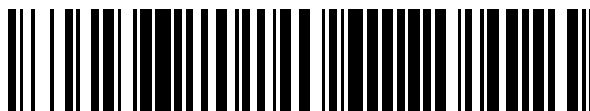


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 567**

51 Int. Cl.:

A23J 3/16 (2006.01)

A23C 11/10 (2006.01)

A23J 1/14 (2006.01)

A23L 2/46 (2006.01)

A23L 2/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10740874 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2395854**

54 Título: **Producción de un producto de proteína de soja usando extracción con cloruro de calcio ("S702/S7300/S7200/ S7301")**

30 Prioridad:

11.02.2009 US 202262 P
30.06.2009 US 213663 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2014

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 2 519 567 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 un producto de proteína de soja usando extracción con cloruro de calcio ("S702/S7300/S7200/S7301").

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con la preparación de productos de proteína de soja.

Antecedentes de la invención

10 En las solicitudes de patente provisionales de los Estados Unidos Nos. 61/107.112 presentada el 21 de octubre de 2008, 61/193.457 presentada el 2 de diciembre de 2008, 61/202.070 presentada el 26 de enero de 2009, 61/202.553 presentada el 12 de marzo de 2009, 61/213.717 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 de 2009 (publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2010/098818 publicada el 22 de abril de 2010), 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 proporcionar soluciones transparentes y estables al calor a valores de pH bajo. Este producto de proteína de soja se puede utilizar para la fortificación de proteína, en particular, de bebidas no alcohólicas 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 una 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 hasta aproximadamente 4,4, preferiblemente de aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 4,0, para producir una solución de proteína de soja clara acidificada, que opcionalmente se puede concentrar y/o someter a diafiltración antes de secar.

25 El documento US2005 / 0255226 describe un procedimiento para la formación de aislados de proteína de semilla oleaginosa, en particular, aislado de proteína de canola, que tiene un menor contenido de ácido fítico. Una de las dos formas descritas para reducir el contenido de ácido fítico es llevar a cabo la extracción inicial de las semillas oleaginosas utilizando una solución acuosa de cloruro cálcico, con un rendimiento máximo obtenido utilizando un pH de 5 a 6,5, preferiblemente 5,3 a 6,2, para la solución de proteína de semilla oleaginosa cuando se precipita posteriormente la proteína para formar una masa micelar de proteína.

30 La patente de los Estados Unidos No. 4.169.090 divulga que se puede extraer la proteína de semillas oleaginosas en condiciones acuosas suaves, y que el ambiente iónico de la solución puede ser manipulado para obtener una alta solubilidad de las proteínas durante la extracción inicial y, posteriormente, para fomentar la precipitación de proteínas a partir de la solución.

Resumen de la invención

35 En la actualidad se ha encontrado que los extractos de cloruro de calcio de una fuente de proteína de soja se pueden procesar mediante procedimientos alternativos para proporcionar productos de proteína de soja sustancialmente equivalentes, que tienen un contenido de proteína de al menos aproximadamente el 60% en peso (N x 6,25) en b. s. (base seca), que son solubles en medio ácido y producen soluciones transparentes, estables al calor a valores de pH bajo y, por tanto, se pueden utilizar para la fortificación con proteína, en particular, de bebidas no alcohólicas y bebidas deportivas, así como otros sistemas acuosos, sin precipitación de la proteína. El producto de proteína de soja preferiblemente es un aislado que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente el 90% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente el 100% (N x 6,25) en b. s.

40 En un aspecto de la presente invención, se extrae materia prima de proteína de soja con una solución acuosa de cloruro de calcio a pH natural y la solución acuosa de proteína de soja resultante se somete a ultrafiltración y diafiltración opcional para proporcionar una solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada, que se puede secar para proporcionar el producto de proteína de soja. El nivel de inhibidores de tripsina antinutricionales en el producto de proteína de soja se puede controlar al seleccionar las condiciones de procesamiento de la membrana para liberar la cantidad deseada de inhibidores en la corriente de permeado.

45 En otro aspecto de la presente invención, se extrae una materia prima de proteína de soja con una solución acuosa de cloruro de calcio a pH natural y la solución acuosa de proteína de soja resultante se somete a ultrafiltración y diafiltración opcional para proporcionar una solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada que luego se acidifica hasta un pH de 2,5 a 4,4, preferiblemente 2,0 a 4,0. Esta proteína de soja se puede fraccionar mediante dilución en agua, proporcionando un precipitado rico en proteínas de globulina y un sobrenadante rico en proteínas de albúmina. El sobrenadante se puede procesar, como se describe en detalle más adelante, para formar productos de proteína de soja que tengan un contenido de proteína de soja de al menos aproximadamente el 60%

5 en peso, preferiblemente un aislado de proteína de soja que tenga un contenido de proteína de al menos aproximadamente el 90% en peso. Los inhibidores de tripsina, que son proteínas, se encuentran principalmente en la fracción del sobrenadante después de la dilución. La fracción precipitada se puede procesar o secar adicionalmente a medida que se proporciona el producto de proteína de soja, pero con un reducido nivel de inhibidores de tripsina.

El aislado de proteína de soja proporcionado en la presente invención es soluble a valores de pH ácido para proveer soluciones acuosas transparentes y estables al calor del mismo. El aislado de proteína de soja se puede utilizar para la fortificación con proteína, en particular, de bebidas no alcohólicas y bebidas deportivas, sin precipitación de la proteína.

10 En otro aspecto de la presente invención, se diluye en agua la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada, preparada como se describió anteriormente, pero todas las proteínas se vuelven a solubilizar mediante el ajuste del pH entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 4,4, preferiblemente entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0. La solución diluida y acidificada luego se puede concentrar y/o someter a diafiltración opcionalmente. La reducción en el nivel del inhibidor de tripsina se puede alcanzar mediante
15 la elección juiciosa de los parámetros de procesamiento de la membrana u opcionalmente al emplear una etapa de tratamiento térmico sobre la solución acidificada.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un producto de proteína de soja que tenga un contenido de proteína de soja de al menos el 60% en peso (N x 6,25), con base en peso seco, que comprende:

- 20 (a) extraer una fuente de proteína de soja con una solución acuosa de cloruro de calcio para provocar la solubilización de la proteína de soja proveniente de la fuente de proteína y formar una solución acuosa de proteína de soja,
- (b) separar la solución acuosa de proteína de soja de la fuente residual de proteína de soja,
- 25 (c) concentrar la solución acuosa de proteína de soja, mientras se mantiene la fuerza iónica prácticamente constante al utilizar una técnica de membrana selectiva,
- (d) opcionalmente someter a diafiltración la solución concentrada de proteína de soja, y
- (e) secar la solución concentrada de proteína de soja.

El producto de proteína de soja preferiblemente es un aislado que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente 90% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso (N x 6,25) en b. s.

30 Se puede adoptar una variación de este procedimiento para producir el producto con un contenido reducido de proteínas de albúmina e inhibidores de tripsina. En esta variación, se diluye la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente se somete a diafiltración en agua para producir un precipitado con un contenido reducido de proteínas de albúmina e inhibidores de tripsina. Se puede recolectar y secar el precipitado para proporcionar el producto o se puede solubilizar el precipitado en agua a pH bajo y luego se seca. Alternativamente,
35 la solución formada al volver a solubilizar el precipitado en agua a pH bajo se puede tratar opcionalmente con calor y/o concentrar y/o someter a diafiltración antes del secado.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe un método para producir un producto de proteína de soja que tenga un contenido de proteína de soja de al menos aproximadamente el 60% en peso (N x 6,25), en base seca, que comprende:

- 40 (a) extraer una fuente de proteína de soja con una solución acuosa de cloruro de calcio para provocar la solubilización de la proteína de soja de la fuente de proteína y formar una solución acuosa de proteína de soja,
- (b) separar la solución acuosa de proteína de soja de la fuente residual de proteína de soja,
- (c) concentrar la solución acuosa de proteína de soja, mientras se mantiene la fuerza iónica prácticamente constante mediante la utilización de una técnica de membrana selectiva,
- 45 (d) opcionalmente someter a diafiltración la solución concentrada de proteína de soja,
- (e) diluir la solución concentrada de proteína de soja en agua para provocar la formación de un precipitado,

(f) separar el precipitado del agua para dilución, denominado el sobrenadante, y

(g) secar el precipitado separado de la proteína de soja,

en donde se acidifica la solución concentrada y opcionalmente sometida a diafiltración de proteína de soja a un pH de 2,5 a 4,4, preferiblemente 2,0 a 4,0, antes de la dilución, separación y secado.

5 Se puede adoptar otra variación de este procedimiento para producir el producto. En esta variación, se diluye la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se diluye en agua y se disminuye el pH. La solución clara acidificada resultante se concentra y/o se somete a diafiltración opcionalmente y/o se la trata con calor antes del secado para producir el producto.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para producir un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de soja de al menos el 60% en peso (N x 6,25), en base seca, que comprende:

(a) extraer una fuente de proteína de soja con una solución acuosa de cloruro de calcio para provocar la solubilización de la proteína de soja proveniente de la fuente de proteína y formar una solución acuosa de proteína de soja,

15 (b) separar la solución acuosa de proteína de soja de la fuente residual de proteína de soja,

(c) concentrar la solución acuosa de proteína de soja, mientras se mantiene la fuerza iónica prácticamente constante mediante la utilización de una técnica de membrana selectiva,

(d) opcionalmente someter a diafiltración la solución concentrada de proteína de soja,

(e) diluir la solución concentrada de proteína de soja en agua para provocar la formación de un precipitado,

20 (f) acidificar la mezcla del precipitado y diluir con agua para volver a solubilizar la proteína y formar una solución clara de proteína de soja,

(g) concentrar la solución clara acidificada de proteína de soja, mientras se mantiene la fuerza iónica prácticamente constante mediante la utilización de una técnica de membrana selectiva,

(h) opcionalmente someter a diafiltración la solución concentrada clara acidificada de proteína de soja, y

25 (i) secar la solución clara acidificada concentrada y opcionalmente diafiltrada de la proteína de soja.

El empleo de algunos de los procedimientos de la presente invención permite la opción de la producción del producto de proteína de soja en una forma a pH natural. La generación del producto de proteína de soja sin una etapa de acidificación permite un procesamiento más fácil, más seguro y más económico, ya que no hay necesidad de ácidos y de su manipulación. Además, este procedimiento permite que el formulador de la bebida acidifique la proteína y la bebida con el agente acidificante de su elección, dados los diferentes perfiles de fuerza y de sabor de diversos ácidos.

30 Aunque la presente invención se relaciona principalmente con la producción de aislados de proteína de soja, se contempla que se pueden proporcionar productos de proteína de soja de menor pureza que tengan propiedades similares a las del aislado de proteína de soja. Tales productos de pureza menor pueden tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente el 60% en peso (N x 6,25) en b. s.

Los nuevos productos de proteína de soja de la invención se pueden mezclar con bebidas en polvo para la formación de bebidas no alcohólicas acuosas o bebidas deportivas al disolver las mismos en agua. Esta mezcla puede ser una bebida en polvo.

40 Los productos de proteína de soja proporcionados en la presente invención se pueden proporcionar como una solución acuosa de los mismos con un alto grado de claridad a valores de pH ácido y que sea estable al calor a estos valores de pH.

El método de la presente invención puede resultar en una solución acuosa del producto de soja proporcionado en la presente invención que sea estable al calor a un 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 cual el producto de proteína de soja no aumenta la opacidad.

5 Los productos de proteína de soja producidos de acuerdo con los procesos de la presente invención carecen del sabor característico a frijol de los aislados de proteína de soja y son adecuados, no sólo para la fortificación con
 10 proteína de un medio ácido, sino que también se pueden utilizar en una amplia variedad de aplicaciones convencionales de los aislados de proteína, incluyendo, pero sin limitarse a la fortificación con proteína de alimentos y bebidas procesados, la emulsificación de aceites, para dar cuerpo a productos horneados y un agente espumante en productos que atrapan gases. Además, el producto de proteína de soja se puede formar en fibras de proteína, útiles en análogos de carne, y se puede utilizar como un sustituto de clara de huevo o modificador de viscosidad en
 15 productos alimenticios donde la clara de huevo se utiliza como un aglutinante. El producto de proteína de soja también se puede utilizar como un suplemento nutricional. Otros usos de los productos de proteína de soja se encuentran en alimentos para mascotas, alimentos para animales y en aplicaciones industriales y cosméticas y en productos para el cuidado personal.

