína de al menos 90% en peso, preferiblemente al menos 100% en peso (N x 6.25) b.s.

45 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso de preparación de un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) en una base en peso seco, que comprende:

la adición de sal de calcio u otra sal divalente, preferiblemente cloruro de calcio, al sobrenadante de la precipitación de una masa micelar de proteína de soja para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS, preferiblemente de 8 a 15 mS,

la eliminación de material de fitato precipitado de la solución resultante para dejar una solución clara,

opcionalmente ajustar el pH de la solución clara de 1.5 a 4.4, preferiblemente de 2,0 a 4,0, como por medio de la adición de ácido clorhídrico,

5 opcionalmente concentrar la solución clara de pH ajustado para un contenido de proteína de 50 g/L a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L, para producir una solución de proteína de soja concentrada clara,

opcionalmente diafiltrar la solución de proteína de soja clara, antes o después de completar la concentración, tal como con 2 a 40 volúmenes de agua, preferiblemente de 5 a 25 volúmenes de agua,

opcionalmente efectuar una etapa de eliminación de color, como por ejemplo un tratamiento con carbón activado granular, y

10 secar la solución de proteína concentrada

El sobrenadante puede ser parcialmente concentrado hasta una concentración intermedia de menos de 50 g/L antes de la adición de la sal de calcio para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS. El precipitado que se forma se retira y la solución resultante opcionalmente se acidifica como se describe anteriormente, se concentra adicionalmente a la concentración final y luego opcionalmente se diafiltra y se seca.

15 Alternativamente, en primer lugar el sobrenadante se puede concentrar a la concentración final de 50 g/L a 400 g/L, se adiciona la sal de calcio al sobrenadante concentrado para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS, el precipitado resultante se retira y la solución opcionalmente se acidifica y a continuación, opcionalmente se diafiltra y se seca.

20 Una opción en los procedimientos descritos anteriormente es omitir el procesamiento de la acidificación y el efecto de la solución a pH natural. En esta opción se adiciona sal de calcio al sobrenadante, el sobrenadante parcialmente concentrado o el sobrenadante concentrado para formar un precipitado que se separa. La solución resultante entonces se procesa como se ha descrito anteriormente, sin la etapa de acidificación.

25 Cuando el sobrenadante es concentrado parcialmente antes de la adición de la sal de calcio y se concentra completamente después de la eliminación del precipitado, en primer lugar el sobrenadante se concentra a una concentración de proteína de 50 g/L o menos, y, después de la eliminación del precipitado, entonces se concentra a una concentración de 50 a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L.

Preferiblemente, el producto de proteína de soja es un aislado que tiene un contenido de proteína de al menos 90% en peso, preferiblemente al menos 100% en peso (N x 6.25) b.s.

30 Aunque la presente invención se refiere principalmente a la producción de aislados de proteína de soja, se contempla que se pueden proporcionar productos de proteína de soja de menor pureza con propiedades similares a los aislados de proteína de soja. Tales productos de menor pureza pueden tener una concentración de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) b.s.

35 Los productos de proteína de soja obtenidos mediante el método de la invención se pueden mezclar con bebidas en polvo para la formación de bebidas no alcohólicas acuosas o bebidas deportivas por medio de la disolución de la misma en agua. Tal mezcla puede ser una bebida en polvo.

Los productos de proteína de soja proporcionados en este documento se pueden proveer como una solución acuosa de los mismos, que tenga un alto grado de claridad a valores de pH ácido y que sea estable al calor a estos valores de pH.

40 Las soluciones acuosas del producto de soja obtenidas mediante el método de la invención son estables al calor a pH bajo. La solución acuosa puede ser una bebida, que puede ser una bebida clara en la cual el producto de proteína de soja es completamente soluble y transparente o una bebida opaca en la que el producto de proteína de soja no aumenta la opacidad.

45 Los productos de proteína de soja producidos de acuerdo con los procesos en el presente documento carecen de la característica de sabor leguminoso del aislado de proteína de soja y son apropiados, no sólo para la fortificación de la proteína en medios ácidos, sino que pueden ser utilizados en una amplia variedad de aplicaciones convencionales de aislados de proteínas, incluyendo pero no limitando a la fortificación de proteína de alimentos procesados y bebidas, emulsificación de aceites, como un formador de cuerpo en productos horneados y agente de formación de espuma en productos que atrapan los gases.

Además, el producto de proteína de soja se puede formar en fibras de proteína, útiles en análogos de la carne, y puede ser utilizado como un sustituto de la clara de huevo o aditivo en productos alimenticios donde la clara de huevo se utiliza como un aglutinante. El producto de proteína de soja se puede utilizar en suplementos nutricionales. Otros usos del producto de proteína de soja se encuentran en los alimentos para mascotas, alimentos para animales y en aplicaciones industriales y cosméticos y en productos para el cuidado personal.

Descripción general de la invención

El paso inicial del proceso de proveer un producto de proteína de soja implica solubilizar la proteína de soja a partir de una fuente de proteína de soja. La fuente de proteína de soja puede ser soja o cualquier producto de soja o subproducto derivado de la transformación de la soja incluyendo pero no limitando a harina de soja, copos de soja, sémola de soja y harina de soja. La fuente de proteína de soja se puede utilizar en forma de grasa completa, forma parcialmente desgrasada o forma totalmente desgrasada. Cuando la fuente de proteína de soja contiene una cantidad apreciable de grasa, se requiere una etapa de eliminación de aceite, generalmente durante el proceso. La proteína de soja recuperada de la fuente de proteína de soja puede ser la proteína que se produce de forma natural en la soja o el material proteico puede ser una proteína modificada por manipulación genética, pero que posee las propiedades polares e hidrofóbicas características de la proteína natural.

La solubilización de proteína se puede realizar mediante el uso de una solución de sal de sodio de grado alimenticio tal como una solución de cloruro de sodio de calidad alimentaria. Cuando el aislado de proteína de soja está destinado a usos no alimentarios, se pueden utilizar productos químicos no aptos para uso alimentario. Otras sales monovalentes también se pueden utilizar, tal como cloruro de potasio. Como la concentración de la solución de sal aumenta, el grado de solubilización de la proteína de la fuente de proteína de soja inicialmente aumenta hasta que se alcanza un valor máximo. Cualquier aumento posterior en la concentración de sal no aumenta la proteína total solubilizada. La concentración de la solución de sal que causa la solubilización máxima de proteína varía dependiendo de la sal que se trate. La elección de la concentración de la solución de sal de sodio también se ve influida por la proporción de proteína que se desea obtener por la ruta micelar. Las concentraciones de sal más altas, preferiblemente de aproximadamente 0.5 M a aproximadamente 1.0 M, generalmente resultan en más masa micelar de proteína tras la dilución de la solución de la proteína de soja concentrada en agua fría. La extracción puede llevarse a cabo con una solución de cloruro de sodio de concentración más alta, o alternativamente, la extracción puede llevarse a cabo con una solución de cloruro de sodio menor de 0.5 M, por ejemplo, cloruro de sodio 0.10 M o 0.15 M, y a continuación se puede adicionar más sal a la solución de proteína de soja después de la eliminación de la fuente de proteína de soja.

En un proceso por lotes, la solubilización de la sal de la proteína se realiza a una temperatura de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 100 °C, preferiblemente de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, preferiblemente acompañada por la agitación para disminuir el tiempo de solubilización, que es normalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos. Se prefiere realizar la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína de la fuente de proteína de soja como sea posible, a fin de proporcionar un rendimiento global alto del producto.

