

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 678**

51 Int. Cl.:

A23J 3/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012 PCT/CA2012/000443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12155242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12786190 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2709464**

54 Título: **Preparación de un aislado de proteína de soja utilizando extracción de cloruro de calcio ("S703 CIP")**

30 Prioridad:

17.05.2011 US 201113067201

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

18.05.2017

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 2 612 678 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

Preparación de un aislado de proteína de soja utilizando extracción de cloruro de calcio ("S703 CIP")

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la preparación de productos de proteína de soja.

5 Antecedentes de la invención

10 El documento US2010/0330249 describe la formación de un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteínas de al menos aproximadamente 60% en base seca (N x 6,25), mediante un procedimiento en el que la proteína de soja se extrae de un material que sirve de fuente de proteína de soja utilizando solución acuosa de cloruro de calcio a pH bajo, generalmente de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5, y la separación de la solución acuosa de proteína de soja resultante de la fuente de proteína de soja residual. La solución acuosa de proteína de soja clarificada resultante puede diluirse y ajustar el pH dentro del intervalo de 1,5-5,0. La solución puede concentrarse por ultrafiltración, diafiltrarse y secarse para proporcionar el producto de proteína de soja. El producto de proteína de soja es soluble en medio ácido y produce soluciones transparentes, térmicamente estables, y por lo tanto puede usarse para la fortificación de proteínas de refrescos y bebidas deportivas.

15 El documento WO2011/000096 divulga la formación de un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente 60% en peso (N x 6,25) en base seca, extrayendo una fuente de proteína de soja con una solución salina, preferiblemente solución acuosa de cloruro de sodio, para formar una solución acuosa de proteína que tiene un pH de aproximadamente 1,5 a 11, y separar la solución acuosa de proteína resultante de la fuente de proteína de soja residual. La concentración de proteína de la solución acuosa de proteína se incrementa de 20 aproximadamente 50 hasta aproximadamente 400 g/L mientras que la fuerza iónica se mantiene sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva. La solución de proteína concentrada resultante se diafiltra opcionalmente, y se añade una sal de calcio, preferiblemente cloruro de calcio, hasta una conductividad de 15 a 85 mS. Se remueve el precipitado formado como resultado de la adición de la sal de calcio y la fracción retenida clarificada resultante se diluye en 2 a 20 volúmenes de agua antes de la acidificación a un pH de 1,5 a 4,4 para producir una 25 solución de proteína clara acidificada que se concentra, opcionalmente se diafiltra y opcionalmente se seca. Pueden usarse variantes de este procedimiento para producir un producto de proteína de soja que es soluble, transparente y estable al calor en ambientes acuosos ácidos.

30 El documento US2010/0203204 divulga la formación de un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6,25) en base seca, por extracción de un material que sirve de fuente de proteína de soja con una solución acuosa de sal de calcio, preferiblemente un solución de cloruro de calcio, para formar una solución acuosa de proteína de soja; separación de la solución acuosa de proteína de soja de la fuente residual de proteína de soja; concentración de la solución acuosa de proteína de soja mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva; dilución de la solución concentrada con agua para producir la formación de un precipitado, separar el precipitado del sobrenadante, y secar el sobrenadante para 35 proporcionar el producto de proteína de soja.

40 En las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 12/603.087 (7865-415) presentada el 21 de octubre de 2009 (publicación de patente estadounidense No. 2010-0098818) y 12/923.897 (7865-454) presentada el 13 de octubre de 2010 (publicación de patente estadounidense No. 2011-0038993), cedidas el cesionario de las mismas 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 térmicamente estables a bajos valores de pH. Este producto de proteína de soja puede utilizarse para la fortificación con proteína, en particular, de bebidas gaseosas y bebidas deportivas, así como otros sistemas acuosos ácidos, sin precipitación de la proteína. El producto de proteína de soja se produce mediante extracción de una fuente de proteína de soja con solución acuosa de cloruro de calcio a pH natural, diluyendo opcionalmente la solución acuosa de proteína de soja resultante, ajustando el pH de la solución 45 acuosa de proteína de soja a un pH de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,4, preferiblemente aproximadamente 2,0 hasta aproximadamente 4,0, para producir una solución de proteína de soja clara acidificada, que puede estar opcionalmente concentrada y/o diafiltrada antes del secado.