Descripción general de la invención

15 La etapa inicial del proceso para proporcionar el 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 o subproducto de soja derivado del procesamiento de soja, incluyendo pero sin limitarse a, harina de soja, hojuelas de soja y granos de soja. La fuente de proteína de soja se puede utilizar en forma grasa total, en forma parcialmente
 20 desgrasada o en forma totalmente desgrasada. Cuando la fuente de proteína de soja contiene una cantidad apreciable de grasa, en general se requiere durante el proceso de una etapa para remoción del aceite. La proteína de soja recuperada de la fuente de proteína de soja puede ser la proteína de origen natural que se encuentra en los frutos de soja o el material proteínico puede ser una proteína modificada mediante manipulación genética, pero que posee características hidrófobas y propiedades polares de la proteína natural.

25 La solubilización de proteínas a partir del material fuente de proteína de soja se realiza más convenientemente utilizando solución de cloruro de calcio de grado alimenticio, aunque se pueden utilizar soluciones de otras sales de calcio. Cuando el producto de proteína de soja se destina a usos no alimenticios, se pueden utilizar productos químicos de grado no alimenticio. Además, se pueden utilizar también otras sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de magnesio. Además, también se puede efectuar la extracción de la proteína de soja proveniente de la
 30 fuente de proteína de soja utilizando una solución de sal de calcio en combinación con otra solución salina, tal como cloruro de sodio. Adicionalmente, la extracción de la proteína de soja proveniente de la fuente de proteína de soja se puede efectuar utilizando agua u otra solución salina, tal como una solución de cloruro de sodio, con sal de calcio, tal como cloruro de calcio, que se añade posteriormente a la solución acuosa de proteína de soja producida en la etapa de extracción. Se remueve luego el precipitado formado después de la adición de la sal de calcio antes de su procesamiento posterior.

35 A medida que aumenta la concentración de la solución de sal de calcio, el grado de solubilización de la proteína proveniente de la fuente de proteína de soja aumenta inicialmente 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 de calcio que provoca la solubilización máxima de la proteína varía dependiendo de la sal que se trate. Por lo general, se prefiere utilizar un valor de concentración menor de aproximadamente 1,0 M, y más
 40 preferiblemente un valor de aproximadamente 0,10 M hasta aproximadamente 0,15 M.

45 En un proceso por lotes, la solubilización salina de la proteína se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 1°C y aproximadamente 100°C, preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 35°C, preferiblemente acompañada por agitación para disminuir el tiempo de solubilización, que por lo general es de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 60 minutos. Se prefiere llevar a cabo la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína de la fuente de proteína de soja como sea posible, a fin de proporcionar un alto rendimiento total del producto.

50 En un proceso continuo, la extracción de la proteína de soja de la fuente de proteína de soja se lleva a cabo de manera consistente con la realización de una extracción continua de proteína de soja de la fuente de proteína de soja. En una modalidad, la fuente de proteína de soja se mezcla continuamente con la solución de sal de calcio y se transporta la mezcla a través de un tubo o conducto que tenga una longitud y con una velocidad de flujo durante un tiempo de residencia suficiente para llevar a cabo la extracción deseada de acuerdo con los parámetros descritos en la presente invención. En este procedimiento continuo, la etapa de solubilización de la sal se realiza rápidamente, en un tiempo de hasta aproximadamente 10 minutos, preferiblemente para llevar a cabo la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína de la fuente de proteína de soja como sea posible. La solubilización en el
 55 procedimiento continuo se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 1°C y aproximadamente 100°C, preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 35°C.

- En general la extracción se realiza a un pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 11, preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7. El pH del sistema de extracción (la fuente de proteína de soja y la solución de sal de calcio) se puede ajustar, si fuera necesario, a cualquier valor deseado dentro del intervalo de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 11 para utilizarse en la etapa de extracción mediante el uso de cualquier ácido conveniente, por lo general ácido clorhídrico, o álcali, por lo general hidróxido de sodio, cuando sea necesario.
- La concentración de la fuente de proteína de soja en la solución de sal de calcio durante la etapa de solubilización puede variar ampliamente. Los valores de concentración típicos son de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15% en p/v.
- La solución de proteína resultante de la etapa de extracción por lo general tiene una concentración de proteína de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 g/L, preferiblemente de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 g/L.
- La etapa de extracción de proteína con la solución salina acuosa tiene el efecto adicional de solubilizar las grasas que pueden estar presentes en la fuente de proteína de soja, lo cual trae como resultado la presencia de grasas en la fase acuosa.
- La solución acuosa de sal de calcio puede contener un antioxidante. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, tal como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleada puede variar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1% en peso de la solución, preferiblemente aproximadamente 0,05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualesquier compuesto fenólico en la solución de proteína.
- La fase acuosa resultante de la etapa de extracción puede ser separada luego de la fuente de proteína de soja residual, en cualquier forma conveniente, tal como mediante el empleo una centrífuga decantadora, seguido por centrifugación y/o filtración en disco, para remover material residual de la fuente de proteína de soja. El material residual separado de la fuente de proteína de soja se puede secar para su eliminación. Alternativamente, la fuente de proteína de soja residual separada se puede procesar para recuperar alguna proteína residual, por ejemplo mediante un procedimiento convencional de precipitación isoeléctrica o cualquier otro procedimiento conveniente para recuperar dicha proteína residual.
- Cuando la fuente de proteína de soja contiene cantidades significativas de grasa, como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.844.086 y 6.005.076, cedida al cesionario de la misma y las divulgaciones de las mismas se incorporan en la presente invención como referencia, luego se pueden llevar a cabo las etapas de desgrasado descritas allí en la solución acuosa separada de proteína. Alternativamente, el desgrasado de la solución acuosa separada de proteína se puede lograr mediante cualquier otro procedimiento conveniente.
- La solución acuosa de proteína de soja se puede tratar con un absorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar los compuestos causantes de color y/o de olor. Este tratamiento absorbente se puede llevar a cabo bajo cualquier condición conveniente, en general a temperatura ambiente de la solución acuosa de proteína separada. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad entre aproximadamente 0,025% y aproximadamente 5% en p/v, preferiblemente entre aproximadamente 0,05% y aproximadamente 2% en p/v. El agente adsorbente se puede remover de la solución de soja mediante cualquier medio conveniente, tal como mediante filtración.
- Si es de pureza adecuada, se puede secar directamente la solución acuosa de proteína de soja resultante para producir un producto de proteína de soja. Para disminuir el contenido de impurezas, se puede procesar la solución acuosa de proteína de soja antes del secado.
- La solución acuosa de proteína de soja se puede concentrar para aumentar la concentración de proteína de la misma, mientras se mantenga la fuerza iónica de la misma prácticamente constante. Esta concentración generalmente se lleva a cabo para proporcionar una solución concentrada de proteína de soja que tenga una concentración de proteína de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 400 g/L, preferiblemente aproximadamente de 100 hasta aproximadamente 250 g/L.
- La etapa de concentración se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente consistente con una operación por lotes o continua, tal como mediante el empleo de cualquier técnica conveniente de membrana selectiva, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas, tales como membranas de fibra hueca o membranas en espiral, con un corte de peso molecular adecuado, tal como entre aproximadamente 3,000 y 1.000,000 de Daltons, preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuraciones de membrana, y, para un funcionamiento continuo, dimensionadas para permitir el grado deseado de concentración a medida que pasa la solución acuosa de proteína a través de las membranas.

Como es bien sabido, las técnicas de ultrafiltración y de membranas selectivas similares permitirán que atraviesen especies de bajo peso molecular, al mismo tiempo que evitan que atraviesen especies de peso molecular mayor. Las especies de bajo peso molecular incluyen no solamente especies iónicas de sales grado alimenticio sino también materiales de bajo peso molecular extraídos del material fuente, tales como carbohidratos, pigmentos, proteínas de bajo peso molecular y factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina, que en sí mismos son proteínas de bajo peso molecular. El corte de peso molecular de la membrana se escoge usualmente para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, mientras que se permite que los contaminantes pasen a través suyo teniendo en cuenta diferentes materiales y configuraciones de membrana.

La solución concentrada de proteína de soja luego puede ser sometida a una etapa de diafiltración, antes o después de concentración completa, utilizando una solución de sal de calcio tal como una solución de cloruro de calcio al mismo pH y la misma concentración de la sal de calcio que la solución de extracción. Si se desea una reducción en el contenido de sal del material retenido, la solución de diafiltración empleada puede ser una solución acuosa de una sal de calcio al mismo pH pero menor concentración salina que la solución de extracción. Sin embargo, la concentración salina de la solución de diafiltración se debe seleccionar de tal forma que el nivel de sal en el material retenido se mantenga suficientemente alto para mantener la solubilidad de la proteína deseada. Como se mencionó, la solución de diafiltración está preferiblemente a un pH igual que aquel de la solución de proteína que es sometida a diafiltración. El pH de la solución de diafiltración se puede ajustar con cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico o álcali, tal como hidróxido de sodio. Esta diafiltración se puede efectuar utilizando aproximadamente 2 hasta aproximadamente 40 volúmenes de la solución de diafiltración, preferiblemente aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 volúmenes de la solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, se remueven cantidades adicionales de contaminantes de la solución acuosa de proteína de soja mediante la etapa a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración se puede efectuar hasta que no haya presentes cantidades significativas adicionales de contaminantes o un color visible en el permeado o hasta que el material retenido haya sido purificado suficientemente de manera que, cuando se seca, proporciona un producto de proteína de soja con el contenido deseado de proteína, preferiblemente un aislado con un contenido de proteína de al menos aproximadamente el 90% en peso en base seca. Esta diafiltración se puede realizar utilizando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración se puede efectuar utilizando una membrana separada con corte de peso molecular diferente, tal como una membrana que tenga un corte de peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 1.000.000 de Daltons, preferiblemente aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuración de la membrana.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden llevar a cabo aquí de tal forma que el producto de proteína de soja recuperado posteriormente mediante secado del material retenido concentrado y sometido a diafiltración contiene aproximadamente menos del 90% en peso de proteína ($N \times 6,25$) en b. s., tal como al menos aproximadamente el 60% en peso de proteína ($N \times 6,25$) en b. s. Mediante concentración parcial y/o diafiltración parcial de la solución acuosa de proteína de soja, sólo es posible remover parcialmente los contaminantes. Esta solución de proteína luego se puede secar para proporcionar un producto de proteína de soja con menores niveles de pureza. El producto de proteína de soja aún es capaz de producir soluciones de proteína claras 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 desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1% en peso, preferiblemente aproximadamente 0,05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier compuesto fenólico presente en la solución concentrada de proteína de soja.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden efectuar a cualquier temperatura conveniente, generalmente aproximadamente 2° hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente aproximadamente 20° hasta aproximadamente 35°C y durante el período de tiempo para llevar a cabo el grado deseado de concentración y diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas dependen en cierta medida del equipo de membrana empleado para llevar a cabo el procesamiento por membrana, la concentración deseada de proteína de la solución y la eficiencia de la remoción de contaminantes para el permeado.

Existen dos inhibidores principales de tripsina en la soja, a saber, el inhibidor de Kunitz, que es una molécula termolábil 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 del inhibidor de tripsina en el producto final de proteína de soja se puede controlar mediante la manipulación de las diferentes variables del proceso.

Por ejemplo, se pueden operar las etapas de concentración y/o diafiltración de una manera favorable para la remoción de los inhibidores de tripsina en el permeado junto con los otros contaminantes. La remoción de los

inhibidores de tripsina es promovida mediante la utilización de una membrana de tamaño de poro mayor, tal como de aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 1.000.000 de Daltons, operando la membrana a temperaturas elevadas, tales como aproximadamente 30° hasta aproximadamente 60°C, y empleando volúmenes mayores del medio de diafiltración, tales como por ejemplo de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 volúmenes.

5 Además, se puede lograr una reducción de la actividad del inhibidor de tripsina mediante la exposición de los materiales de soja a agentes reductores que rompen o reordenan los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores adecuados incluyen sulfito de sodio, cisteína y N- acetilcisteína.

10 La adición de estos agentes reductores se puede llevar a cabo en diferentes etapas del proceso general. El agente reductor se puede agregar con el material fuente de proteína de soja en la etapa de extracción, se puede agregar a la solución acuosa de proteína de soja clarificada después de la remoción del material fuente de proteína de soja residual, se puede agregar a la solución de proteína concentrada antes o después de la diafiltración o se puede mezclar en seco con el producto seco de proteína de soja. La adición del agente reductor se puede combinar con las etapas de procesamiento de membrana, como se describió anteriormente.

15 Si se desea conservar los inhibidores de tripsina activos en la solución concentrada de proteína, esto se puede lograr mediante la utilización de una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro menor, operando la membrana a temperaturas menores, empleando menores volúmenes del medio de diafiltración y sin emplear un agente reductor.