En un proceso continuo, la extracción de la proteína de la fuente de proteína de soja se lleva a cabo de cualquier manera coherente realizando una extracción continua de la proteína de la fuente de proteína de soja. En una modalidad, la fuente de proteína de soja se mezcla continuamente con una solución de sal de calidad alimentaria y la mezcla se transporta a través de una tubería o conducto que tiene una longitud y a una velocidad de flujo para un tiempo de residencia suficiente para realizar la extracción deseada de acuerdo con los parámetros descritos en este documento. En tal procedimiento continuo, la etapa de solubilización salina se realiza rápidamente, en un tiempo de hasta aproximadamente 10 minutos, preferiblemente para realizar la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína de la fuente de proteína de soja como sea posible. La solubilización en el procedimiento continuo se realiza a temperaturas entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 100 °C, preferiblemente entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 35 °C.

La extracción se puede llevar a cabo en el pH natural del sistema de solución de sal/fuente de proteína de soja, generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. Alternativamente, el pH de la extracción se puede ajustar a cualquier valor deseado dentro del intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 para su uso en la etapa de extracción mediante el uso de cualquier ácido conveniente, usualmente ácido clorhídrico, o álcali, por lo general hidróxido de sodio, según se requiera.

La concentración de la fuente de proteína de soja en la solución de sal de grado alimenticio, durante la etapa de solubilización puede variar ampliamente. Los valores de concentración típicos son aproximadamente 5 a aproximadamente 15% peso/v.

La etapa de extracción de proteína con la solución acuosa de sal tiene el efecto adicional de las grasas solubilizantes que pueden estar presentes en la fuente de proteína de soja, que luego se traduce en las grasas que están presentes en la fase acuosa.

La solución de proteína resultante de la etapa de extracción generalmente tiene una concentración de proteína de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 g/L, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 g/L.

5 La solución de sal acuosa puede contener un antioxidante. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, tal como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleado puede variar de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso de la solución, preferiblemente de aproximadamente 0.05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier compuesto fenólico en la solución de proteína.

10 A continuación, la fase acuosa resultante de la etapa de extracción se puede separar de la fuente de proteína de soja residual, de cualquier manera conveniente, tal como empleando una centrifuga decantadora, seguido por centrifugación de disco y/o filtración para eliminar el material fuente de proteína de soja residual. La fuente de proteína de soja residual separada se puede secar para su eliminación. Alternativamente, la fuente de proteína de soja residual separada puede ser procesada para recuperar un poco de proteína residual, tal como mediante un procedimiento de precipitación isoelectrica convencional o cualquier otro procedimiento conveniente para recuperar dicha proteína residual.

15 Cuando la fuente de proteína de soja contiene cantidades significantes de grasa, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,844,086 y 6,005,076, asignadas al apoderado de las mismas, a continuación, las etapas de desengrasado descritas en estas se puede realizar en la solución de proteína acuosa separada. Alternativamente, el desengrasado de la solución de proteína acuosa separada se puede lograr por cualquier otro procedimiento conveniente.

20 La solución acuosa de proteína de soja se puede tratar con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar los compuestos de color y/o de olor. Tal tratamiento adsorbente se puede llevar a cabo bajo cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura ambiente de la solución de proteína acuosa separada. Para carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% peso/v, preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 2% peso/v. El agente de adsorción se puede retirar de la solución de proteína de soja mediante cualquier medio conveniente, tal como mediante filtración.

30 Como alternativa a la extracción de la fuente de proteína de soja con una solución salina acuosa, tal extracción puede hacerse utilizando solo agua. Cuando se emplea tal alternativa, entonces se puede adicionar la sal, en las concentraciones planteadas anteriormente, a la solución de proteína después de la separación de la fuente de proteína de soja residual. Cuando una primera etapa de eliminación de la grasa se lleva a cabo, generalmente, se adiciona la sal después de la terminación de tales operaciones.

35 Otro procedimiento alternativo es extraer la fuente de proteína de soja con la solución de sal de grado alimenticio a un valor de pH relativamente alto por encima de aproximadamente 7, generalmente hasta aproximadamente 11. El pH del sistema de extracción se puede ajustar al valor alcalino deseado por el uso de cualquier álcali de grado alimenticio conveniente, tal como solución acuosa de hidróxido de sodio. Alternativamente, la fuente de proteína de soja se puede extraer con la solución de sal a un pH relativamente bajo por debajo de aproximadamente pH 5, generalmente a un pH de aproximadamente 3. El pH del sistema de extracción se puede ajustar al valor ácido deseado mediante el uso de cualquier ácido de calidad alimentaria conveniente tal como ácido clorhídrico o fosfórico. Cuando se emplea tal alternativa, la fase acuosa resultante de la etapa de extracción fuente de proteína de soja luego se separa de la fuente de proteína de soja residual, de cualquier manera conveniente, tal como empleando centrifugación decantadora, seguido por centrifugación de disco y/o filtración para eliminar la fuente de proteína de soja residual. La fuente de proteína de soja residual separada se puede secar para su eliminación o procesado adicional para recuperar la proteína residual, como se discutió anteriormente.

45 La solución acuosa de proteína de soja resultante de la etapa de extracción de pH alto o bajo, a continuación se ajusta el pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, como se discutió anteriormente, antes del procesamiento adicional como se discute a continuación. Tal ajuste del pH se puede realizar utilizando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico, o un álcali, tal como hidróxido de sodio, según corresponda. Si es necesario, la solución de proteína se puede aclarar por cualquier procedimiento conveniente tal como centrifugación o filtración después del ajuste del pH y antes de su procesamiento posterior.

50 Si de la pureza adecuada, la solución de proteína de soja acuosa resultante se puede secar directamente para producir un producto de proteína de soja. Para disminuir el contenido de impurezas, la solución acuosa de proteína de soja puede ser procesada antes del secado.

55 La solución acuosa de proteína de soja se puede concentrar para aumentar la concentración de proteína de la misma mientras se mantiene la fuerza iónica de la misma sustancialmente constante. Tal concentración generalmente se realiza para proveer una solución de proteína concentrada que tiene una concentración de

proteínas de aproximadamente 50 g/L a aproximadamente 400 g/L, preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 g/L.

La etapa de concentración se puede realizar de cualquier manera conveniente consistente con la operación discontinua o continua, tal como empleando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas, tales como membranas de fibra hueca o membranas de devanado en espiral, con un límite de peso molecular adecuado, tal como de aproximadamente 3,000 a aproximadamente 1,000,000 daltons, preferiblemente de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 100,000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y configuraciones, y, para operación continua, dimensionada para permitir el grado deseado de concentración como la solución acuosa de proteína pasa a través de las membranas.

Como es bien conocido, la ultrafiltración y técnicas de membrana selectiva similares permiten que especies de bajo peso molecular pasen a través de la membrana, mientras que evitan que las especies de mayor peso molecular lo hagan. Las especies de bajo peso molecular incluyen no solo las especies iónicas de la sal de calidad alimentaria, sino también materiales de bajo peso molecular extraídos del material de origen, tales como, carbohidratos, pigmentos, proteínas de bajo peso molecular y los factores anti-nutricionales, tales como inhibidores de tripsina, que son en sí mismas proteínas de bajo peso molecular. El límite de peso molecular de la membrana se elige generalmente para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, mientras que permite que los contaminantes pasen a través teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y configuraciones.