Sumario de la invención

50 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente 60% en peso (N x 6,25) en base seca puede formarse mediante un procedimiento que implica la extracción de la fuente de proteína de soja con cloruro de calcio a valores de pH bajos.

En un aspecto de la presente invención, se extrae un material que sirve de fuente de proteína de soja con solución acuosa de cloruro de calcio a pH bajo y la solución acuosa de proteína de soja resultante se diluye opcionalmente, se

ajusta opcionalmente en un pH dentro del intervalo ácido, después se somete a ultrafiltración y diafiltración opcional para proporcionar una solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada. La solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada puede ajustarse entonces opcionalmente en un pH dentro del intervalo de pH de 1,5 a 7, preferiblemente de 4 a 7, más preferiblemente de 5 a 7 y diluirse con agua para fraccionar las proteínas de soja en un precipitado rico en globulinas y un sobrenadante rico en proteínas de albúmina y que contiene inhibidores de tripsina. El precipitado formado por la etapa de dilución se puede recoger y procesar o secar posteriormente tal como está para proporcionar el producto de proteína de soja, pero con un nivel reducido de inhibidores de tripsina.

En otro aspecto de la presente invención, la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y opcionalmente ajustada en el pH, preparada como se ha descrito anteriormente se diluye en agua. El pH de la muestra diluida se ajusta, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0 para volver a solubilizar la proteína precipitada por la etapa de dilución. La solución diluida y con pH ajustado puede ser opcionalmente tratada térmicamente y/o concentrada y/o diafiltrada.

Los productos de proteína de soja proporcionados en la presente memoria, que tienen un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6,25) en base seca, son solubles a valores de pH ácidos para proporcionar soluciones acuosas transparentes y térmicamente estables de los mismos. Los productos proteicos de soja pueden ser utilizados para la fortificación con proteína, en particular, de bebidas gaseosas y bebidas deportivas, así como otros sistemas acuosos sin precipitación de las proteínas. El producto de proteína de soja es preferiblemente un aislado que tiene un contenido de proteína de al menos 90% en peso, preferiblemente al menos 100% en peso (N x 6,25) en base seca.

Se puede adoptar una variación de estos procedimientos para producir el producto con un contenido reducido de proteínas de albúmina e inhibidores de tripsina. En tal variación, la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se ajusta opcionalmente en un pH dentro del intervalo de 1,5 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 7,0, más preferiblemente de 5,0 a 7,0, luego se diluye en agua para producir un precipitado con un contenido reducido de proteínas de albúmina e inhibidores de tripsina. El precipitado puede ser recogido y secado opcionalmente para producir el producto o puede solubilizarse el precipitado en agua, preferiblemente a un pH de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0 y luego opcionalmente secado. Alternativamente, la solución formada solubilizando el precipitado en agua preferiblemente a un pH de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, puede opcionalmente ser tratado térmicamente y/o limpiado y/o concentrado y/o diafiltrado antes de ser secado opcionalmente.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, se describe un método para producir un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de soja de al menos 60% en peso (N x 6,25), en base seca, que comprende:

(a) extraer una fuente de proteína de soja con solución acuosa de sal de calcio, preferiblemente solución de cloruro de calcio, a un pH de 1,5 a 5,0, 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 al menos parcialmente la solución acuosa de proteína de soja de la fuente de proteína de soja residual,

(c) diluir opcionalmente la solución acuosa de proteína de soja,

(d) ajustar opcionalmente el pH de la solución acuosa de proteína a un valor dentro del intervalo de 1,5 a 5,0, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, y diferenciarlo del pH de extracción,

(e) opcionalmente limpiar la solución acuosa de proteína de soja para eliminar las partículas residuales,

(f) concentrar la solución acuosa de proteína de soja mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva para producir una solución de proteína de soja concentrada que tiene una concentración de proteína de 50 a 300 g/L,

(g) opcionalmente diafiltrar la solución concentrada de proteína de soja,

(h) ajustar opcionalmente el pH de la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada a un valor dentro del intervalo de 1,5 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 7,0, más preferiblemente de 5,0 a 7,0,

(i) diluir en agua la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y con pH ajustado,

(j) separar el precipitado formado del agua diluyente, denominado el sobrenadante, y

(k) secar opcionalmente el precipitado de proteína de soja separado.