20 La solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada puede ser sometida a una operación de desgrasado adicional, si se requiere, como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.844.086 y 6.005.076. Alternativamente, el desgrasado de la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede lograr mediante cualquier otro procedimiento conveniente.

25 La solución de proteína acuosa concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede tratar con un absorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para remover los compuestos de color y/o de olor. Este tratamiento absorbente se puede llevar a cabo bajo cualquier condición conveniente, generalmente a temperatura ambiente de la solución de proteína acuosa concentrada. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0,025% hasta aproximadamente 5% en p/v, preferiblemente de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 2% en p/v. El adsorbente se puede remover de la solución de proteína de soja mediante cualquier medio adecuado, tal como mediante filtración.

30 La solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada que resulta de la etapa de desgrasado opcional y de tratamiento con adsorbente opcional se puede someter a una etapa de pasteurización para reducir la carga microbiana. Esta pasteurización se puede efectuar bajo cualesquiera condiciones deseadas de pasteurización. En general, la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se calienta a una temperatura de aproximadamente 55° hasta aproximadamente 70°C, preferiblemente de aproximadamente 60° hasta aproximadamente 65°C, durante aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 60 minutos, preferiblemente aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15 minutos. Luego se puede enfriar la solución concentrada pasteurizada de proteína de soja para el secado o un procesamiento adicional, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 15° hasta aproximadamente 35°C.

40 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la solución acuosa de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede secar mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización para proporcionar el producto de proteína de soja. Alternativamente, se puede ajustar el pH de la solución acuosa de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0. El ajuste del pH se puede efectuar de cualquier manera conveniente, por ejemplo, mediante la adición de ácido clorhídrico o ácido fosfórico. Luego se seca la solución de proteína soja acidificada resultante. Como una alternativa adicional, se puede someter la solución de proteína de soja ajustada en el pH a un tratamiento con calor para inactivar los factores antinutricionales termolábiles, tales como los inhibidores de tripsina mencionados anteriormente. Esta etapa de calentamiento adicional también proporciona el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. En general, la solución de proteína se calienta a una temperatura de aproximadamente 70° hasta aproximadamente 120°C, preferiblemente de aproximadamente 85° hasta aproximadamente 95°C, durante aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 60 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos. Luego se puede enfriar la solución de proteína de soja tratada con calor a una temperatura de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente de aproximadamente 20° hasta aproximadamente 35°C. Luego se seca la solución de proteína de soja acidificada, tratada con calor.

55 En otro aspecto de la invención, la solución de proteína concentrada que resulta de la etapa de concentración y la etapa opcional de diafiltración, la etapa de desgrasado opcional, la etapa de tratamiento con adsorbente opcional y la etapa de pasteurización opcional, se acidifica hasta un pH de 2,5 a 4,4, preferiblemente de 2,0 a 4,4, luego se

- 5 diluye para llevar a cabo la formación del precipitado al mezclar la solución de proteína concentrada con agua que tiene el volumen necesario para alcanzar el grado de dilución deseado. Cuando se va a separar la proteína precipitada de la fase acuosa residual, denominada el sobrenadante, como es el caso para este aspecto de la presente invención, el grado de dilución es generalmente aproximadamente de 5 veces hasta aproximadamente 25 veces, preferiblemente de aproximadamente 10 veces hasta aproximadamente 20 veces. El agua con la cual se mezcla la solución de proteína concentrada tiene preferiblemente una temperatura de aproximadamente 1° hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente de aproximadamente 15° hasta aproximadamente 35°C.
- 10 En una operación por lotes, se agrega el lote de la solución concentrada de proteína a un cuerpo estático de agua que tenga el volumen deseado, como se mencionó anteriormente. La dilución de la solución de proteína concentrada y la consiguiente disminución en la fuerza iónica provoca la formación del precipitado de proteína. En el procedimiento por lotes, se deja sedimentar el precipitado de proteína en el cuerpo de agua. Se puede ayudar a la sedimentación, por ejemplo mediante centrifugación. Esta sedimentación inducida disminuye el contenido de humedad y el contenido de sal ocluida de la proteína precipitada.
- 15 Alternativamente, la operación de dilución se puede llevar a cabo de manera continua al hacer pasar continuamente la solución de proteína concentrada a una entrada de un tubo en forma de T, mientras que el agua para dilución se alimenta a la otra entrada del tubo en forma de T, permitiendo la mezcla en el tubo. El agua para dilución se introduce en el tubo en forma de T a una velocidad suficiente para alcanzar el grado deseado de dilución de la solución de proteína concentrada.
- 20 La mezcla de la solución de proteína concentrada y el agua para dilución en el tubo inicia la formación de un precipitado de proteína y se alimenta continuamente la mezcla desde la salida del tubo en forma de T en un recipiente para sedimentación, a partir del cual, cuando se llena, se deja que el sobrenadante se desborde. La mezcla preferiblemente se alimenta en el seno del líquido en el recipiente para sedimentación de tal manera que se reduzca al mínimo la turbulencia dentro del seno del líquido.
- 25 En el procedimiento continuo, se deja sedimentar el precipitado de proteína en el recipiente para sedimentación y el procedimiento se continúa hasta que se haya acumulado en el fondo del recipiente para sedimentación una cantidad deseada del precipitado, después de lo cual se retira el precipitado acumulado del recipiente para sedimentación. En lugar de la precipitación por sedimentación, se puede separar el precipitado continuamente mediante centrifugación.
- 30 Mediante la utilización de un proceso continuo para la recuperación del precipitado de proteína de soja, en comparación con el proceso por lotes, se puede reducir significativamente el tiempo de la etapa inicial para extracción de la proteína para el mismo nivel de extracción de proteína. Además, en una operación continua, hay menos posibilidades de contaminación que en un procedimiento por lotes, lo que conduce a una mayor calidad del producto y se puede llevar a cabo el proceso en un equipo más compacto.
- 35 El precipitado sedimentado se separa de la fase acuosa residual o sobrenadante, por ejemplo mediante la decantación de la fase acuosa residual de la masa sedimentada o mediante centrifugación. El precipitado se puede lavar para remover el sobrenadante residual, por ejemplo con aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10, preferiblemente con aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3 volúmenes de agua y se recupera de nuevo el precipitado, como anteriormente. El precipitado lavado opcionalmente se puede utilizar en forma húmeda o se puede secar, mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización, hasta una forma seca. El precipitado seco tiene un alto contenido de proteína, superior aproximadamente al 60% en peso de proteína, preferiblemente al menos aproximadamente al 90% en peso de proteína (N x 6,25), y más preferiblemente al menos aproximadamente al 100% en peso (N x 6,25). El precipitado seco es bajo en contenido de ácido fítico, por lo general aproximadamente menor al 1,5% en peso.
- 40 El sobrenadante que resulta de la etapa de dilución se puede desechar o, si tiene una pureza suficiente, se seca para producir un producto de proteína de soja. Para disminuir el contenido de impurezas, el sobrenadante se puede procesar, con acidificación, por ejemplo a un pH de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,4, preferiblemente de aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 4,0, o sin acidificación y se seca mediante cualquier medio conveniente para producir uno o más productos de proteína de soja. La corriente de sobrenadante se enriquece en inhibidores de tripsina debido al fraccionamiento que se presenta en la dilución. El sobrenadante se puede procesar para producir un producto proteínico seco con alta actividad del inhibidor de tripsina o se pueden generar etapas de proceso para reducir la actividad del inhibidor de tripsina de la proteína derivada de esta corriente. Si se procesa sin acidificación, se puede emplear tratamiento con calor del sobrenadante antes o después de la concentración para precipitar una fracción de proteínas sensibles al calor, mientras que los inhibidores de tripsina permanecen en gran parte en solución. Alternativamente, se puede concentrar el sobrenadante a un pH bajo y luego se ajusta la muestra en el pH hasta aproximadamente 6 o aproximadamente 7, utilizando cualquier álcali conveniente, tal como hidróxido de sodio, antes de la aplicación del tratamiento con calor para precipitar las proteínas sensibles al calor. Tal tratamiento con calor se puede efectuar a una temperatura de aproximadamente 70°C hasta aproximadamente 120°C, preferiblemente de aproximadamente 75°C hasta aproximadamente 105°C
- 45
- 50
- 55

durante aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 30 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 15 minutos. Las proteínas precipitadas por calor se pueden remover en cualquier forma conveniente, tal como mediante centrifugación o filtración o una combinación de las mismas. El precipitado se pueden lavar luego con aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 2 volúmenes de agua para remover el sobrenadante atrapado, luego se recupera como anteriormente y se seca mediante cualquier medio conveniente para proporcionar un producto de proteína de soja con un contenido reducido del inhibidor de tripsina.

El tratamiento con calor del sobrenadante acidificado se puede utilizar para inactivar los inhibidores de tripsina termolábiles. La solución de proteína de soja acidificada parcialmente concentrada o totalmente concentrada también se puede tratar con calor para inactivar inhibidores de tripsina termolábiles. Generalmente, la solución de proteína se calienta a una temperatura de aproximadamente 70° hasta aproximadamente 120°C, preferiblemente de aproximadamente 85° hasta aproximadamente 95°C, durante aproximadamente 10 segundos hasta aproximadamente 60 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos. La solución de proteína de soja acidificada tratada con calor se puede enfriar a una temperatura de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente de aproximadamente 20° hasta aproximadamente 35°C para un procesamiento adicional.

El sobrenadante o el sobrenadante acidificado y tratado opcionalmente con calor o el concentrado resultante de la remoción de las proteínas depositadas mediante el tratamiento con calor del sobrenadante, el cual puede opcionalmente ser acidificado después de la remoción de la proteína precipitada, tal como a un pH de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,4, preferiblemente de aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 4,0, se puede concentrar para aumentar la concentración proteínica del mismo. Esta concentración se logra utilizando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas con un corte de peso molecular adecuado que permita especies de bajo peso molecular, incluyendo sal, carbohidratos, pigmentos, inhibidores de tripsina y otros materiales de bajo peso molecular extraídos del material fuente de proteína, para que pase a través de la membrana, mientras que se retiene una proporción significativa de la proteína de soja en la solución. Se pueden utilizar membranas de ultrafiltración que tengan un corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 a 1.000.000 de Daltons, preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta que se pueden utilizar diferentes materiales y configuración de membrana. La concentración de la solución de proteína de esta manera también reduce el volumen de líquido que se requiere secar para recuperar la proteína. La solución de proteína en general se concentra hasta una concentración de proteína de aproximadamente 50 g/L hasta aproximadamente 400 g/L, preferiblemente de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 250 g/L, antes de secar. Esta operación de concentración se puede llevar a cabo en un modo por lotes o en una operación continua, como se describió anteriormente.

La solución de proteína de soja se puede someter a una etapa de diafiltración, antes o después de la concentración completa, utilizando agua o una solución salina diluida. El agua o la solución salina diluida pueden estar a su pH natural o a un pH igual al de la solución de proteína que se someterá a diafiltración o a cualquier valor de pH entre los mismos. Esta diafiltración se puede llevar a cabo utilizando aproximadamente 2 hasta aproximadamente 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 volúmenes de solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, se remueven cantidades adicionales de contaminantes de la solución acuosa de proteína de soja clara mediante el paso a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración se puede llevar a cabo hasta que no haya cantidades significativas adicionales de contaminantes o esté presente un color visible en el permeado o hasta que la solución de proteína se haya purificado suficientemente de manera que, cuando se seca, proporciona un producto de proteína de soja con el contenido deseado de proteína, preferiblemente un aislado con un contenido de proteína superior al 90% en peso (N x 6,25) en b. s. Esta diafiltración se puede llevar a cabo utilizando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración se puede llevar a cabo utilizando una membrana separada con un diferente corte de peso molecular, tal como una membrana que tenga un corte de peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 1.000.000 de Daltons, preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuración de la membrana.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden llevar a cabo aquí de tal manera que el producto de proteína de soja recuperado posteriormente mediante secado del material retenido concentrado y sometido a diafiltración contiene aproximadamente menos del 90% en peso de proteína (N x 6,25) en b. s., tal como aproximadamente al menos el 60% en peso de proteína (N x 6,25) en b. s. Al concentrar parcialmente y/o al someter a diafiltración parcialmente la solución acuosa de proteína de soja, sólo es posible remover parcialmente los contaminantes. Esta solución de proteína se puede secar luego para proporcionar un producto de proteína de soja con menores niveles de pureza.