La solución de proteína puede ser sometida a una etapa de diafiltración, antes o después de la concentración completa, preferiblemente utilizando una solución acuosa de sal de la misma molaridad y pH que la solución de extracción. Si se desea una reducción en el contenido de sal del producto retenido, la solución de diafiltración empleada puede ser una solución salina acuosa al mismo pH pero la concentración de sal más baja que la solución de extracción. Sin embargo, la concentración de sal de la solución de diafiltración se debe elegir de manera que el nivel de sal en el material retenido permanezca suficientemente alto para mantener la solubilidad de la proteína deseada. La diafiltración se puede realizar utilizando desde aproximadamente 2 a aproximadamente 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 volúmenes de solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, cantidades adicionales de contaminantes se eliminan de la solución acuosa de proteína mediante el paso a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración se puede realizar hasta que no hay más cantidades significantes de contaminantes o de color visible están presentes en el permeado. Si el material retenido se seca sin más procesamiento, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, a continuación, la diafiltración se puede llevar a cabo hasta que el material retenido se ha purificado suficientemente para, cuando se seca, para proporcionar la concentración deseada de proteína, preferiblemente para proporcionar un aislado con un contenido de proteína de al menos aproximadamente 90% en peso (N x 6.25) sobre una base seca. Tal diafiltración se puede realizar utilizando la misma membrana como para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración se puede realizar utilizando una membrana separada con un límite de peso molecular diferente, tal como una membrana que tiene un límite de peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3,000 a aproximadamente 1,000,000 daltons, preferiblemente de aproximadamente 5,000 a alrededor de 100,000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales y configuración de la membrana.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden realizar en el presente documento de manera tal que el producto de proteína de soja, posteriormente recuperado mediante el secado del material retenido concentrado y diafiltrado, contenga menos de aproximadamente 90% en peso de proteína (N x 6.25) b.s., tal como al menos un 60% en peso de proteína (N x 6.25) b.s. Mediante la concentración parcial y/o la diafiltración parcial de la solución acuosa de proteína de soja, es posible retirar sólo parcialmente los contaminantes. A continuación, esta solución de proteína se puede secar para proporcionar un producto de proteína de soja con bajos niveles de pureza. El producto de proteína de soja es todavía capaz de producir soluciones claras de proteína bajo condiciones ácidas.

Un antioxidante puede estar presente en el medio de diafiltración durante al menos parte de la etapa de diafiltración. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, tal como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleada en el medio de diafiltración depende de los materiales empleados y puede variar de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0.05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en la solución de proteína de soja concentrada.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional se puede realizar a cualquier temperatura conveniente, generalmente de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 60 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 35 °C, y durante el período de tiempo para realizar el grado deseado de concentración y de diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas dependen en algún grado del equipo de membrana utilizado para realizar el procesamiento de la membrana, la concentración de proteína deseada de la solución y la eficiencia de la eliminación de contaminantes al permeado.

- 5 Existen dos principales inhibidores de la tripsina en la soja, a saber, el inhibidor de Kunitz, que es una molécula lábil al calor, con un peso molecular de aproximadamente 21,000 Daltons, y el inhibidor de Bowman-Birk, una molécula más estable al calor con un peso molecular de aproximadamente 8.000 Daltons. El nivel de actividad de inhibidor de tripsina en el aislado de proteína de soja final se puede controlar mediante la manipulación de diferentes variables de proceso.
- 10 Por ejemplo, las etapas de concentración y/o diafiltración se pueden utilizar de una manera favorable para la eliminación de los inhibidores de la tripsina en el permeado, junto con los otros contaminantes. La eliminación de los inhibidores de la tripsina se promueve mediante el uso de una membrana de tamaño de poro más grande, tal como de aproximadamente 30,000 a aproximadamente 1,000,000 Daltons, utilizando la membrana a temperaturas elevadas, tales como aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C y el empleo de mayores volúmenes de medio de diafiltración, tales como aproximadamente 20 a aproximadamente 40 volúmenes.
- Además, se puede lograr una reducción en la actividad del inhibidor de tripsina mediante la exposición de materiales de soja a los agentes reductores que interrumpen o reorganizan los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores apropiados incluyen sulfito de sodio, cisteína y N-acetilcisteína.
- 15 La adición de tales agentes reductores se puede realizar en varias etapas del proceso global. El agente reductor se puede adicionar con el material fuente de proteína de soja en la etapa de extracción, se puede adicionar a la solución de proteína de soja acuosa clarificada después de la eliminación de material de fuente de proteína de soja residual, se puede adicionar a la solución de proteína concentrada antes o después de la diafiltración o se puede mezclar en seco con el producto de proteína de soja seco. La adición del agente reductor se puede combinar con las
- 20 etapas de procesamiento de la membrana, como se describe anteriormente.
- Si se desea retener los inhibidores de la tripsina activos en la solución de proteína concentrada, esto se puede lograr mediante la utilización de una membrana de concentración y de diafiltración con un tamaño de poro más pequeño, utilizando la membrana a temperaturas más bajas, empleando volúmenes más pequeños de medio de diafiltración y sin emplear un agente reductor.
- 25 La solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede someter a una operación de desgrasado adicional, si se requiere, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,844,086 and 6,005,076. Alternativamente, desengrasado de la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede lograr por cualquier otro procedimiento conveniente.
- 30 La solución de proteína acuosa concentrada y diafiltrada se puede tratar con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar los compuestos de color y/o de olor. Tal tratamiento adsorbente puede llevarse a cabo bajo cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura ambiente de la solución de proteína concentrada. Para carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% peso/v, preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 2% peso/v. El adsorbente se puede retirar de la solución de proteína de soja por cualquier medio conveniente, tal como
- 35 mediante filtración.
- La solución de proteína concentrada de soja y, opcionalmente diafiltrada resultante del opcional desengrasado y la etapa de tratamiento con adsorbente opcional, se puede someter a una etapa de pasteurización para reducir la carga microbiana. Dicha pasteurización se puede realizar bajo cualquier condición de pasteurización deseada. Por lo general, la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada se calienta a una temperatura de
- 40 aproximadamente 55 °C a aproximadamente 70 °C, preferiblemente de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 65 °C, durante aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos, preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos. La solución de proteína concentrada, pasteurizada, entonces se puede enfriar para su posterior procesamiento como se describe a continuación, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C.
- 45 De acuerdo con un aspecto del método, la solución de proteína de soja diafiltrada y concentrada se seca para producir el producto de proteína de soja. Alternativamente, la solución de proteína de soja diafiltrada y concentrada se puede ajustar en pH a un pH de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 4.0, preferiblemente de aproximadamente 2.9 a aproximadamente 3.2. El ajuste del pH se puede realizar de cualquier manera conveniente, tal como mediante la adición de ácido clorhídrico o ácido fosfórico. A continuación, la solución de proteína de soja acidificada resultante se seca. Como una alternativa adicional, la solución de proteína de soja de pH ajustado se puede someter a un tratamiento térmico para inactivar los factores anti-nutricionales lábiles al calor, tales como los
- 50 inhibidores de tripsina mencionados anteriormente. Tal etapa de calentamiento también proporciona el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. Generalmente, la solución de proteína se calienta a una temperatura de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 100 °C, preferiblemente de aproximadamente 85 °C a
- 55 aproximadamente 95 °C, durante aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 60 minutos, preferiblemente de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos. A continuación, la solución de proteína de soja acidificada tratada térmicamente, se puede enfriar a una temperatura de alrededor de 2 °C a aproximadamente 60

°C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 35 °C. La solución de proteína de soja tratada con calor resultante acidificada, luego se seca.

5 La solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede elevar en fuerza iónica mediante la adición de sal, si se desea, para promover la formación de la masa micelar de proteína tras la dilución como una alternativa a la operación de ajuste de la fuerza iónica descrita anteriormente.

10 Dependiendo de la temperatura empleada en la etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional y si o no se realiza una etapa de pasteurización, la solución de proteína concentrada se puede calentar a una temperatura de al menos aproximadamente 20 °C, y hasta aproximadamente 60 °C, preferiblemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, para disminuir la viscosidad de la solución de proteína concentrada para facilitar el funcionamiento de la subsiguiente etapa de dilución y formación de micelas. La solución de proteína concentrada no debe calentarse más allá de una temperatura por encima de la cual la formación de micelas no se produce en la dilución por agua fría.

15 La solución de proteína concentrada resultante de la etapa de concentración, la etapa opcional de diafiltración, la etapa de ajuste de la fuerza iónica opcional, la etapa opcional de desgrasado, la opcional etapa de tratamiento con adsorbente y la opcional etapa de pasteurización, a continuación, se diluye para realizar la formación de micelas mezclando la solución de proteína concentrada con agua fría que tiene el volumen necesario para alcanzar el grado de dilución deseado. Dependiendo de la proporción de proteína de soja deseada para ser obtenida por la ruta micelar y la proporción del sobrenadante, el grado de dilución de la solución de proteína concentrada puede variar. Con niveles de dilución más bajos, en general, una mayor proporción de la proteína de soja permanece en la fase acuosa.