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

5 Se puede adoptar otra variación de este procedimiento para producir el producto. En tal variación, la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y opcionalmente ajustada al pH se diluye en agua y el pH se ajusta después de la dilución, que vuelve a solubilizar el precipitado formado por la etapa de dilución. La solución de pH ajustada resultante se trata opcionalmente térmicamente y/o se limpia y/o concentra y/o diafiltra antes de secar opcionalmente para producir el producto.

10 Por consiguiente, en un aspecto adicional de la presente invención, se describe un método para producir un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de soja de al menos aproximadamente 60% en peso (N x 6,25), en base seca, que comprende:

(a) extraer una fuente de proteína de soja con solución acuosa de sal de calcio, preferiblemente solución de cloruro de calcio, a un pH, de 1,5 a 5,0, 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 al menos parcialmente la solución acuosa de proteína de soja de la fuente de proteína de soja residual,

15 (c) diluir opcionalmente la solución acuosa de proteína de soja,

(d) ajustar opcionalmente el pH de la solución acuosa de proteína a un valor dentro del intervalo de 1,5 a 5,0, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, y que difiere del pH de extracción,

(e) opcionalmente limpiar la solución acuosa de proteína de soja para eliminar las partículas residuales,

20 (f) concentrar la solución acuosa de proteína de soja manteniendo al mismo tiempo la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva,

(g) opcionalmente diafiltrar la solución concentrada de proteína de soja,

(h) ajustar opcionalmente el pH de la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada a un valor dentro del intervalo de 1,5 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 7,0, más preferiblemente de 5,0 a 7,0,

(i) diluir en agua la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada y con pH ajustado,

25 (j) ajustar el pH de la muestra diluida, preferiblemente a un valor dentro del intervalo de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0 para volver a solubilizar la proteína precipitada formada por la etapa de dilución,

(k) concentrar opcionalmente la solución de proteína de soja de pH ajustado, manteniendo al mismo tiempo la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva,

(l) opcionalmente diafiltrar la solución de proteína de soja concentrada, de pH ajustado, y

30 (m) opcionalmente secar la solución concentrada y opcionalmente diafiltrada, de pH ajustado de la proteína de soja.

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

35 Aunque esta memoria descriptiva se refiere principalmente a la producción de un aislado de proteína de soja, las etapas de concentración y/o diafiltración descritas en este documento pueden manipularse para producir un producto de proteína de soja de menor pureza, por ejemplo, un concentrado de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso, pero que tiene propiedades sustancialmente similares al aislado.

Los productos de proteína de soja producidos de acuerdo con los procedimientos de la invención se pueden mezclar con bebidas en polvo para la formación de refrescos acuosos o bebidas deportivas disolviéndolos en agua. Dicha 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 que tiene un alto grado de transparencia a valores de pH ácidos y que es térmicamente estable a estos valores de pH.

5 Los procedimientos de la presente invención también pueden proporcionar una solución acuosa del producto de soja proporcionado aquí que es estable al calor a pH bajo. La solución acuosa puede ser una bebida, que puede ser una bebida clara en la que el producto de proteína de soja es completamente soluble y transparente o una bebida opaca en la que el producto de proteína de soja no aumenta la opacidad. El producto de proteína de soja también tiene buena solubilidad a pH aproximadamente de 7. Una solución acuosa del producto de proteína de soja, preparada a un pH casi neutro, tal como un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, puede ser una bebida.

10 Los productos de proteína de soja producidos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención carecen del sabor característico de los aislados de proteína de soja y son adecuados, no sólo para la fortificación con proteína de medios ácidos, sino que pueden usarse en una amplia variedad de aplicaciones convencionales de aislados de proteína, incluyendo, pero no limitado a la fortificación con proteínas de alimentos y bebidas procesados, emulsificación de aceites, para dar cuerpo en productos horneados y agente espumante en productos que atrapan gases. Además, el producto de proteína de soja puede tomar la forma de fibras de proteína, útiles en análogos de carne, y puede usarse como un sustituto o extensor de la clara de huevo en productos alimenticios en los que se usa la clara de huevo como aglutinante. El producto de proteína de soja también puede usarse en suplementos nutricionales. Otros usos del producto de proteína de soja se encuentran en alimentos para mascotas, piensos para animales y en aplicaciones industriales y cosméticas y en productos para el cuidado personal.