- En el medio de diafiltración puede estar presente un antioxidante 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 desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1% en peso, preferiblemente aproximadamente 0,05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier compuesto fenólico presente en la solución concentrada de proteína de soja.
- La etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional se pueden llevar a cabo a cualquier temperatura conveniente, en general desde aproximadamente 2° hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente desde aproximadamente 20° hasta aproximadamente 35°C, y durante el período de tiempo para llevar a cabo el grado deseado de concentración y diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas en cierta medida dependen del equipo de membrana empleado para llevar a cabo el procesamiento de membrana y la concentración deseada de proteína de la solución y la eficiencia de la remoción de contaminantes en el permeado.
- Las etapas de concentración y/o diafiltración se pueden operar de una manera favorable para la remoción de los inhibidores de tripsina en el permeado junto con los otros contaminantes. La remoción de los inhibidores de tripsina se promueve mediante el uso de una membrana de mayor tamaño de poro, tal como desde aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 1.000.000 de Daltons, operando la membrana a temperaturas elevadas, tales como 30° a 60°C, y empleando volúmenes mayores del medio de diafiltración, tales como por ejemplo 20 a 40 volúmenes.
- La acidificación y el procesamiento por membrana de la solución de proteína a un pH menor (1,5 a 3) también puede reducir la actividad del inhibidor de tripsina en relación con el procesamiento de la solución a un pH mayor (3 a 4,4) o sin acidificación. Cuando se concentra y somete a diafiltración la solución de proteína en el extremo inferior del intervalo de pH, puede ser conveniente aumentar el pH del material retenido antes del secado. El pH de la solución de proteína concentrada y diafiltrada se puede aumentar hasta el valor deseado, por ejemplo pH 3, mediante la adición de cualquier álcali de grado alimenticio conveniente, tal como hidróxido de sodio.
- Además, se puede alcanzar una reducción en la actividad del inhibidor de tripsina mediante la exposición de los materiales de soja a agentes reductores que rompen o reorganizan los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores adecuados incluyen, sulfito de sodio, cisteína y N- acetilcisteína.
- La adición de estos agentes reductores se puede llevar a cabo en diferentes etapas del proceso general. El agente reductor puede ser agregado al sobrenadante o se puede añadir el concentrado que surge a partir de una etapa de precipitación con calor, a la solución concentrada antes o después de la diafiltración o se puede mezclar en seco con el producto seco de proteína de soja. La adición del agente reductor se puede combinar con una etapa de tratamiento con calor y las etapas de procesamiento por membrana, como se describió anteriormente.
- Si se desea conservar los inhibidores de tripsina activos en la solución de proteína concentrada, esto se puede lograr mediante la eliminación o reducción de la intensidad de la etapa de tratamiento con calor, sin utilizar agentes reductores, operando las etapas de concentración y diafiltración a valores superiores de pH utilizando una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro menor, operando la membrana a temperaturas menores y empleando menores volúmenes del medio de diafiltración.
- La solución de proteína acuosa concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede tratar con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para remover los compuestos causantes de color y/o de olor. Este tratamiento con adsorbente se puede llevar a cabo bajo cualesquiera condiciones convenientes, en general, a temperatura ambiente de la solución de proteína. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0,025% hasta aproximadamente 5% en p/v, preferiblemente de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 2% en p/v. El adsorbente se puede remover de la solución de proteína de soja mediante cualquier medio adecuado, tal como mediante filtración.
- La solución acuosa de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede secar luego mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización. El producto de proteína de soja seca tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente 60% en peso (N x 6,25) en b. s., preferiblemente en un exceso de aproximadamente 90% en peso (N x 6,25) en b. s., más preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso, (N x 6,25) en b. s. El producto de proteína de soja es bajo en contenido de ácido fítico, por lo general aproximadamente menor al 1,5% en peso.
- Como se mencionó anteriormente, el precipitado de proteína sedimentada formado en la etapa de dilución se puede secar directamente para producir el producto de proteína. Alternativamente, el precipitado húmedo de proteína se puede volver a suspender en agua, tal como en aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3 volúmenes, y se vuelve a solubilizar al ajustar el pH de la muestra aproximadamente a 1,5 hasta aproximadamente 4,4, preferiblemente aproximadamente a 2,0 hasta aproximadamente 4,0, utilizando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico. La solución de proteína clara se puede secar luego mediante cualquier

técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización hasta una forma seca. El producto proteínico seco tiene un contenido de proteína superior aproximadamente al 60% en peso de proteína, preferiblemente aproximadamente al menos del 90% en peso de proteína, más preferiblemente aproximadamente al menos del 100% en peso de proteína (N x 6,25).

5 Como una alternativa adicional, la solución de proteína de soja clara, acidificada, nuevamente solubilizada se puede someter a un tratamiento con calor para inactivar cualquiera de los factores antinutricionales termolábiles residuales. Esta etapa de calentamiento también proporciona el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. En general, la solución de proteína se calienta a una temperatura de aproximadamente 70° hasta aproximadamente 120°C, preferiblemente aproximadamente 85° hasta aproximadamente 95°C, durante aproximadamente 10 segundos hasta
10 aproximadamente 60 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente 5 minutos. Luego se puede enfriar la solución de proteína de soja acidificada, tratada con calor, para un procesamiento adicional como se describirá más adelante, a una temperatura de aproximadamente 2° hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente de aproximadamente 20° hasta aproximadamente 35°C.

15 La solución clara, acidificada y tratada opcionalmente con calor se puede concentrar para aumentar la concentración de proteína de la misma. Esta concentración se lleva a cabo utilizando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas con un corte de peso molecular adecuado que permite especies de bajo peso molecular, incluyendo sal, carbohidratos, pigmentos, inhibidores de tripsina y otros materiales de bajo peso molecular extraídos del material fuente de proteína, para que pasen a través de la membrana, mientras se retiene una proporción significativa de la proteína de soja en la solución. Se pueden utilizar
20 membranas de ultrafiltración que tengan un corte de peso molecular de aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 1.000.000 de Daltons, preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuración de membrana. La concentración de la solución de proteína en esta forma también reduce el volumen de líquido requerido que se debe secar para recuperar la proteína. La solución de proteína generalmente se concentra hasta una concentración de proteína de
25 aproximadamente 50 g/L hasta aproximadamente 300 g/L, preferiblemente de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 g/L, antes del secado. Esta operación de concentración se puede llevar a cabo en un modo por lotes o de una operación continua, como se describió anteriormente.

30 La solución de proteína de soja se puede someter a una etapa de diafiltración antes o después de la concentración completa utilizando agua. El agua puede estar a su pH natural o a un pH igual al de la solución de proteína que se someterá a diafiltración o a cualquier valor de pH entre los mismos. Esta diafiltración se puede llevar a cabo utilizando aproximadamente 2 hasta aproximadamente 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente aproximadamente 5 hasta aproximadamente 25 volúmenes de solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, se remueven cantidades adicionales de contaminantes de la solución acuosa clara de proteína de soja mediante el paso a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración se puede llevar a cabo
35 hasta que no haya cantidades significativas adicionales de contaminantes o esté presente un color visible en el permeado o hasta que el material retenido haya sido purificado suficientemente de manera que, cuando se seca, proporciona un producto de proteína de soja con el contenido deseado de proteína, preferiblemente un aislado con un contenido de proteína de al menos 90% en peso (N x 6,25) en b. s. Esta diafiltración se puede llevar a cabo utilizando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, se puede llevar a
40 cabo la etapa de diafiltración utilizando una membrana separada con un diferente corte de peso molecular, tal como una membrana que tenga un corte de peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 1.000.000 de Daltons, preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuración de la membrana.

45 La etapa de concentración y la etapa de diafiltración se pueden llevar a cabo en la presente invención de tal manera que el producto de proteína de soja recuperado posteriormente mediante secado del material retenido concentrado y sometido a diafiltración contenga menos de aproximadamente 90% en peso de proteína (N x 6,25) en b. s., tal como al menos aproximadamente 60% en peso de proteína (N x 6,25) en b. s. Mediante concentración parcial y/o diafiltración parcial de la solución acuosa de proteína de soja, sólo es posible remover parcialmente los contaminantes. Esta solución de proteína puede ser luego secada para proporcionar un producto de proteína de soja con menores niveles de pureza. El producto de proteína de soja aún es capaz de producir soluciones claras de
50 proteína bajo condiciones ácidas.

En el medio de diafiltración puede estar presente un antioxidante 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
55 desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1% en peso, preferiblemente aproximadamente 0,05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier compuesto fenólico presente en la solución concentrada de proteína de soja.

- 5 La etapa opcional de concentración y la etapa opcional de diafiltración se pueden llevar a cabo a cualquier temperatura conveniente, en general desde aproximadamente 2° hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente desde aproximadamente 20° hasta aproximadamente 35°C, y durante el período de tiempo para llevar a cabo el grado deseado de concentración y diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas en alguna medida dependen del equipo de membrana empleado para llevar a cabo el procesamiento de membrana y la concentración deseada de proteína de la solución y la eficiencia de la remoción de contaminantes en el permeado.
- Como se mencionó anteriormente, se puede controlar el nivel de actividad del inhibidor de tripsina en el producto final de proteína de soja mediante la manipulación de diversas variables de proceso.
- 10 Como se observó anteriormente, el tratamiento con calor de la solución acuosa acidificada de proteína de soja se puede utilizar para inactivar los inhibidores de 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 tripsina termolábiles.
- 15 Además, las etapas de concentración y/o diafiltración se pueden operar de una manera favorable para la remoción de los inhibidores de tripsina en el permeado junto con los otros contaminantes. La remoción de los inhibidores de tripsina es promovida por la utilización de una membrana de tamaño de poro mayor, tal como de 30.000 a 1.000.000 de Daltons, operando la membrana a temperaturas elevadas, tales como 30° a 60°C, y empleando volúmenes mayores del medio de diafiltración, tal como de 20 a 40 volúmenes.
- 20 La acidificación y el procesamiento por membrana de la solución de proteína a un pH menor (1,5 a 3) puede reducir la actividad del inhibidor de tripsina en relación con el procesamiento de la solución a un pH mayor (3 a 4,4). Cuando la solución de proteína se concentra y se somete a diafiltración en el extremo inferior de la escala de pH, puede ser conveniente aumentar el pH del material retenido antes del secado. El pH de la solución de proteína concentrada y diafiltrada se puede aumentar al valor deseado, por ejemplo, pH 3, mediante la adición de cualquier álcali conveniente de grado alimenticio, tal como hidróxido de sodio.
- 25 Además, se puede lograr una reducción de la actividad del inhibidor de tripsina mediante la exposición de los materiales de soja a agentes reductores que rompen o reordenan los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores adecuados incluyen sulfito de sodio, cisteína y N-acetilcisteína.
- 30 La adición de estos agentes reductores se puede llevar a cabo en diversas etapas del proceso general. Se puede agregar el agente reductor al precipitado húmedo de proteína que resulta de la etapa de dilución, se puede agregar a la solución de proteína formada mediante la acidificación y resolubilización del precipitado, se pueden agregar a la solución concentrada antes o después de la diafiltración o se puede mezclar en seco con el producto seco de proteína de soja. La adición del agente reductor se puede combinar con una etapa de tratamiento con calor y las etapas de procesamiento por membrana, como se describió anteriormente.
- 35 Si se desea conservar los inhibidores de tripsina activos en la solución concentrada de proteína, esto se puede lograr mediante la eliminación o reducción de la intensidad de la etapa de tratamiento con calor, sin utilizar agentes reductores, operando las etapas de concentración y diafiltración en el extremo superior de la escala de pH (3 a 4,4), utilizando una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro menor, operando la membrana a temperaturas menores y empleando menores volúmenes del medio de diafiltración.
- 40 La solución de proteína acuosa clara acidificada concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede tratar con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para remover los compuestos causantes de color y/o de olor. Este tratamiento con adsorbentes se puede llevar a cabo bajo cualquier condición conveniente, en general a temperatura ambiente de la solución de proteína. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0,025% hasta aproximadamente 5% en p/v, preferiblemente aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 2% en p/v. El agente adsorbente se puede remover de la solución de proteína de soja mediante cualquier medio adecuado, tal como mediante filtración.
- 45 La solución de proteína acuosa clara acidificada opcionalmente concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede secar luego mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización. El producto de proteína de soja seco tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6,25) en b. s., preferiblemente aproximadamente mayor al 90% en peso (N x 6,25) en b. s., más preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso, (N x 6,25) en b. s. El producto de proteína de soja tiene un bajo contenido de ácido fólico, por lo general aproximadamente menor al 1,5% en peso.
- 50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la proteína precipitada tras la dilución en agua se puede procesar junto con el sobrenadante. En tal caso, el grado de dilución es generalmente de aproximadamente 1 a 25 veces, preferiblemente aproximadamente 3 hasta aproximadamente 12 veces. El agua con la cual se mezcla la

solución concentrada de proteína tiene una temperatura de aproximadamente 1° hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 35°C.