20 Cuando se desea proveer la mayor proporción de la proteína por la ruta micelar, la solución de proteína concentrada se diluye en aproximadamente 5 veces hasta aproximadamente 25 veces, preferiblemente en aproximadamente 10 veces hasta aproximadamente 20 veces.

25 El agua fría con la que se mezcla la solución de proteína concentrada tiene una temperatura de menos de aproximadamente 15 °C, generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 °C, preferiblemente menos de aproximadamente 10 °C, dado que los rendimientos mejorados de aislado de proteína en el forma de masa micelar de proteína se alcanzan con estas temperaturas más frías en los factores de dilución utilizados.

30 En una operación por lotes, se adiciona el lote de solución concentrada de proteína a un cuerpo estático de agua fría que tiene el volumen deseado, como se discutió anteriormente. La dilución de la solución de proteína concentrada y la disminución consecuente de la fuerza iónica causa la formación de una masa similar a una nube de moléculas de proteína altamente asociadas en forma de gotas de proteína discretas en forma micelar. En el procedimiento por lotes, las micelas de proteína se dejan sedimentar en el cuerpo de agua fría para formar una masa micelar de proteína (PMM) similar al gluten, amorfa, pegajosa, densa, unificada, agregada. La sedimentación se puede asistir, por medio de centrifugación. Tal sedimentación inducida disminuye el contenido de líquido de la masa micelar de proteína, disminuyendo de ese modo el contenido de humedad por lo general de aproximadamente 70% en peso a aproximadamente 95% en peso, a un valor generalmente de alrededor de 50% en peso a aproximadamente 80% en peso de la masa micelar total. Disminuir el contenido de humedad de la masa micelar de esta manera también disminuye el contenido de sal ocluida de la masa micelar, y por lo tanto el contenido de sal del producto de proteína seco.

40 Alternativamente, la operación de dilución se puede llevar a cabo continuamente haciendo pasar constantemente la solución de proteína concentrada a una entrada de un tubo en forma de T, mientras que el agua de dilución se alimenta en la otra entrada del tubo en forma de T, permitiendo la mezcla en la tubería. El agua de dilución se introduce en el tubo en forma de T a una velocidad suficiente para lograr el grado deseado de dilución de la solución concentrada de proteína.

45 La mezcla de la solución de proteína concentrada y el agua de dilución en el tubo inicia la formación de micelas de proteína y la mezcla se alimenta continuamente desde la salida de la tubería en forma de T en un recipiente de sedimentación, de la cual, cuando está lleno, se permite que el sobrenadante se desborde. La mezcla se alimenta preferiblemente en el cuerpo de líquido en el recipiente de sedimentación de una manera que minimiza la turbulencia dentro del cuerpo del líquido.

50 En el procedimiento continuo, las micelas de proteínas se dejan asentar en el recipiente de sedimentación para formar masa micelar de proteína (PMM) similar al gluten, amorfa, pegajosa, densa, unificada, agregada y el procedimiento hasta una cantidad deseada de la PMM se ha acumulado en la parte inferior del recipiente de sedimentación, con lo cual la PMM acumulada se retira del recipiente de sedimentación. En lugar de decantar por medio de la sedimentación, la PMM se puede separar de forma continua por centrifugación.

5 Mediante el uso de un proceso continuo para la recuperación de la masa micelar de proteína de soja en comparación con el proceso por lotes, la etapa inicial de extracción de proteínas se puede reducir de manera significativa en el tiempo para el mismo nivel de extracción de proteínas y se pueden emplear temperaturas significativamente más altas en la etapa de extracción. Además, en una operación continua, hay menos posibilidades de contaminación que en un procedimiento por lotes, lo que lleva a una mayor calidad del producto y el proceso se puede llevar a cabo en un equipo más compacto.

10 La masa micelar decantada se separa de la fase acuosa residual o sobrenadante, tal como por decantación de la fase acuosa residual de la masa decantada o por centrifugación. La PMM puede usarse en la forma húmeda o se puede secar, por cualquier técnica conveniente, tal como secado por pulverización o liofilización, para una forma
 15 seca. La PMM seca tiene un alto contenido de proteína, en exceso de aproximadamente el 90% en peso de la proteína, preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso de proteína (calculado como $N \times 6.25$) b.s., y está sustancialmente sin desnaturalizar. Alternativamente, la PMM húmeda se puede ajustar en pH a un pH de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 4.0, preferiblemente de aproximadamente 2.9 a aproximadamente 3.2. El ajuste del pH se puede realizar de cualquier manera conveniente, tal como mediante la adición de ácido clorhídrico o ácido fosfórico. A continuación, la solución de proteína de soja acidificada resultante se seca. Como una alternativa
 20 adicional, la solución de proteína de soja de pH ajustado se puede someter a un tratamiento térmico para inactivar los factores anti-nutricionales lábiles al calor, tales como los inhibidores de tripsina mencionados anteriormente. Dicha etapa de calentamiento también provee el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. Generalmente, la solución de proteína se calienta a una temperatura de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 100 °C, preferiblemente de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 95 °C, durante aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 60 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos. La solución de proteína de soja acidificada tratada térmicamente a continuación, se puede enfriar a una temperatura de alrededor de 2 °C a aproximadamente 60 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 35 °C. A continuación, la solución resultante de proteína de soja tratada con calor acidificada, se seca.

25 En la presente invención, una sal de calcio u otra sal divalente, preferiblemente cloruro de calcio se adiciona al sobrenadante, que primero se puede concentrar o parcialmente concentrar en la manera descrita a continuación, para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS, preferiblemente 8 mS a 15 mS. El cloruro de calcio adicionado al sobrenadante puede estar en cualquier forma deseada, tal como una solución acuosa concentrada del mismo.

30 La adición del cloruro de calcio tiene el efecto de depositar ácido fítico a partir del sobrenadante en la forma de fitato de calcio. El fitato depositado se recupera a partir del sobrenadante, tal como por centrifugación y/o filtración para dejar una solución clara.

35 A continuación, el pH de la solución clara, se puede ajustar a un valor de 1.5 a 4.4, preferiblemente de 2.0 a 4.0. El ajuste del pH se puede realizar de cualquier manera conveniente, tal como mediante la adición de ácido clorhídrico o ácido fosfórico. Si se desea, la etapa de acidificación puede ser omitida de las distintas opciones descritas en el presente documento (diferentes del tratamiento térmico mencionado a continuación), una vez que se ha eliminado el material de fitato precipitado.

40 La solución acuosa de proteína de soja acidificada clara con pH ajustado puede ser sometida a un tratamiento térmico para inactivar los factores anti-nutricionales lábiles al calor, tales como los inhibidores de tripsina mencionados anteriormente. Dicha etapa de calentamiento también proporciona el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. Generalmente, la solución de proteína se calienta a una temperatura de 70 °C a 100 °C, preferiblemente de 85 °C a 95 °C, durante 10 segundos a 60 minutos, preferiblemente de 30 segundos a 5 minutos. A continuación, la solución de proteína de soja acidificada tratada térmicamente, se puede enfriar para su posterior procesamiento como se describe a continuación, a una temperatura de 2 °C a 60 °C, preferiblemente de 20 °C a 35 °C.
 45

La solución clara opcionalmente tratada con calor y opcionalmente con pH ajustado, si no está ya concentrada, se concentra para aumentar la concentración de proteína de la misma. Dicha concentración se realiza utilizando cualquier técnica de membrana selectiva apropiada, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas con un límite de peso molecular apropiado permitiendo que la especie de bajo peso molecular, incluyendo la sal, carbohidratos, pigmentos, inhibidores de la tripsina y otros materiales de bajo peso molecular extraídos a partir del material fuente de proteína, pase a través de la membrana, al tiempo que conserva una proporción significativa de la proteína de soja en la solución. Se pueden utilizar membranas de ultrafiltración que tienen un límite de peso molecular de aproximadamente 3.000 a 1.000.000 Daltons, preferiblemente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales y la configuración de la membrana.
 50 La concentración de la solución de proteína de esta manera también reduce el volumen de líquido requerido para ser secado para recuperar la proteína. La solución de proteína generalmente se concentra a una concentración de proteína de 50 g/L a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L, antes del secado. Tal operación de concentración se puede llevar a cabo en un modo discontinuo o en una operación continua, como se describe anteriormente.
 55

Cuando el sobrenadante se concentra parcialmente antes de la adición de la sal de calcio y se concentró completamente después de la eliminación del precipitado, el sobrenadante se concentra primero a una concentración de proteína de 50 g/L o menos, y, después de la eliminación del precipitado, a continuación se concentra a una concentración de proteína de 50 a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L.