Descripción general de la invención

20 La etapa inicial del procedimiento 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 la soja incluyendo, pero sin limitarse a, polvo de soja, hojuelas de soja, grano de soja y harina de soja. La fuente de proteína de soja puede usarse con contenido completo de grasa, en forma parcialmente desgrasada o completamente desgrasada. Cuando la fuente de proteína de soja contiene una cantidad apreciable de grasa, generalmente se requiere una etapa de eliminación del aceite durante el proceso. La proteína de soja recuperada de la fuente de proteína de soja puede ser la proteína que naturalmente se presenta en la soja o el material proteínico puede ser una proteína modificada por manipulación genética pero que posee características hidrófobas y polares características de la proteína natural.

25 La solubilización de proteínas a partir del material que sirve de fuente de proteína de soja se efectúa más convenientemente usando solución de cloruro de calcio, aunque se pueden usar soluciones de otras sales de calcio. Además, la extracción de la proteína de soja de la fuente de proteína de soja puede efectuarse usando una solución de sal de calcio en combinación con otra solución salina tal como cloruro de sodio.

30 A medida que aumenta la concentración de la solución de sal de calcio, el grado de solubilización de la proteína 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 solución de sal de calcio que causa la solubilización máxima de la proteína varía dependiendo de la sal en cuestión. Usualmente se prefiere utilizar un valor de concentración menor que 1,0 M, y más preferiblemente un valor de 0,10 M a 0,15 M.

35 En un procedimiento discontinuo, la solubilización de la proteína se efectúa a una temperatura de 1°C a 100°C, preferiblemente de 15°C a 65°C, más preferiblemente de 20°C a 35°C, preferiblemente acompañada por agitación para disminuir el tiempo de solubilización, que es usualmente 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, para proporcionar un rendimiento total alto de producto.

40 En un proceso continuo, la extracción de la proteína de soja de la fuente de proteína de soja se lleva a cabo de cualquier forma consistente con la realización de una extracción continua de proteína de soja de la fuente de proteína de soja. En una realización, la fuente de proteína de soja se mezcla continuamente con una solución de sal de calcio y la mezcla se transporta a través de una tubería o conducto que tiene una longitud y a un caudal durante un tiempo de residencia suficiente para efectuar la extracción deseada de acuerdo con los parámetros descritos en esta memoria. En tal procedimiento continuo, la etapa de solubilización se efectúa rápidamente, en un tiempo de hasta aproximadamente 10 minutos, preferiblemente para efectuar la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína de la fuente de proteína de soja como sea practicable. La solubilización en el procedimiento continuo se efectúa a temperaturas entre 1°C y 100°C, preferiblemente entre 15°C y 65°C, más preferiblemente entre 20°C y 35°C.

45 La extracción se lleva a cabo a un pH de 1,5 a 5,0. El pH del sistema de extracción (fuente de proteína de soja y solución de sal de calcio) se puede ajustar a cualquier valor deseado dentro del intervalo de 1,5 a 5,0 para la etapa de extracción mediante el uso de cualquier ácido de calidad alimentaria conveniente, habitualmente ácido clorhídrico o ácido fosfórico.

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 típicos de concentración son de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15% p/v.

5 La etapa de extracción de proteína con la solución acuosa de sal de calcio tiene el efecto adicional de solubilizar grasas que pueden estar presentes en la fuente de proteína de soja, lo que da lugar a que estén presentes las grasas en la fase acuosa.

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

10 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 de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1% en peso de la solución, preferiblemente de aproximadamente 0,05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquiera de los compuestos fenólicos en la solución proteica.

15 La fase acuosa resultante de la etapa de extracción puede separarse luego de la fuente de proteína de soja residual, de cualquier forma conveniente, tal como mediante el empleo de una decantadora centrífuga o cualquier tamiz adecuado, seguido por centrifugación y/o filtración en disco, para remover el material residual que sirve de fuente de proteína de soja. La fuente de proteína de soja residual separada puede secarse para su disposición. Alternativamente, la fuente de proteína de soja residual separada puede procesarse para recuperar alguna proteína residual. La fuente de proteína de soja residual separada puede ser sometida nuevamente a extracción con una nueva solución de sal de calcio, con la nueva extracción llevada a cabo en el intervalo de pH de 1,5 a 5,0 y la solución de proteína obtenida tras la clarificación combinada con la solución de proteína inicial para procesamiento adicional como se describe a continuación. Alternativamente, la fuente de proteína de soja residual separada puede procesarse mediante un procedimiento de precipitación isoeléctrica convencional o cualquier otro procedimiento conveniente para recuperar dicha proteína residual.