5 El agua para dilución, que contiene el precipitado de proteína depositado, se ajusta a un pH de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,4, preferiblemente aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 4,0, utilizando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico. La caída en el pH provoca la resolubilización de la proteína depositada mediante dilución produciendo una solución de proteína clara, acidificada. La solución de proteína se puede utilizar en forma húmeda o se puede secar, mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización, hasta una forma seca.

10 Como una alternativa adicional, la solución de proteína formada al acidificar la mezcla del precipitado de proteína y el sobrenadante se pueden procesar utilizando las mismas etapas descritas anteriormente para el precipitado aislado resolubilizado mediante acidificación.

15 La solución acuosa clara de proteína de soja opcionalmente concentrada, opcionalmente diafiltrada, opcionalmente tratada con calor, tratada con adsorbente opcional, se puede secar luego mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por aspersión o liofilización. El producto seco de proteína de soja tiene un contenido de proteína aproximadamente mayor al 60% en peso de proteína, preferiblemente aproximadamente al menos del 90% en peso, más preferiblemente aproximadamente del 100% en peso (N x 6,25) en b. s.

20 Los productos de proteína de soja producidos en la presente invención son solubles en un ambiente acuoso ácido, haciendo que el producto sea ideal para su incorporación en bebidas, tanto carbonatadas como sin carbonatar, para fortificarlas con proteína. Estas bebidas tienen un amplio rango de valores de pH ácido, que varían desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5. Los productos de proteína de soja proporcionados en la presente invención se pueden agregar a estas bebidas en cualquier cantidad conveniente para proporcionar fortificación con proteína para estas bebidas, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 g de proteína de soja por porción. El producto de proteína de soja agregado se disuelve en la bebida y no afecta la claridad de la bebida, incluso después del procesamiento térmico.

25 El producto de proteína de soja se puede mezclar con una bebida seca antes de la reconstitución de la bebida mediante disolución en agua. En algunos casos, puede ser necesaria una modificación de la formulación normal de las bebidas para tolerar la composición de la invención en donde los componentes presentes en la bebida pueden afectar negativamente la capacidad de la composición de la invención para permanecer disuelta en la bebida.

Ejemplos

30 Ejemplo 1:

Este ejemplo ilustra la producción de un aislado de proteína de soja, que es soluble, transparente y estable al calor en soluciones ácidas y se procesa por membrana a pH natural. La producción de este aislado no implica una etapa de dilución.

35 Se agregaron 20 kg de harina de soja desgrasada, procesada mínimamente con calor a 200 L de una solución de CaCl_2 0,15 M a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos para proporcionar una solución acuosa de proteína. Se removió la harina de soja residual y se clarificó la solución de proteína resultante mediante centrifugación y filtración para producir 169 L de solución de proteína filtrada que tiene un contenido de proteína de 1,68% en peso.

40 Se redujo en volumen la solución filtrada del extracto de proteína hasta 31 L mediante concentración en una membrana de PVDF con un corte de peso molecular de 5.000 Daltons. La solución concentrada de proteína se sometió a diafiltración con 62 L de CaCl_2 0,075M. La solución resultante de proteína diafiltrada, concentrada tenía un contenido de proteína del 13,28% en peso y representó un rendimiento del 95,2% en peso de la solución de proteína filtrada inicial. Se secó luego la solución de proteína diafiltrada, concentrada, para proporcionar un producto que se encontró que tenía un contenido de proteína de 91,45% (N x 6,25) en b. s. El producto se denominó S005-L11-08A S702.

45 Se preparó en agua una solución de proteína al 3,2% en p/v de S702 y se bajó el pH hasta 3 con HCl diluido. Se evaluó luego el color y la claridad utilizando un instrumento HunterLab ColorQuest XE operado en el modo de transmisión.

En la Tabla 1 a continuación se presentan los valores de color y claridad:

Tabla 1 - Valores por HunterLab para la solución de proteína al 3,2% de S005-L11-08A S702 a pH 3

Muestra	L*	a*	b*	turbidez (%)
S702	96,51	-0,82	11,45	0,8

Como se puede observar a partir de la Tabla 1, el color de la solución S702 a pH 3 fue muy claro y el nivel de turbidez fue bastante bajo.

- 5 También se evaluó el color del polvo seco con el instrumento HunterLab Color Quest XE en el modo de reflectancia. En la siguiente Tabla 2 se presentan los valores de color:

Tabla 2 - Valores por HunterLab para el polvo seco S005-L11-08A S702

Muestra	L*	a*	b*
S702	85,11	0,37	11,11

Como se puede observar a partir de la Tabla 2, el color del polvo de S702 seco fue muy claro.

- 10 Se determinó la actividad del inhibidor de tripsina del aislado utilizando el método de Kakade et al. Cereal Chem., 51: 376 - 381 (1974). Se encontró que el S005-L11-08A S702 tiene una actividad del inhibidor de tripsina de 87 unidades del inhibidor de tripsina (TIU)/mg de proteína (N x 6,25).

Ejemplo 2:

- 15 Este ejemplo contiene una evaluación de la estabilidad al calor en agua del aislado de proteína de soja producido mediante el método del Ejemplo 1 (S702).

- 20 Se produjo una solución de proteína al 2% en p/v de S005- L11-08A S702 en agua y se ajustó el pH a 3. Se evaluó la claridad de esta solución mediante la medición la turbidez con el instrumento HunterLab ColorQuest XE. Luego se calentó la solución a 95°C, se mantuvo a esta temperatura durante 30 segundos e inmediatamente después se enfrió a temperatura ambiente en un baño con hielo. Se midió nuevamente la claridad de la solución tratada con calor.

En la siguiente Tabla 3 se expone la claridad de la solución de proteína antes y después del calentamiento:

Tabla 3 - Efecto del tratamiento con calor sobre la claridad de la solución de S702

Muestra	turbidez (%)
antes del calentamiento	5,0
después del calentamiento	0,6

- 25 Como se puede observar a partir de los datos en la Tabla 3, la muestra era estable al calor. La solución de proteína inicialmente era muy clara y el tratamiento con calor redujo realmente el nivel de turbidez.

Ejemplo 3:

- 30 Este ejemplo contiene una evaluación de la solubilidad en agua de la proteína de soja aislada producida mediante el método del Ejemplo 1 (S702). Se analizó la solubilidad con base en la solubilidad de la proteína (denominado método de la proteína, una versión modificada del procedimiento de Morr et al., J. Food Sci. 50: 1715 - 1718) y la solubilidad total del producto (denominado método de sedimentación).

Se pesó en un vaso de precipitados suficiente proteína en polvo para suministrar 0,5 g de proteína y luego se añadió una pequeña cantidad de agua purificada por ósmosis inversa (OI) y se agitó la mezcla hasta que se formó una pasta suave. Se agregó luego agua adicional para llevar el volumen hasta aproximadamente 45 ml. Se agitó luego lentamente el contenido del vaso de precipitados durante 60 minutos utilizando un agitador magnético. Se determinó el pH inmediatamente después de la dispersión de la proteína y se ajustó al nivel adecuado (2, 3, 4, 5, 6 o 7) con NaOH o HCl diluido. También se preparó una muestra a pH natural. Para las muestras con pH ajustado, se midió el pH y se corrigió dos veces durante los 60 minutos de agitación. Después de los 60 minutos de agitación, se llevaron las muestras hasta un volumen total de 50 ml con agua tratada por OI, proporcionando una dispersión de proteína al 1% en p/v. El contenido de proteína de las dispersiones se midió utilizando un determinador de nitrógeno Leco FP528. Luego se transfirieron alícuotas (20 ml) de las dispersiones a tubos de centrifuga pesados previamente que se habían secado durante la noche en un horno a 100°C, luego se enfriaron en un desecador y se taparon los tubos. Se centrifugaron las muestras a 7800 g durante 10 minutos, lo cual sedimentó el material insoluble y produjo un sobrenadante translucido. Se midió el contenido de proteína del sobrenadante mediante análisis por Leco y luego se desecharon el sobrenadante y las tapas del tubo y se secó el material sedimentado durante la noche en un horno programado a 100°C. A la mañana siguiente, se transfirieron los tubos a un desecador y se dejaron enfriar. Se registró el peso del material sedimentado seco. Se calculó el peso seco del polvo de proteína inicial multiplicando el peso del polvo utilizado por un factor de $((100 - \text{contenido de humedad del polvo (\%)})/100)$. Se calculó luego la solubilidad del producto de dos formas diferentes:

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

2) Solubilidad (método de sedimentación) (%) = $(1 - (\text{peso seco del material sedimentado insoluble} / ((\text{peso de 20 ml de la dispersión} / \text{peso de 50 ml de la dispersión}) \times \text{peso inicial del polvo de proteína seca}))) \times 100$

En la tabla 4 se muestra el valor de pH natural del aislado de proteína producido en el Ejemplo 1 en agua (1% de proteína):

Tabla 4 - Ph natural de la solución de S702 preparada en agua con 1% de proteína

Lote	Producto	pH natural
S005-L11-08A	S702	5,91

En las siguientes Tablas 5 y 6 se presentan los resultados de solubilidad obtenidos:

Tabla 5 - Solubilidad de S702 a diferentes valores de pH con base en el método de la proteína

		Solubilidad (método de la proteína) (%)						
Lote	Producto	pH 2	pH 3	pH4	pH 5	pH 6	pH 7	pH nat.
S005-L11-08A	S702	98,2	95,8	100	94,2	15,1	11,2	10,9

Tabla 6 - Solubilidad de S702 a diferentes valores de pH con base en el método de sedimentación

		Solubilidad (método de la proteína) (%)						
Lote	Producto	pH 2	pH3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH nat.
S005-L11-08A	S702	98,5	100	97,3	26,6	10,2	32,0	28,3

Como se puede observar a partir de los resultados de las Tablas 5 y 6, los productos S702 fueron muy solubles en el intervalo de pH de 2 a 4.

Ejemplo 4

Este ejemplo contiene una evaluación de la claridad en agua del aislado de proteína de soja producido mediante el método del Ejemplo 1 (S702).

5 Se evaluó la claridad de la solución de proteína al 1% en p/v preparada como se describe en el Ejemplo 3 midiendo la absorbancia a 600 nm, con un puntaje 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 turbidez porcentual, otra medida de la claridad.

En las siguientes Tablas 7 y 8 se presentan los resultados de claridad:

Tabla 7 - Claridad de la solución de S702 a diferentes valores de pH según lo evaluado mediante A600

Lote	Producto	A600						
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH7	Nat. pH
S005-L11-08A	S702	0,012	0,019	0,094	>3,0	2,201	2,422	2,283

10

Tabla 8 - Claridad de la solución S702 a diferentes valores de pH según lo evaluado mediante análisis por HunterLab

Lote	Producto	Lectura de turbidez por HunterLab (%)						
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH nat.
S005-L11-08A	S702	0,0	2,2	16,0	97,3	97,6	100,1	101,9

15 Como se puede observar a partir de los resultados de las Tablas 8 y 9, las soluciones de S702 eran muy claras a pH 2 y 3, pero fueron ligeramente turbias a pH 4.

Ejemplo 5:

20 Este ejemplo contiene una evaluación de la solubilidad en una bebida no alcohólica (Sprite) y una bebida deportiva (Gatorade sabor de naranja) del aislado de proteína de soja producido mediante el método del Ejemplo 1 (S702). La solubilidad se determinó con la proteína agregada a las bebidas sin corrección del pH y nuevamente con el pH de las bebidas fortificadas con proteína, ajustado al nivel de las bebidas originales.

25 Cuando se evaluó la solubilidad sin corrección del pH, se pesó una cantidad suficiente de proteína en polvo en un vaso de precipitados para suministrar 1 g de proteína y se agregó una pequeña cantidad de bebida y se agitó hasta que se formó una pasta suave. Se agregó bebida adicional para llevar el volumen a 50 ml, y luego se agitaron lentamente las soluciones en un agitador magnético durante 60 minutos para producir una dispersión de proteína al 2% en p/v. Se analizó el contenido de proteína de las muestras utilizando un determinador de nitrógeno LECO FP528, luego se centrifugó una alícuota de cada una de las bebidas que contienen proteína a 7800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante en cada muestra.