5 La solución de proteína se puede someter a una etapa de diafiltración, antes o después de la concentración parcial o completa, preferiblemente utilizando agua o una solución salina diluida. La solución de diafiltración puede tener su pH natural, un pH igual al de la solución de proteína que se diafiltró o cualquier pH intermedio. Tal diafiltración se puede realizar utilizando desde aproximadamente 2 a 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente de 10 5 a 25 volúmenes de solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, se eliminan cantidades adicionales de contaminantes de la solución acuosa mediante el paso a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración se puede realizar hasta que no hay más cantidades significativas de contaminantes o de color visible presentes en el permeado o hasta que la solución de proteína se ha purificado suficientemente. Tal diafiltración se puede realizar utilizando la misma membrana como para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la diafiltración se puede realizar utilizando una membrana separada, tal como una membrana que tiene un límite de peso molecular en el rango de 3,000 a 1,000,000 daltons, preferiblemente de 5,000 a 100,000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales y la configuración de la membrana.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden realizar en el presente documento de manera tal que el producto de proteína de soja, posteriormente, se recupera por medio del secado del material retenido concentrado y diafiltrado, contenga menos de 90% en peso de proteína (N x 6.25) b.s., tal como al menos 60% en peso de 20 proteína (N x 6.25) b.s. Mediante la concentración parcial y/o la diafiltración parcial, es posible retirar sólo parcialmente los contaminantes de la solución acuosa de proteína de soja. Esta solución de proteína se puede secar para proporcionar un producto de proteína de soja con bajos niveles de pureza. El producto de proteína de soja es todavía capaz de producir soluciones claras de proteína bajo condiciones ácidas.

Un antioxidante puede estar presente en el medio de diafiltración durante al menos parte de la etapa de diafiltración. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, tal como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleado en el medio de diafiltración depende de los materiales empleados y puede variar de 0.01 a 1% en peso, preferiblemente 0.05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en la solución de aislado de proteína de soja concentrada.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden realizar a cualquier temperatura conveniente, generalmente de 2 °C a 60 °C, preferiblemente de 20 °C a 35 °C, y durante el período de tiempo para realizar el grado deseado de concentración y de diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas en algún grado dependen del equipo de membrana utilizado para realizar el procesamiento de la membrana, la concentración de proteína deseada de la solución y la eficiencia de la eliminación de contaminantes al permeado.

Como se mencionó anteriormente, el nivel de actividad de inhibidor de tripsina en el producto final de proteína de soja se puede controlar mediante la manipulación de diferentes variables de proceso.

Como se señaló anteriormente, el tratamiento térmico de la solución de proteína de soja acuosa acidificada se puede usar para inactivar los inhibidores de la tripsina termolábiles. La solución de proteína de soja acidificada parcialmente concentrada o totalmente concentrada también se puede tratar con calor para inactivar los inhibidores de la tripsina termolábiles.

40 Además, las etapas de concentración y/o diafiltración se pueden utilizar de una manera favorable para la eliminación de los inhibidores de la tripsina en el permeado, junto con los otros contaminantes. La eliminación de los inhibidores de la tripsina se promueve mediante el uso de una membrana de tamaño de poro más grande, tal como de 30,000 a 1,000,000 Daltons, utilizando la membrana a temperaturas elevadas, tal como 30 °C a 60 °C y el empleo de mayores volúmenes de medio de diafiltración, tal como de 20 a 40 volúmenes.

45 La acidificación y proceso de membrana de la solución de proteína diluida a un pH inferior, tal como 1.5 a 3 puede reducir la actividad del inhibidor de tripsina en relación con el procesamiento de la solución a un pH más alto, tal como de 3 a 4.4. Cuando la solución de proteína se concentra y se diafiltra en el extremo inferior del rango de pH, puede ser deseable elevar el pH del material retenido antes del secado. El pH de la solución de proteína concentrada y diafiltrada puede aumentarse hasta el valor deseado, por ejemplo pH 3, mediante la adición de cualquier álcali conveniente de calidad alimentaria, tal como hidróxido de sodio.

Además, una reducción en la actividad de inhibidor de tripsina se puede lograr mediante la exposición de materiales de soja a los agentes reductores que interrumpen o reorganizar los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores apropiados incluyen sulfito de sodio, cisteína y N-acetilcisteína.

La adición de tales agentes reductores se puede realizar en varias etapas del proceso global. El agente reductor se puede adicionar con el material fuente de proteína de soja en la etapa de extracción, se pueden adicionar a la solución de proteína de soja acuosa clarificada después de la eliminación de material de fuente de proteína de soja residual, se puede adicionar al material retenido diafiltrado antes de la dilución, se puede adicionar al sobrenadante, se puede adicionar al sobrenadante modificado con calcio concentrado y diafiltrado antes del secado o se puede mezclar en seco con el producto de proteína de soja seco. La adición del agente reductor se puede combinar con una etapa de tratamiento térmico y las etapas de procesamiento de la membrana, como se describe anteriormente.

Si se desea retener los inhibidores de la tripsina activos en la solución de proteína concentrada, esto se puede lograr mediante la eliminación o la reducción de la intensidad de la etapa de tratamiento térmico, sin utilizar agentes reductores, utilizando las etapas de concentración y de diafiltración en el extremo superior del rango de pH, tal como de 3 a 4.4, utilizando una membrana de concentración y de diafiltración con un tamaño de poro más pequeño, utilizando la membrana a temperaturas más bajas y empleando volúmenes más pequeños de medio de diafiltración.

La solución de proteína acuosa concentrada y diafiltrada se puede tratar con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar los compuestos de color y/o de olor. Dicho tratamiento adsorbente se puede llevar a cabo bajo cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura ambiente de la solución de proteína concentrada. De carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% peso/v, preferiblemente de 0.05% a 2% peso/v. El adsorbente se puede retirar de la solución de proteína de soja por medio de cualquier medio conveniente, tal como mediante filtración.

El pH de la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada y opcionalmente tratada con adsorbente se puede ajustar de 2.0 a 4.0, si ya no se ha empleado una etapa de ajuste de pH. La solución de proteína con pH ajustado, concentrada y opcionalmente diafiltrada y opcionalmente tratada con adsorbente, también se puede tratar con calor para reducir el nivel de actividad de inhibidor de tripsina como se describe anteriormente.

La solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada y opcionalmente tratada con adsorbente se seca por medio de cualquier técnica conveniente, tal como secado por pulverización o liofilización, para una forma seca. El producto de proteína de soja seca tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) b.s., preferiblemente en exceso del 90% en peso (N x 6.25) b.s., más preferiblemente al menos 100% en peso. El producto de proteína de soja tiene un contenido bajo de ácido fítico, generalmente menos del 1.5% en peso.

Los productos de proteína de soja producidos en el presente documento son solubles en un entorno acuoso ácido, lo que hace los productos ideales para su incorporación en bebidas, tanto carbonatadas como sin gas, para proveer la fortificación de proteínas de estas. Tales bebidas tienen un amplio rango de valores de pH ácidos, que van desde aproximadamente 2.5 a aproximadamente 5. Los productos de proteína de soja proporcionados en este documento se pueden adicionar a este tipo de bebidas en cualquier cantidad conveniente para proveer la fortificación de proteínas para este tipo de bebidas, por ejemplo, para proveer al menos aproximadamente 5 g de proteína de soja por porción. El producto de proteína de soja adicionado se disuelve en la bebida y no afecta a la claridad de la bebida, incluso después de tratamiento térmico. El producto de proteína de soja se puede mezclar con la bebida seca antes de la reconstitución de la bebida por disolución en agua. En algunos casos, puede ser necesario modificar la formulación normal de la bebida para que tolere la composición de la invención, cuando los componentes presentes en la bebida pueden afectar negativamente la capacidad de la composición a permanecer disuelta en la bebida.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Este ejemplo ilustra la producción de masa micelar de proteína (S300), el aislado de proteína derivado del sobrenadante (S200) y el aislado de proteína derivado del sobrenadante modificado con calcio (S200Ca) de la soja.

“a” kg de harina de soja, desgrasada procesada mínimamente con calor se adicionó a “b” L de solución “c” de NaCl M, a temperatura ambiente y se agitó durante 60 minutos para proveer una solución de proteína acuosa. La harina de soja residual se retiró y la solución de proteína resultante se clarificó mediante centrifugación y filtración para producir “d” L de solución de proteína filtrada que tiene un contenido de proteína de “e” % en peso.

La solución de extracto de proteína se redujo a “f” kg, por medio de la concentración en una membrana “g” que tiene un límite de peso molecular de “h” Dalton, produciendo una solución de proteína concentrada con un contenido de proteína de “i” % en peso.

La conductividad de la solución de proteína concentrada fue “j” mS. La solución concentrada de cloruro de sodio se adicionó al material retenido para elevar la conductividad a “k” mS. Después, la solución de proteína concentrada a “l” °C se diluyó “m” en el agua RO fría, que tiene una temperatura de “n” °C. Inmediatamente se formó una nube

ES 2 507 151 T3

blanca. El sobrenadante se eliminó y la masa pegajosa (PMM), precipitada, viscosa se recuperó por centrifugación con un rendimiento de “o” % en peso de la solución de proteína filtrada. Se encontró que la proteína derivada de PMM seca tiene un contenido de proteína de “p” % (N x 6.25) b.s. Al producto se le dio una designación “q” S300.

Los parámetros “a” a “q” se indican en la siguiente Tabla 1:

5

Tabla 1 - Parámetros para la producción de S300

q	S005-J27-08A	S005-K19-08A
a	10	10
b	200	200
c	0.15	0.50
d	185	165
e	0.70	1.34
f	5.28	12.06
g	PES	PES
h	100,000	100,000
i	21.28	17.51
j	9.45	24.9
k	21.4	24.9
l	27.8	30
m	1:10	1:5
n	1.6	4
o	18.5	20.8
p	91.31	99.66

10 Los sobrenadantes de estos dos ensayos fueron procesados de diferentes maneras. El sobrenadante del ensayo S005-J27-08A se procesó sin modificación de calcio. En este ensayo, se concentraron 65 L del sobrenadante a un volumen de 5 L con una membrana de PES con un límite de peso molecular de 10,000 Daltons a continuación se diafiltró con 25 L de agua purificada por ósmosis inversa en la misma membrana. El material retenido diafiltrado tenía una concentración proteica de 12.60% en peso. Con la proteína adicional recuperada a partir del sobrenadante, la recuperación global de la solución de proteína filtrada fue del 69.2%. El material retenido diafiltrado se secó para formar un producto con un contenido de proteína de 98.76% (N x 6.25) b.s. Al producto se le dio la denominación S005-J27-08A S200.

15 El sobrenadante del ensayo S005-K19-08A se procesó con la modificación de calcio. A 65 L de sobrenadante se le adicionaron 0.336 kg de CaCl₂, lo que elevó la conductividad de la solución de 6.31 mS a 12.65 mS. El precipitado que se formó se separó por centrifugación y luego el pH del centrifugado se ajustó a 3 con HCl diluido. A continuación, el concentrado acidificado se concentró a partir de un volumen de 66 L a un volumen de 5 L en una membrana de PES con un límite de peso molecular de 10.000 Daltons. El concentrado se diafiltró en la misma
 20 membrana con 25 L de agua de purificada con ósmosis inversa ajustada a pH 3 con HCl diluido. Con la proteína adicional recuperada a partir del sobrenadante, la recuperación global de la solución de proteína filtrada fue 37.1%.

El material retenido diafiltrado se secó para producir un producto con un contenido de proteína de 98.01% (N x 6.25) b.s. Al producto se le dio la denominación S005-K19-08A S200Ca.

El color de los productos en polvo seco se evaluó con un instrumento HunterLab ColorQuest XE en el modo de reflectancia. Los valores de color se indican en la siguiente Tabla 2:

5 Tabla 2 - puntajes HunterLab para productos secos

muestra	L*	a*	b*
S005-J27-08A S300	87.06	-0.28	10.04
S005-K19-08A S300	85.98	0.72	10.91
S005-J27-08A S200	84.51	0.56	10.51
S005-K19-08A S200Ca	86.87	0.58	9.53

Como puede verse en la Tabla 2, el color seco de todos los productos era bastante claro.

Ejemplo 2:

10 Este ejemplo contiene una evaluación de la estabilidad al calor en agua de los aislados de proteína de soja producidos mediante el método del Ejemplo 1 (S300, S200, S200Ca).

15 Una solución de proteína al 2% peso/v de cada producto en agua fue producido y el pH se ajustó a 3. La claridad de estas soluciones fue evaluada mediante la medición de turbidez con el instrumento HunterLab ColorQuest XE en modo de transmisión. Las soluciones se calentaron a 95 °C, se mantuvieron a esta temperatura durante 30 segundos e inmediatamente después se enfriaron a temperatura ambiente en un baño de hielo. A continuación, se midió de nuevo la claridad de las soluciones tratadas con calor.

La claridad de las soluciones de proteína antes y después del calentamiento se indica en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3 - Efecto del tratamiento térmico sobre la claridad de varias muestras

Muestra	(%) Turbidez antes del calentamiento	(%) Turbidez después del calentamiento
S005-J27-08A S300	24.9	21.1
S005-K19-08A S300	30.5	29.6
S005-J27-08A S200	11.0	3.2
S005-K19-08A S200Ca	7.3	7.9

20 Como se puede observar en la Tabla 3, las muestras S200 y S200Ca dieron soluciones bastante claras en agua a pH 3. Las soluciones de las muestras S300 no fueron tan claras. Todas las muestras fueron estables al calor, con el nivel de turbidez permaneciendo esencialmente constante tras el calentamiento, o en realidad mejorando.

Ejemplo 3:

25 Este ejemplo contiene una evaluación de la solubilidad en agua de los aislados de proteína de soja producidos mediante el método del Ejemplo 1 (S300, S200, S200Ca). La solubilidad se probó basándose en la solubilidad de la proteína (denominado método proteína, una versión modificada del procedimiento de Morr et al., J. Food Sci. 50:1715-1718) y la solubilidad producto total (denominado método de pellets).