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

30 Cuando se evaluó la solubilidad con corrección del pH, se midió el pH de la bebida no alcohólica (Sprite) (3,39) y la bebida deportiva (Gatorade sabor de naranja) (3,19), sin proteína. Se pesó una cantidad suficiente de proteína en polvo en un vaso de precipitados para suministrar 1 g de proteína y se agregó una pequeña cantidad de bebida y se agitó hasta que se formó una pasta suave. Se agregó bebida adicional para llevar el volumen a 45 ml, y luego se agitaron lentamente las soluciones en un agitador magnético durante 60 minutos. Se midió el pH de las bebidas que contenían proteína y luego se ajustó al pH original sin proteína con HCl o NaOH según fuera necesario. Se llevó el volumen total de cada solución hasta 50 ml con bebida adicional, para producir una dispersión de proteína al 2% en p/v. Se analizó el contenido de proteína de las muestras utilizando un determinador de nitrógeno LECO FP528,

35

ES 2 519 567 T3

luego se centrifugó una alícuota de cada una de las bebidas que contienen proteína a 7800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante en cada muestra.

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

En la Tabla 9 a continuación se presentan los resultados obtenidos:

5 Tabla 9 - Solubilidad de S702 en Sprite y Gatorade sabor de naranja

Lote	Producto	sin corrección del pH		con corrección del pH	
		Solubilidad (%) en Sprite	Solubilidad (%) en Gatorade sabor de naranja	Solubilidad (%) en Sprite	Solubilidad (%) en Gatorade sabor de naranja
S005- L11-08A	S702	100	100	96,4	100

Como se puede observar a partir de los resultados de la Tabla 9, la proteína S702 era extremadamente soluble tanto en la Sprite como en el Gatorade sabor de naranja. Obsérvese que la S702 es un producto a pH neutro aunque el pH ligeramente mayor de las muestras de bebida sin corregir parece que no afectó negativamente la solubilidad.

10 Ejemplo 6:

Este ejemplo contiene una evaluación de la claridad en una bebida no alcohólica y una bebida deportiva del aislado de proteína de soja producido mediante el método del Ejemplo 1 (S702).

Se evaluó la claridad de las dispersiones de proteína al 2% en p/v preparadas en una bebida no alcohólica (Sprite) y una bebida deportiva (Gatorade sabor de naranja) en el Ejemplo 5 utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 4. Para las mediciones de absorbancia a 600 nm, se estandarizó el espectrofotómetro utilizando como blanco la bebida adecuada antes de realizar la medición.

15

En las Tablas 10 y 11 a continuación se presentan los resultados obtenidos:

Tabla 10 - Claridad (A600) de S702 en Sprite y Gatorade sabor de naranja

Lote	Producto	sin corrección de pH		con corrección del pH	
		A600 en Sprite	A600 en Gatorade sabor de naranja	A600 en Sprite	A600 en Gatorade sabor de naranja
S005-L11-08A	S702	0,209	0,520	0,158	0,204

20 Tabla 11 - Lecturas de turbidez en un HunterLab para S702 en Sprite y Gatorade sabor de naranja

Lote	Producto	sin corrección de pH		con corrección del pH	
		turbidez (%) en Sprite	turbidez (%) en Gatorade sabor de naranja	turbidez (%) en Sprite	turbidez (%) en Gatorade sabor de naranja
sin proteína		0,0	44,0	0,0	44,0
S005- L11-08A	S702	35,7	80,8	32,6	65,6

Como se puede observar a partir de los resultados de las Tablas 10 y 11, a pesar de la excelente solubilidad, las muestras de Sprite y Gatorade sabor de naranja que contienen S702 eran algo turbias. La corrección del pH redujo el nivel de turbidez sólo ligeramente.

Ejemplo 7:

5 Este ejemplo se llevó a cabo para extraer la fuente de proteína de soja con una solución de cloruro de calcio a diferentes valores de pH.

10 Se extrajeron tres muestras de harina de soja desgrasada procesada mínimamente con calor (10 g cada una) con CaCl₂ 0,15 M (100 ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente con un agitador magnético / barra de agitación. Se extrajo una muestra a pH natural, se ajustó una muestra a pH 2,98 con HCl diluido y se ajustó la tercera muestra a pH 8,55 con NaOH diluido. Se ajustó el pH de los sistemas de extracción inmediatamente después de humedecer la harina. Después de la extracción, se centrifugaron las muestras a 10.200 g durante 10 minutos para separar el extracto de la harina agotada. Se clarificó adicionalmente el sobrenadante mediante filtración a través de un filtro de jeringa con tamaño de poro de 0,45 µm. Los filtrados se analizaron con respecto al pH, conductividad, claridad (A600) y el contenido de proteína (Leco). Se diluyó también una muestra de filtrado 1:1 con un volumen igual de agua tratada mediante OI y se midió nuevamente el A600. Se acidificaron las muestras del filtrado diluido y sin diluir a pH 3 con HCl diluido y se midió nuevamente el A600.

En la Tabla 12 a continuación se presentan las propiedades de los filtrados obtenidos:

Tabla 12 - Propiedades de los extractos iniciales

muestra	A600	% de proteína	Extractabilidad (%)	cond. (mS)
pH natural	0,072	3,00	55,2	22,9
pH 2,98	0,109	3,88	71,5	27,9
pH 8,55	0,139	3,46	63,7	23,0

20 Como se puede observar en la Tabla 12, las condiciones de pH bajo extrajeron la mayor cantidad de proteína. Sin embargo, la extractabilidad fue muy buena en todas las condiciones evaluadas de pH.

En la Tabla 13 a continuación se expone la claridad de los extractos de fuerza total, acidificados:

Tabla 13 - Efecto de la acidificación sobre la claridad de los extractos de fuerza total

muestra	pH inicial	pH final	A600 final
pH natural	5,44	2,94	0,052
pH 2,98	3,10	3,10	0,109
pH 8,55	8,18	2,78	0,140

25 Como se puede observar a partir de la Tabla 13, después de la acidificación, todos los extractos eran bastante translucidos, pero la muestra extraída a pH natural era la más clara.

En la Tabla 14 a continuación se expone la claridad de los extractos diluidos, acidificados:

Tabla 14 - Efecto de la acidificación sobre la claridad de los extractos diluidos

muestra	pH inicial	A600 inicial	pH final	A600 final
pH natural	5,53	2,582	2,93	0,046
pH 2,98	3,22	0,056	2,81	0,050
pH 8,55	8,14	2,756	3,05	0,112

5 Como puede observarse a partir de la Tabla 14, cuando las muestras se diluyeron 1:1 con agua y se acidificaron, todas las muestras nuevamente fueron bastante claras. Sin embargo, la claridad de las muestras extraídas a pH natural y ácido fue mejor que la muestra extraída a pH alto.

Ejemplo 8:

Este ejemplo ilustra la producción de proteína de soja que es soluble, transparente y estable al calor en soluciones ácidas y se procesa en membrana a pH natural, luego se fracciona mediante una etapa de dilución.

10 Se agregaron 'a' kg de soja 'b' a 'c' L de solución de CaCl₂ 0,15 M a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos para proporcionar una solución acuosa de proteína. Se removió la fuente de proteína de soja residual y se clarificó la solución de proteína resultante mediante centrifugación y filtración para producir 'd' L de solución de proteína filtrada que tiene un contenido de proteína de 'e' % en peso.

15 Se redujeron 'f' L de la solución del extracto de proteína a 'g' en una membrana 'h' que tiene un corte de peso molecular de 'i' Daltons, produciendo una solución concentrada de proteína con un contenido de proteína de 'j' % en peso. La solución concentrada de proteína se sometió luego a diafiltración con 'k' L de solución de CaCl₂ 0,15M en la misma membrana utilizada para la etapa de concentración inicial. Se concentró adicionalmente la solución de proteína diafiltrada hasta 'l' kg en la misma membrana utilizada para las etapas iniciales de concentración y diafiltración, produciendo una solución concentrada de proteína con un contenido de proteína de 'm' % en peso.

20 Se diluyeron luego 'n' kg de la solución de proteína concentrada o concentrada y diafiltrada a 'o' °C hasta 'p' en agua purificada por ósmosis inversa (OI) que tenía una temperatura de 'q' °C. Se formó inmediatamente una nubosidad blanca y se dejó sedimentar. Se removió el sobrenadante mediante centrifugación y se recuperó la proteína precipitada con un rendimiento de 'r' % en peso de la solución de proteína filtrada. Se lavaron luego los 's' kg recuperados del precipitado de proteína con aproximadamente 't' volúmenes de agua y se decantó el agua. Se resolubilizaron luego 'u' del precipitado lavado en aproximadamente 'v' volúmenes de agua con la adición de suficiente ácido clorhídrico diluido para ajustar el pH de la muestra a 'w'. Se agregaron 'x' kg adicionales de agua tratada mediante OI a pH 3 para adelgazar el precipitado resolubilizado para facilitar el secado por aspersion. Luego se secaron por aspersion 'y' kg del precipitado resolubilizado. Se encontró que la proteína seca tenía un contenido de proteína de 'z' % (N x 6,25) en b. s. Al producto se le dio la denominación de 'aa' S7300. Se calentaron otros 'ab' kg de la fracción del precipitado resolubilizado a 90°C durante 1 minuto y luego se diluyó con aproximadamente 'ac' L de agua tratada por ósmosis inversa para facilitar el secado por aspersion. Se encontró que la proteína seca tenía un contenido de proteína de 'ad' % (N x 6,25) en b. s. Al producto se le dio la denominación de 'aa' S7300H. El otro 'ae' del precipitado lavado se resolubilizó en aproximadamente 'af' volúmenes de agua con suficiente ácido fosfórico diluido agregado para ajustar el pH de la muestra a 'ag'. Se secaron luego por aspersion 'ah' kg de la fracción precipitada resolubilizada. Se encontró que la proteína seca tenía un contenido de proteína de 'ai' % (N x 6,25) en b. s. Al producto se le dio la denominación de 'aa' S7300-02. En la Tabla 15 a continuación se muestran 1os parámetros dese 'a' hasta 'ai'.

Tabla 15 - Parámetros para las corridas para producir productos de S7300

aa	S005-C19-09A	S013-J06-09A	S013-J27-09A	S013/15-K30-09A
a	20	50	40	40
b	harina (desgrasada, procesada con calentamiento mínimo)	hojuela blanca	hojuela blanca	hojuela blanca

ES 2 519 567 T3

(continuación)

c	200	500	400	400
d	172,9	276,4	325	330
e	2,25	2,47	2,44	2,38
f	172,9	275	325	330
g	19,7 kg	25,48 kg	22 kg	67 L
h	PES	PES	PES	PES
i	100.000	100.000	100.000	100.000
j	16,36	22,06	no se determinó	9,74
k	n/a	n/a	n/a	335
l	n/a	n/a	n/a	23,2
m	n/a	n/a	n/a	23,7
n	19,7	25	22	22,7
o	31,5	27	25,2	30
p	1:10	1:15	1:15	1:15
q	2,4	17,3	14,9	13
r	61,7	67,1	57,1	53,6
s	5,01	8,26	9,78	10,7
t	0	2	2	2
u	toda	toda	la mitad	toda
v	1	2	2	1,7
w	1,97	3,20	2,81	3
x	8,5	0	0	0
y	18,5	11,36	16,2	26
z	98,76	101,74	100,92	100,73
ab	n/a	12,57	n/a	n/a
ac	n/a	26	n/a	n/a
ad	n/a	101,60	n/a	n/a

(continuación)

ae	n/a	n/a	la mitad	n/a
af	n/a	n/a	2	n/a
ag	n/a	n/a	2,76	n/a
ah	n/a	n/a	12,4	n/a
ai	n/a	n/a	94,32	n/a
n/a = no aplicable				

5 Se prepararon soluciones de proteína al 3,2% en agua de los productos S7300, S7300H y S7300-02 y se evaluaron el color y la claridad utilizando un instrumento HunterLab ColorQuest XE operado en el modo de transmisión. Se midió el pH de las soluciones con un medidor de pH.

En la siguiente Tabla 16 se presentan los valores de pH, color y claridad.