En un vaso de precipitado se pesó, suficiente polvo de proteína para suministrar 0.5 g de proteína y luego se adicionó una pequeña cantidad de agua purificada por ósmosis inversa (RO) y la mezcla se agitó hasta obtener una forma de pasta homogénea. Después se adicionó agua para llevar el volumen a unos 45 ml. Los contenidos del vaso de precipitados se agitaron lentamente durante 60 minutos, utilizando un agitador magnético. Se determinó el pH inmediatamente después de dispersar la proteína y se ajustó al nivel apropiado (2, 3, 4, 5, 6 o 7) con NaOH o HCl diluido. También se preparó una muestra a pH natural. Para las muestras de pH ajustado, se midió el pH y se corrigió dos veces durante los 60 minutos de agitación. Después de los 60 minutos de agitación, las muestras se llevaron hasta 50 ml de volumen total con agua RO, produciendo una dispersión al 1% peso/v de proteína. Se midió el contenido de proteína de las dispersiones utilizando un Determinador de Nitrógeno LECO FP528. A continuación, se transfirieron alícuotas (20 ml) de las dispersiones a tubos de centrifuga tarados que se habían secado durante la noche en un horno a 100 °C y después se enfriaron en un desecador y los tubos se taparon. Las muestras se centrifugaron a 7800 g durante 10 minutos, lo que sedimentó el material insoluble y se produjo un sobrenadante claro. El contenido de proteína del sobrenadante se midió mediante el análisis de LECO y luego el sobrenadante y las tapas del tubo se desecharon y el material pellet se secó durante la noche en un horno a 100 °C. A la mañana siguiente, los tubos se transfirieron a un desecador y se dejaron enfriar. Se registró el peso de material de pellet seco. Se calculó el peso en seco del polvo inicial de proteína multiplicando el peso del polvo utilizado por un factor de $((100 - \text{contenido de humedad del polvo (\%)))/100)$. Entonces la solubilidad del producto se calcula de dos maneras diferentes:

- 1) Solubilidad (método de proteína) (%) = (% de proteína en sobrenadante/% de proteína en dispersión inicial) x 100
- 2) Solubilidad (método de pellet) (%) = $(1 - (\text{peso seco de material pellet insoluble} / ((\text{peso de 20 ml de dispersión} / \text{peso de 50 ml de dispersión}) \times \text{peso seco inicial de polvo de proteína}))) \times 100$

Los valores de pH naturales de los aislados de proteína producidos en el Ejemplo 1 en agua (1% de proteína) se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 - pH natural de solución de proteína preparada en agua al 1% de proteína

Lote	Producto	pH Natural
S005-J27-08A	S300	6.67
S005-K19-08A	S300	6.76
S005-J27-08A	S200	6.70
S005-K19-08A	S200Ca	3.29

Los resultados de solubilidad obtenidos se indican en las siguientes Tablas 5 y 6:

Tabla 5 - Solubilidad de productos a diferentes valores de pH basándose en el método de proteína

Lote	producto	Solubilidad (método de proteína) (%)						
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH Nat.
S005-J27-08A	S300	100	94.2	43.4	19.1	91.9	99.1	95.0
S005-K19-08A	S300	100	100	85.3	8.1	23.7	100	94.7
S005-J27-08A	S200	91.5	100	98.8	0.0	76.7	94.4	89.5
S005-K19-08A	S200Ca	94.7	100	100	20	38	66.3	100

Tabla 6 - Solubilidad de productos a diferentes valores de pH basándose en el método de pellets

Lote	producto	Solubilidad (método de pellets) (%)						
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH Nat.
S005-J27-08A	S300	97.1	97.0	55.4	29.3	91.7	94.5	86.9
S005-K19-08A	S300	96.5	96.1	76.3	5.7	29.1	93.1	86.8
S005-J27-08A	S200	96.9	97.8	96.3	15.1	86.1	97.9	98.1
S005-K19-08A	S200Ca	98.2	95.8	97.2	31.4	55.0	71.1	98.3

Como se puede observar a partir de los resultados de las Tablas 5 y 6, los productos S300 fueron muy solubles a valores de pH 2, 3 y 7. El S200 fue muy soluble a pH 2 a 4 y 7. El S200Ca fue muy soluble en el intervalo de pH 2 a 4.

Ejemplo 4:

Este ejemplo contiene una evaluación de la claridad en agua de los aislados de proteína de soja producidos mediante el método del Ejemplo 1 (S300, S200, S200Ca).

Se evaluó la claridad del 1% peso/v de soluciones de proteína preparadas como se describe en el Ejemplo 3, midiendo la absorbancia a 600 nm, con una puntuación de absorbancia inferior que indica una mayor claridad. El análisis de las muestras en un instrumento HunterLab ColorQuest XE en modo de transmisión también proporcionó una lectura de porcentaje de turbidez, otra medida de la claridad.

Los resultados de claridad se indican en las siguientes Tablas 7 y 8:

Tabla 7 - Claridad de soluciones de proteínas a diferentes valores de pH según la evaluación de A600

Lote	producto	A600						
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH Nat.
S005-J27-08A	S300	0.025	0.064	> 3.0	> 3.0	1.568	0.819	2.482
S005-K19-08A	S300	0.059	0.117	1.995	> 3.0	> 3.0	0.319	0.468
S005-J27-08A	S200	0.053	0.066	0.127	> 3.0	1.064	0.070	0.080
S005-K19-08A	S200Ca	0.031	0.040	0.066	> 3.0	> 3.0	1.922	0.047

Tabla 8 - Claridad de soluciones de proteínas a diferentes valores de pH tal como se evaluó por análisis de HunterLab

Lote	producto	Lectura de turbidez HunterLab (%)						
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH Nat.
S005-J27-08A	S300	8.1	16.3	98.9	99.9	97.6	89.5	98.8
S005-K19-08A	S300	5.8	16.9	92.4	93.4	93.4	40.2	54.1
S005-J27-08A	S200	5.6	6.4	14.4	97.4	86.5	8.1	9.2
S005-K19-08A	S200Ca	1.2	3.3	7.1	93.6	92.9	92.4	2.9

Como se puede observar a partir de los resultados de las Tablas 7 y 8, las soluciones de S300 fueron claras a pH 2 y ligeramente turbias a pH 3. Las soluciones de este producto en los valores de pH más altos fueron bastante turbias. Las soluciones de S200 y S200Ca fueron claras en el rango de pH de 2 a 4 y la solución S200 también fue clara a pH natural y pH 7.

Ejemplo 5:

Este ejemplo contiene una evaluación de la solubilidad en un refresco (Sprite) y bebida deportiva (Gatorade naranja) de los aislados de proteína de soja producidos mediante el método del Ejemplo 1 (S300, S200, S200Ca). La solubilidad se determinó con la proteína adicionada a las bebidas sin corrección de pH y de nuevo con el pH de las bebidas fortificadas con proteína, ajustado al nivel de las bebidas originales.

Cuando la solubilidad se evaluó sin corrección de pH, se pesó una cantidad suficiente de proteína en polvo para suministrar 1 g de proteína, en un vaso de precipitados y se adicionó una pequeña cantidad de bebida y se agitó hasta obtener una forma de pasta homogénea. Se adicionó más bebida para llevar el volumen a 50 ml, y luego las soluciones se agitaron lentamente en un agitador magnético durante 60 minutos para producir una dispersión de 2% peso/v de proteína. Se analizó el contenido de proteína de las muestras utilizando un Determinador de Nitrógeno LECO FP528, a continuación una alícuota de las bebidas que contienen la proteína se centrifugó a 7800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante.

$$\text{Solubilidad (\%)} = (\% \text{ de proteína en sobrenadante} / \% \text{ de proteína en dispersión inicial}) \times 100$$

Cuando la solubilidad se evaluó con la corrección del pH, se midió el pH del refresco (Sprite) (3.39) y de la bebida deportiva (Gatorade Naranja) (3.19) sin proteína. Se pesó una cantidad suficiente de proteína en polvo para suministrar 1 g de proteína en un vaso de precipitados y se adicionó una pequeña cantidad de bebida y se agitó hasta obtener una forma de pasta homogénea. Se adicionó más bebida para llevar el volumen a aproximadamente 45 ml, y luego las soluciones se agitaron lentamente en un agitador magnético durante 60 minutos. Se midió el pH de las bebidas que contienen proteína y después se ajustó al pH original sin proteína con HCl o NaOH según sea necesario. El volumen total de cada solución se llevó a 50 ml con la bebida adicional, produciendo una dispersión al 2% peso/v de proteína. Se analizó el contenido de proteína de las muestras utilizando un Determinador de Nitrógeno LECO FP528 entonces una alícuota de las bebidas que contienen proteína se centrifugó a 7800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante.