Tabla 16 - Valores de pH y HunterLab para soluciones de proteína al 3,2% de S7300, S7300H y S7300-02

lote	muestra	pH	L*	a*	b*	turbidez (%)
S005-C19-09A	S7300	2,27	97,10	-1,88	11,04	0,0
S013-J06-09A	S7300	3,01	95,08	-0,67	10,08	7,4
S013-J06-09A	S7300H	2,99	88,50	-0,29	9,00	42,4
S013-J27-09A	S7300	2,72	92,50	-0,60	10,17	29,6
S013-J27-09A	S7300-02	2,75	91,94	-0,23	9,51	36,3
S013/15-K30-09A	S7300	2,92	95,90	-0,44	8,01	10,4

10 Como se puede observar por los resultados de la Tabla 16, el pH del producto S005-C19-09A terminó siendo menor que el pH objetivo de 3. Esto se podría remediar al agregar simplemente menos ácido cuando se resolubiliza el precipitado. Por lo general, estos productos produjeron soluciones ligeramente coloreadas con altos grados de transparencia. Los valores de turbidez obtenidos para la solución de la muestra S7300H lote S013-J06-09A y las soluciones de los productos S013- J27-09A fueron sorprendentemente altos. Se cree que la turbidez presente en estas muestras puede haber surgido de alguna dificultad en el proceso de secado por aspersion. Las corrientes de alimentación para estas muestras que ingresan en el secador por aspersion eran muy claras según la evaluación de acuerdo a la medición A600 (datos no mostrados). Cuando se evaluaron nuevamente las mismas soluciones de proteína al 3,2% en p/v de los productos S7300 en el HunterLab, una hora después de la preparación, las soluciones eran notablemente más claras como se expone en la Tabla 17 a continuación.

20 Tabla 17 - Valores de pH y HunterLab para las soluciones de proteína al 3,2% de S7300, S7300H y S7300-02 con la medición realizada una hora después de la preparación de la solución

lote	muestra	L*	a*	b*	turbidez (%)
S013-J06-09A	S7300H	93,15	-0,40	9,13	22,8
S013-J27-09A	S7300	95,27	-0,80	9,62	10,0
S013-J27-09A	S7300-02	94,63	-0,46	8,95	18,1

También se evaluó el color de los polvos secos con el HunterLab en el modo de reflectancia. En la Tabla 18 a continuación se presentan los valores de color.

Tabla 18 - Valores por HunterLab para los polvos secos S7300, S7300H y S7300-02

lote	muestra	L*	a*	b*
S005-C19-09A	S7300	86,43	-1,91	12,70
S013-J06-09A	S7300	87,38	-1,09	10,61
S013-J06-09A	S7300H	88,81	-0,82	8,00
S013-J27-09A	S7300	88,11	-1,04	11,97
S013-J27-09A	S7300-02	88,09	-0,73	11,31
S013/15-K30-09A	S7300	88,17	-0,70	10,19

5 Como se puede observar a partir de la Tabla 18, los productos secos son de color muy claro.

Se determinó la actividad del inhibidor de tripsina de los productos S7300 utilizando el método de Kakade et al. Cereal Chem., 51: 376 - 381 (1974). En la Tabla 19 a continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 19 - Actividad del Inhibidor de Tripsina (TIA) para S7300, S7300H y S7300-02 en TIU/mg de proteína (N x 6,25)

lote	muestra	TIA
S005-C19-09A	S7300	49
S013-J06-09A	S7300	11,8
S013-J06-09A	S7300H	3,1
S013-J27-09A	S7300	37,7
S013-J27-09A	S7300-02	36,6
S013/15-K30-09A	S7300	47,5

10

Como se puede observar a partir de la Tabla 19, los productos preparados a partir del precipitado después de la dilución de la solución concentrada de proteína tuvieron una menor actividad de tripsina de la encontrada en el Ejemplo 1 para un producto (S702), preparado de forma similar, pero sin la etapa de dilución. El valor del lavado del precipitado con agua antes de la resolubilización y el secado no es claro con base en la variabilidad en los resultados. Se obtuvo una TIA muy baja mediante el tratamiento con calor de la proteína precipitada resolubilizada. La comparación de los resultados de la Tabla 19 con los valores de actividad del inhibidor de tripsina para los sobrenadantes a partir de las mismas etapas de dilución ilustra que la dilución fracciona la proteína precipitada más allá de los inhibidores de tripsina. En la Tabla 20 se muestran las actividades del inhibidor de tripsina de los sobrenadantes.

15

ES 2 519 567 T3

Tabla 20 - Actividad del inhibidor de tripsina (TIA) para los sobrenadantes sin procesar en TIU/mg de proteína (N x 6,25)

lote	TIA
S005-C19-09A	no se determinó
S013-J06-09A	294,0
S013-J27-09A	219,2
S013/15-K30-09A	272,6

5 Como se puede observar a partir de la Tabla 20, la TIA de los sobrenadantes fue notablemente mayor que la de los productos derivados precipitados.

Ejemplo 9:

Este ejemplo ilustra los métodos de procesamiento de las corrientes de sobrenadante que surgen de los procedimientos del Ejemplo 8 para formar productos de proteína de soja adicionales.

10 El pH del sobrenadante de la etapa de dilución se ajustó desde 'a' hasta 'b' mediante la adición de HCl diluido. Se redujeron luego 'c' L del sobrenadante hasta 'd' kg en una membrana 'e' con un corte de peso molecular de 'f' Daltons. La solución concentrada de proteína tenía una concentración de proteína de 'g' % en peso. Con la proteína adicional recuperada a partir del sobrenadante, la recuperación total de la solución de proteína filtrada fue de 'h' %.

15 Se secaron por aspersión 'i' kg del sobrenadante concentrado para formar un producto con un contenido de proteína de 'j' (N x 6,25) en b. s. Al producto se le dio la denominación de 'k' S7200. Se ajustaron 'l' kg del sobrenadante concentrado a un pH 'm' con una solución de hidróxido de sodio diluido. Luego se trataron con calor 'n' kg del sobrenadante concentrado a 85°C durante 10 minutos, lo que precipitó aproximadamente 'o' % de la proteína asociada con el sobrenadante concentrado. Se recuperaron 'p' kg de la proteína precipitada mediante centrifugación y se lavó con aproximadamente 'q' volúmenes de agua tratada por OI, luego se recuperó nuevamente mediante centrifugación. Se liofilizaron 'r' kg del precipitado lavado para formar un producto con un contenido de proteína de

20 's' % (N x 6,25) en b. s. Este producto se denominó 'k' S7200P. Se filtró el concentrado que contenía la proteína no precipitada mediante tratamiento con calor y luego se seco mediante aspersión para formar un producto con un contenido de proteína de 't' % (N x 6,25) en b. s. Este producto se denominó 'k' S7200H. En la Tabla 21 a continuación se establecen los parámetros 'a' hasta 't'.

25 Tabla 21 - Parámetros para la producción de productos S7200 a partir de los sobrenadantes de la dilución preparados como se muestra en el Ejemplo 8

k	S005-C19-09A	S013-J06-09A	S013-J27-09A	S013/15-K30-09A
a	6,26	5,66	5,74	5,82
b	3,16	n/a	1,96	n/a
c	200	370	355	335
d	5,34	19,96	20	19,74
e	PES	PES	PES	PES
f	10.000	100.000	100.000	100.000
g	7,32	3,34	3,77	3,30

(continuación)

h	71,7	76,9	66,6	61,9
i	5,34	n/a	n/a	n/a
j	91,66	n/a	n/a	n/a
l	n/a	n/a	19,3	n/a
m	n/a	n/a	6,57	n/a
n	n/a	19,96	19,3	19,74
o	n/a	61,2	71,6	69,2
p	n/a	2,42	3,08	2,58
q	n/a	0	2	2
r	n/a	2,06	2,70	2,14
s	n/a	99,78	98,06	101,61
t	n/a	81,49	70,24	no se determinó
n/a = no aplicable				

5 Se prepararon soluciones de proteínas al 3,2% en agua de los productos S7200 y S7200H y se evaluó el color y claridad utilizando un instrumento HunterLab 5 ColorQuest XE operado en el modo de transmisión. Se midió el pH de las soluciones con un medidor de pH. El S7200P fue poco soluble y por tanto no se analizó el color ni la claridad de esta muestra.

En la Tabla 22 a continuación se presentan los valores de pH, color y claridad.

Tabla 22 - Valores de pH y de HunterLab para soluciones de proteína al 3,2% de S7200 y S7200H

lote	muestra	pH	L*	a*	b*	turbidez (%)
S005-C19-09A	S7200	3,04	95,86	-1,07	9,95	3,4
S013-J06-09A	S7200H	5,80	95,82	-1,36	11,44	42,9
S013-J27-09A	S7200H	6,24	96,18	-0,93	9,82	23,9
S013/15-K30-09A	S7200H			no se determinó		

10 Como se puede observar a partir de la Tabla 22, todos los productos derivados del sobrenadante produjeron soluciones ligeramente coloreadas. Sin embargo, los productos S013-J06-09A y S013-J27-09A eran más turbios que el producto S005-C19-09A. Esta diferencia puede ser atribuida a muchos factores diferentes tales como diferencias en el pH, el procesamiento y la fuente de proteína de soja. Sin embargo, los problemas del secado por aspersión mencionados en el Ejemplo 8 pueden haber jugado un papel importante. Los concentrados derivados de la remoción de la proteína depositada por calor a partir del sobrenadante concentrado se filtraron y quedaron bastante claros según se evaluaron mediante la medición A600 antes de la etapa de secado.

15

También se evaluó el color de los polvos secos con el instrumento HunterLab en el modo de reflectancia. En la Tabla 23 a continuación se presentan los valores de color.

Tabla 23 - Valores por HunterLab para polvos secos S7200 y S7200H

lote	muestra	L*	a*	b*
S005-C19-09A	S7200	87,30	-0,21	8,13
S013-J06-09A	S7200H	86,99	-0,34	8,47
S013-J27-09A	S7200H	85,97	-0,22	7,20
S013/15-K30-09A	S7200H	no se determinó		

5 Como se puede observar a partir de la Tabla 23, los productos secos eran de color muy claro.

Se determinó la actividad del inhibidor de tripsina de los productos derivados del sobrenadante utilizando el método de Kakade et al. Cereal Chem., 51: 376 - 381 (1974). En la Tabla 24 a continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 24 - Actividad del inhibidor de tripsina (TIA) para S7200, S7200P y S7200H en TIU/mg de proteína (N x 6,25)

lote	muestra	TIA
S005-C19-09A	S7200	482
S013-J06-09A	S7200P	78,6
S013-J27-09A	S7200P	8,7
S013/15-K30-09A	S7200P	40,1
S013-J06-09A	S7200H	296,7
S013-J27-09A	S7200H	209,8
S013/15-K30-09A	S7200H	no se determinó

10

Como se puede observar a partir de la Tabla 24, los productos S7200P tenían actividades del inhibidor de tripsina notablemente inferiores que los productos S7200H. Esto sugiere que los inhibidores de tripsina permanecieron solubles cuando se fraccionó el sobrenadante concentrado mediante precipitación inducida por calor. Se obtuvieron valores inferiores de TIA para el S7200P cuando se lavó el precipitado de proteína con agua antes del secado. El valor particularmente bajo obtenido para la muestra S7200P del lote S013-J27-09A también puede estar relacionado con el régimen de pH empleado en el ensayo.

15

Ejemplo 10:

Este ejemplo ilustra la producción de aislado de proteína de soja que es soluble, transparente y estable al calor en soluciones ácidas que emplean el procesamiento por membrana a pH natural y una etapa de dilución, pero las fracciones de proteína no se separan después de la dilución.

20

Se diluyeron 'a' ml del material retenido sometido a diafiltración y concentrado del proceso de S013/S015-K30-09A ejecutado, preparado como se describe en el Ejemplo 8, a aproximadamente 'b' °C con 'c' ml de agua tratada por OI a aproximadamente 'd' °C. Se formó una nubosidad blanca pero cuando se redujo el pH de la muestra hasta 'e' con HCl diluido, se resolubilizó la proteína. El contenido de proteína de la solución diluida y acidificada fue de 'f' % en peso. Se redujo la solución de proteína diluida y acidificada desde un volumen de 'g' ml hasta aproximadamente 'h' g

25

5 en una membrana 'i' con un corte de peso molecular de 'j' Daltons, proporcionando una solución concentrada de proteína con un contenido de proteína de 'k' % en peso. Después de retirar una pequeña muestra de la solución concentrada de proteína para análisis, se liofilizaron 'l' g de la solución concentrada de proteína para proporcionar 'm' g de un producto denominado 'n' S7301-01, que tenía un contenido de proteína de 'o' % en peso en b. h. Los restantes 'p' ml de la solución concentrada de proteína se sometieron a diafiltración con 'q' ml de agua tratada por OI en la misma membrana que se utilizó para la etapa de concentración. Se obtuvieron un total de 'r' g de la solución de proteína diafiltrada y concentrada, con un contenido de proteína de 's' % en peso. Se liofilizaron 't' g de esta solución para producir 'u' g de un producto denominado 'n' S7301-02, que tenía un contenido de proteína de 'v' % en b. h. En la Tabla 25 a continuación se muestran los parámetros 'a' hasta 'v'.

10

Tabla 25 - Parámetros para la producción de productos S7301

n	ensayo 1	ensayo 2
a	250	120
b	20	24
c	750	1320
d	22	22
e	3,16	3,06
f	6,35	2,27
g	980	1422
h	492	257
i	PES	PES
j	10.000	10.000
k	12,12	11,40
l	218,92	114,12
m	26,86	12,03
o	91,27	99,69
p	250	120
q	1250	120
r	223,42	119,70
s	12,85	11,17
t	198,80	105,02
u	25,83	10,78
v	95,19	100,40

Se prepararon soluciones de proteína al 3,2% en agua de los productos S7301 y se evaluó el color y la claridad mediante un instrumento HunterLab ColorQuest XE operado en el modo de transmisión.

En la Tabla 26 a continuación se presentan los valores de color y claridad.

Tabla 26 - Valores por HunterLab para las soluciones de proteína al 3,2% de S7301-01 y S7301-02

lote	muestra	L*	a*	b*	turbidez (%)
ensayo 1	S7301-01	93,67	-0,21	9,93	15,7
ensayo 1	S7301-02	94,13	-0,01	8,74	13,4
ensayo 2	S7301-01	94,76	-0,19	8,41	15,9
ensayo 2	S7301-02	94,78	-0,13	8,36	15,5

5 Como se puede observar a partir de la Tabla 26, todas las soluciones de S7301 tenían color claro y valores de turbidez muy bajos. Las muestras de S7301-02, que se sometieron a diafiltración, eran más claras, menos verdes, menos amarillas y más claras que las muestras de S7301-01, que no se sometieron a diafiltración. Este efecto de diafiltración fue más pronunciado en el ensayo 1, donde el volumen de dilución inicial era menor y se emplearon más volúmenes de diafiltración. Sin embargo, las muestras del ensayo 2, que tenían un volumen de dilución mayor y sólo un volumen de diafiltración eran más claras en general, menos amarillas y con un contenido mayor de proteína.

10 **Ejemplo 11:**

Este ejemplo contiene una evaluación de la estabilidad al calor en agua de los aislados de proteína de soja producidos mediante los métodos del Ejemplo 8 (S7300) y el Ejemplo 10 (S7301).

15 Se produjeron soluciones de proteína al 2% en p/v en agua de la muestra S7300 del lote S013/15-K30-09A y S7301-02 del ensayo 1, y se fijó el pH en 3 con HCl. Se evaluó la claridad de las soluciones mediante la medición de la turbidez con el instrumento HunterLab ColorQuest XE. Se calentaron luego las soluciones a 95°C, se mantuvieron a esta temperatura durante 30 segundos e inmediatamente después se enfriaron a temperatura ambiente en un baño con hielo. Se midió luego nuevamente la claridad de las soluciones tratadas con calor.

En la Tabla 27 a continuación se presenta la claridad de las soluciones de proteína antes y después del calentamiento:

20 Tabla 27 - Efecto del tratamiento con calor sobre la claridad de las soluciones de S7300 y S7301

producto	turbidez (%) antes del calentamiento	turbidez (%) después del calentamiento
S7300 de S013/15-K30-09A	6,4	4,2
S7301-02 del ensayo 1	12,0	5,2

Como se puede observar a partir de los datos en la Tabla 27, las muestras fueron estables al calor. Las soluciones de proteína eran al principio bastante claras y el tratamiento con calor redujo realmente el nivel de turbidez.

Resumen de la divulgación

25 En el resumen de esta divulgación, la presente invención proporciona un método alternativo con base en la extracción de proteína de soja a partir de una materia prima utilizando una solución acuosa de cloruro de calcio, para obtener un producto de proteína de soja, que sea soluble en un medio ácido y forme soluciones transparentes de las mismas estables al calor.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de soja de al menos el 60% en peso (N x 6,25), con base en peso seco, que comprende:
- 5 (a) extraer una fuente de proteína de soja con una solución acuosa de cloruro de calcio para provocar la solubilización de la proteína de soja proveniente de la fuente de proteína y formar una solución acuosa de proteína de soja,
- (b) separar la solución acuosa de proteína de soja de la fuente residual de proteína de soja,
- (c) concentrar la solución acuosa de proteína de soja, mientras se mantiene la fuerza iónica prácticamente constante al utilizar una técnica de membrana selectiva,
- 10 (d) opcionalmente someter a diafiltración la solución concentrada de proteína de soja, y
- (e)(i) secar la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada, o
- (e)(ii) diluir en agua la solución de proteína de soja concentrada para provocar la formación de un precipitado, separando el precipitado del agua de dilución, denominado el sobrenadante, y secar el precipitado separado de proteína de soja, o
- 15 (e)(iii) diluir la solución concentrada de proteína de soja en agua para provocar la formación de un precipitado, acidificar la mezcla del precipitado y diluir con agua para resolubilizar la proteína y formar una solución clara de proteína de soja, concentrar la solución clara de proteína de soja acidificada mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante mediante la utilización de una técnica selectiva de membrana, opcionalmente sometiendo a diafiltración la solución concentrada de proteína de soja acidificada clara y secar la solución concentrada de
- 20 proteína de soja acidificada clara opcionalmente diafiltrada,
- en donde, cuando se lleva a cabo la etapa (e)(ii), se acidifica la solución concentrada de proteína de soja opcionalmente diafiltrada a un pH de 2,5 a 4,4, preferiblemente de 2,0 a 4,0, antes de la dilución, separación y secado.
- 25 2. El método reivindicado en la reivindicación 1, en donde la etapa (e)(ii) se lleva a cabo y se procesa el sobrenadante para formar un producto de proteína de soja que tenga un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6,25) en b. s.
3. El método reivindicado en la reivindicación 1 o 2, en donde dicha sal de calcio es cloruro de calcio.
4. El método reivindicado en la reivindicación 3, en donde la solución de cloruro de calcio tiene una concentración menor a 1,0 M, preferiblemente de 0,10 a 0,15 M.
- 30 5. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha etapa de extracción se lleva a cabo a una temperatura de 15° a 35°C y a un pH de 5 a 11, preferiblemente de 5 a 7, para producir la solución acuosa de proteína de soja que tiene una concentración de proteína de 5 a 50 g/L, preferiblemente de 10 a 50 g/L, y/o en donde la solución acuosa de sal de calcio preferiblemente contiene un antioxidante y/o preferiblemente está presente un agente reductor durante la etapa de extracción para romper o reordenar los enlaces disulfuro de los
- 35 inhibidores de tripsina para lograr una reducción en la actividad del inhibidor de tripsina, y/o en donde la solución acuosa de proteína de soja, y/o la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y/o el sobrenadante concentrado y opcionalmente diafiltrado y/o la solución de proteína de soja acidificada clara concentrada y opcionalmente diafiltrada es tratada con un adsorbente para remover los compuestos causantes de color y/o de olor.
- 40 6. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha solución acuosa de proteína de soja y/o dicho sobrenadante y/o dicha solución de proteína de soja acidificada clara se concentra hasta una concentración de proteína de 50 a 400 g/L, preferiblemente de 100 a 250 g/L mediante ultrafiltración utilizando una membrana que tiene un corte de peso molecular de 3.000 a 1.000.000 de Daltons, preferiblemente de 5.000 a 100.000 Daltons.
- 45 7. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se lleva a cabo una etapa de diafiltración utilizando una solución acuosa de sal de calcio del mismo pH e igual o menor molaridad que la de la solución salina para extracción o utilizando agua, agua acidificada, una solución salina diluida o una solución salina diluida acidificada en la solución de proteína de soja antes o después de la concentración completa de la misma,

- preferiblemente utilizando 2 a 40 volúmenes, más preferiblemente 5 a 25 volúmenes de una solución para diafiltración y/o utilizando una membrana que tenga un corte de peso molecular de 3.000 a 1.000.000 de Daltons, preferiblemente de 5.000 a 100.000 Daltons, preferiblemente hasta que no haya presentes cantidades adicionales de contaminantes o haya un color visible en el permeado y/o preferiblemente hasta que el material retenido haya sido purificado suficientemente de tal forma que, cuando se seca, proporcione un aislado de proteína de soja con un contenido de proteína de al menos 90% en peso (N x 6,25) en b. s., y/o donde está presente preferiblemente un antioxidante durante al menos parte de la etapa de diafiltración.
8. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional se llevan a cabo a una temperatura de 2° a 60°C, preferiblemente de 20° a 35°C, y/o en donde las etapas de concentración y/o diafiltración opcional se operan de una manera favorable para la remoción de los inhibidores de tripsina y/o se añade preferiblemente un agente reductor a la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y/o de sobrenadante concentrado y opcionalmente diafiltrado y/o dicha solución de proteína de soja clara acidificada concentrada y opcionalmente diafiltrada antes del secado y/o precipitado de la proteína húmeda antes del secado y/o el producto de proteína de soja seco para romper o reordenar los enlaces disulfuro de los inhibidores de tripsina para lograr una reducción en la actividad del inhibidor de tripsina.
9. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y/o el sobrenadante concentrado y opcionalmente diafiltrado y/o dicha solución de proteína de soja acidificada concentrada y opcionalmente diafiltrada se trata con un adsorbente para remover los compuestos causantes del color y/o del olor, o se somete a una etapa de pasteurización, preferiblemente a una temperatura de 55° a 70°C durante 30 segundos a 60 minutos, más preferiblemente a una temperatura de 60° a 65°C durante 10 a 15 minutos y en donde la solución de proteína de soja pasteurizada preferiblemente se enfría a una temperatura de 15°C a 35°C para el secado o un procesamiento adicional.
10. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde se lleva a cabo la etapa (e)(ii) o la etapa (e)(iii) y, después de la concentración y diafiltración opcional del sobrenadante, dicha solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y/o el sobrenadante concentrado y opcionalmente diafiltrado se diluye en agua para producir un precipitado que tenga un contenido reducido de inhibidores de tripsina en comparación con dicha solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada, en donde la dilución es preferiblemente de 5 a 25 veces, más preferiblemente de 10 a 20 veces, con agua, preferiblemente que tenga una temperatura de 1° a 60°C, más preferiblemente de 15° a 35°C.
11. El método reivindicado en la reivindicación 10, en donde el precipitado se lava con 1 a 10 volúmenes, preferiblemente 2 a 3 volúmenes de agua y luego se recupera el precipitado.
12. El método reivindicado en la reivindicación 10, en donde el precipitado se solubiliza preferiblemente en 2 a 3 volúmenes de agua a pH bajo, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, para formar una solución clara de proteína de soja.
13. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde se efectúa la etapa (e)(iii) y en donde dicho precipitado se resolubiliza al disminuir del pH, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, para formar una solución clara de proteína de soja.
14. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde se efectúa la etapa (e)(iii) y en donde se acidifica el sobrenadante parcialmente concentrado o completamente concentrado a un pH de 2,5 a 4,4, preferiblemente de 2,0 a 4,0, antes del secado o un procesamiento adicional, y opcionalmente en donde se ajusta el pH del sobrenadante acidificado, del sobrenadante acidificado parcialmente concentrado o del sobrenadante acidificado totalmente concentrado de 6,0 a 7,0.
15. El método reivindicado en la reivindicación 14, en donde se trata el sobrenadante, el sobrenadante parcialmente concentrado o el sobrenadante totalmente concentrado, antes o después del ajuste opcional de pH, con calor, preferiblemente a una temperatura de 70° a 120°C durante 1 minuto a 30 minutos, más preferiblemente de 75° a 105°C durante 5 minutos a 15 minutos, para generar un precipitado de proteínas sensibles al calor y se separa el precipitado del sobrenadante, del sobrenadante parcialmente concentrado o del sobrenadante totalmente concentrado, se lava el precipitado preferiblemente después del lavado con 1 a 10 volúmenes de agua, más preferiblemente con 2 volúmenes de agua.
16. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la solución de proteína de soja acidificada y/o la solución clara de proteína de soja y/o el sobrenadante acidificado, el sobrenadante parcialmente concentrado o totalmente concentrado se someten a una etapa de tratamiento con calor para inactivar los factores antinutricionales termolábiles, preferiblemente los inhibidores de tripsina termolábiles, preferiblemente a una temperatura de 70° a 120°C durante 10 segundos a 60 minutos, más preferiblemente de 85° a 95°C durante 30

segundos a 5 minutos, en donde la etapa de tratamiento con calor también pasteuriza preferiblemente la solución clara de proteína, y/o en donde la solución de proteína de soja clara tratada con calor preferiblemente se enfría a una temperatura de 2° a 60°C, más preferiblemente de 20° a 35°C, para el secado o un procesamiento adicional.

- 5 17. El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el aislado de proteína de soja tiene un contenido de proteína de 60 a 90% en peso, de al menos 90% en peso, o de al menos 100% en peso (N x 6,25) en b. s.