$$\text{Solubilidad (\%)} = (\% \text{ de proteína en sobrenadante} / \% \text{ de proteína en dispersión inicial}) \times 100$$

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente Tabla 9:

Tabla 9 - La solubilidad de los productos de Sprite y Gatorade Naranja

Lote	producto	sin corrección del pH		corrección del pH	
		Solubilidad (%) en Sprite	Solubilidad (%) en Gatorade Naranja	Solubilidad (%) en Sprite	Solubilidad (%) en Gatorade Naranja
S005-J27-08A	S300	25.6	42.2	87.9	90.3
S005-K19-08A	S300	4.8	71.0	95.3	85.2
S005-J27-08A	S200	17.3	69.9	66.5	74.4
S005-K19-08A	S200Ca	95.7	100	94.1	100

Como se puede ver en los resultados de la Tabla 9, el S200Ca fue el producto con la mejor solubilidad en el Sprite y Gatorade Naranja. Este es un producto acidificado y por lo tanto tuvo poco efecto sobre el pH de la bebida. Los productos restantes no se acidificaron por lo que su solubilidad se mejoró mediante la corrección del pH de las bebidas. Después de la corrección del pH, la solubilidad de los productos S300 fue bastante buena, pero la solubilidad del S200 fue sorprendentemente baja, teniendo en cuenta los resultados de solubilidad obtenidos en agua en el Ejemplo 3.

Ejemplo 6:

Este ejemplo contiene una evaluación de la claridad en un refresco y bebida deportiva de los aislados de proteína de soja producidos mediante el método del Ejemplo 1 (S300, S200, S200Ca).

ES 2 507 151 T3

Se evaluó la claridad de las dispersiones al 2% peso/v de proteínas preparadas en refresco (Sprite) y bebida deportiva (Gatorade naranja) en el Ejemplo 5, utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4. Para las mediciones de absorbancia a 600 nm, se hizo un blanco de la bebida apropiada en el espectrofotómetro antes de realizar la medición.

- 5 Los resultados obtenidos se indican en las siguientes Tablas 10 y 11:

Tabla 10 - Claridad (A600) de productos en Sprite y Gatorade Naranja

Lote	producto	sin corrección del pH		corrección del pH	
		A600 en Sprite	A600 en Gatorade Naranja	A600 en Sprite	A600 en Gatorade Naranja
S005-J27-08A	S300	> 3.0	> 3.0	1.730	1.740
S005-K19-08A	S300	> 3.0	> 3.0	1.339	1.028
S005-J27-08A	S200	> 3.0	2.816	1.560	1.560
S005-K19-08A	S200Ca	0.084	0.019	0.093	0.071

Tabla 11 - Lecturas de turbidez HunterLab para los productos en Sprite y Gatorade Naranja

Lote	producto	sin corrección del pH		corrección del pH	
		Turbidez % en Sprite	Turbidez % en Gatorade Naranja	Turbidez % en Sprite	Turbidez % en Gatorade Naranja
Sin proteína		0.0	44.0	0.0	44.0
S005-J27-08A	S300	97.7	98.1	89.3	89.9
S005-K19-08A	S300	93.6	93.5	94.9	86.3
S005-J27-08A	S200	97.4	98.2	88.6	90.4
S005-K19-08A	S200Ca	12.3	46.7	19.5	53.3

- 10 Como se puede ver en los resultados de las Tablas 10 y 11, el producto S200Ca tuvo el menor impacto en la claridad en Sprite y Gatorade Naranja. Sin embargo, el S200Ca en Sprite fue ligeramente turbio, en particular cuando se prueba con la corrección de pH. Las muestras de Sprite y Gatorade Naranja contienen S300 y S200 fueron muy turbias, independientemente de si se utiliza la corrección del pH.

Resumen de la divulgación

- 15 En resumen de esta descripción, se producen aislados de proteína de soja, que pueden proveer soluciones acuosas estables al calor y claras a valores de pH ácidos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso, preferiblemente al menos 90% en peso, más preferiblemente al menos 100% en peso (N x 6.25) en una base en peso seco, que comprende:
- 5 (a) (i) la adición de sal de calcio u otra sal divalente al sobrenadante de la precipitación de una masa micelar de proteína de soja para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS, o
- (ii) la concentración parcial del sobrenadante de la precipitación de la masa micelar de proteína de soja a una concentración de menos de 50 g/L y la adición de sal de calcio u otra sal divalente al sobrenadante parcialmente concentrado para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS, o
- 10 (iii) la concentración del sobrenadante de la precipitación de una masa micelar de proteína de soja a una concentración de 50 g/L a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L, y la adición de sal de calcio u otra sal divalente al sobrenadante concentrado para proporcionar una conductividad de 2 mS a 30 mS,
- (b) la eliminación del precipitado de la solución resultante a partir de la etapa (a) para dejar una solución clara,
- (c) ajustar opcionalmente el pH de la solución clara entre 1.5 a 4.4, preferiblemente de 2.0 a 4.0,
- 15 (d) (i), cuando la etapa (a) (i) se ha realizado, la concentración, o (ii) cuando la etapa (a) (ii) se ha realizado, una concentración adicional de la solución clara opcionalmente de pH ajustado para un contenido de proteína de 50 a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L, para proveer una solución de proteína de soja concentrada clara,
- (e) diafiltración opcional de la solución de la proteína concentrada clara, y
- (f) secado de la solución concentrada.
- 20 2. El proceso reivindicado en la reivindicación 1, en donde dicha etapa de concentración (d) (i) o (a) (ii) o la etapa de concentración (a) (iii) y/o la etapa de concentración adicional (d) (ii) se realizan, y/o dicha etapa opcional de diafiltración se lleva a cabo, utilizando una membrana que tiene un límite de peso molecular de 3,000 a 1,000.000 Daltons, preferiblemente de 5,000 a 100,000 Daltons.
- 25 3. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde una etapa de diafiltración se realiza utilizando agua, agua acidificada, solución salina diluida o una solución de sal diluida acidificada en la solución de proteína de soja antes o después de la concentración completa de la misma, utilizando preferiblemente 2 a 40 volúmenes, más preferiblemente 5 a 25 volúmenes, de solución de diafiltración, preferiblemente al menos parcialmente en presencia de un antioxidante.
- 30 4. El proceso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada, si no está ya acidificada, se acidifica a un pH de 2.0 a 4.0 antes del secado.
- 35 5. El proceso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la solución de proteína de soja acidificada clara se somete a una etapa de tratamiento térmico para inactivar los factores anti-nutricionales lábiles al calor, preferiblemente inhibidores de la tripsina lábiles al calor, preferiblemente a una temperatura de 70° a 100 °C durante 10 segundos a sesenta minutos, más preferiblemente de 85° a 95 °C durante 30 segundos a 5 minutos, y en donde la etapa de tratamiento térmico también opcionalmente pasteuriza la solución de proteína acidificada clara, y en donde la solución de proteína acidificada de soja clara, tratada térmicamente, se enfría opcionalmente a una temperatura de 2°C a 60 °C, preferiblemente de 20°C a 35 °C para su posterior procesamiento.
6. El proceso reivindicado en la reivindicación 3, en donde la etapa de concentración y/o de diafiltración opcional se operan de una manera favorable a la eliminación de inhibidores de tripsina.
- 40 7. El proceso reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se adiciona un agente reductor (a) al sobrenadante y/o (b) durante la etapa de concentración y/o de diafiltración opcional, y/o (c) a la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada antes del secado, y/o (d) el producto de proteína de soja seco, para interrumpir o reorganizar los enlaces disulfuro de inhibidores de tripsina para lograr una reducción en la actividad de inhibidores de tripsina