20 Cuando la fuente de proteína de soja contiene cantidades significativas de grasa, tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.844.086 y 6.005.076, cedidas al cesionario de la presente invención, pueden efectuarse las etapas de desgrasado descritas en las mismas sobre la proteína acuosa separada. Alternativamente, el desgrasado de la solución acuosa de proteína separada puede lograrse por cualquier otro procedimiento conveniente.

25 La solución acuosa de proteína de soja puede tratarse con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar compuestos de color y/o de olor. Este tratamiento adsorbente puede llevarse a cabo bajo ciertas condiciones convenientes, generalmente a la temperatura ambiente de la solución acuosa de proteína separada. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0,025% hasta aproximadamente 5% p/v, preferiblemente de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 2% p/v. El agente adsorbente puede eliminarse de la solución de proteína de soja por cualquier medio conveniente, tal como por filtración.

30 La solución acuosa de proteína de soja resultante puede diluirse preferiblemente con 0,5 a 10 volúmenes, más preferiblemente 0,5 a 2 volúmenes de diluyente acuoso, con el fin de disminuir la conductividad de la solución acuosa de proteína de soja hasta un valor generalmente inferior a 90 mS, preferiblemente de 4 a 31 mS. Dicha dilución se efectúa habitualmente utilizando agua, aunque se puede usar solución salina diluida, tal como cloruro de sodio o cloruro de calcio, que tiene una conductividad de hasta aproximadamente 3 mS.

35 El diluyente con el que se mezcla la solución de proteína de soja puede tener una temperatura de 2° a 70°C, preferiblemente de 15° a 65°C, más preferiblemente de 20° a 35°C.

La solución de proteína de soja opcionalmente diluida puede ajustarse en pH a un valor diferente del pH de extracción, pero aún dentro del intervalo de 1,5 a 5,0, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, mediante la adición de cualquier ácido adecuado de calidad alimentaria, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o álcali de calidad alimentaria, usualmente hidróxido de sodio según se requiera.

40 La solución de proteína de soja diluida y opcionalmente de pH ajustado tiene una conductividad generalmente por debajo de 95 mS, preferiblemente de 4 a 36 mS.

45 La solución acuosa de proteína de soja puede someterse a un tratamiento térmico para inactivar factores antinutricionales sensibles al calor, tales como inhibidores de tripsina, presentes en dicha solución como resultado de la extracción del material que sirve de fuente de proteína de soja durante la etapa de extracción. Dicha etapa de calentamiento también proporciona el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. Generalmente, la solución de proteína se calienta a una temperatura de 70° a 160°C, preferiblemente de 80° a 120°C, más preferiblemente de 85°C a 95°C durante 10 segundos a 60 minutos, preferiblemente durante 30 segundos a 5 minutos. La solución de proteína de

soja tratada térmicamente puede entonces enfriarse para un procesamiento adicional como se describe a continuación, a una temperatura de 2°C a 65°C, preferiblemente de 20°C a 35°C.

5 Opcionalmente, puede limpiarse la solución de proteína opcionalmente diluida, opcionalmente de pH ajustado y opcionalmente tratada térmicamente, por cualquier medio conveniente, tal como por filtración para eliminar cualquier partícula residual.

Con el fin de proporcionar un producto de proteína de soja que tenga un menor contenido de impurezas y un contenido de sal reducido, tal como un aislado de proteína de soja, se procesa la solución acuosa de proteína de soja, antes del secado opcional.

10 La solución acuosa de proteína de soja se concentra para aumentar la concentración de proteína de la misma mientras que se mantiene la fuerza iónica de la misma sustancialmente constante. Esta concentración se efectúa para proporcionar una solución de proteína de soja concentrada que tenga una concentración de proteína de 50 a 300 g/L, preferiblemente de 100 a 200 g/L.

15 La etapa de concentración puede llevarse a cabo de cualquier forma conveniente consistente con la operación discontinua o continua, tal como mediante el empleo de cualquier técnica conveniente de membrana selectiva, tal como ultrafiltración o diafiltración, usando membranas, tales como membranas de fibras huecas o membranas enrolladas en espiral, con un corte de peso molecular adecuado, tal como 3.000 a 1.000.000 Daltons, preferiblemente 5.000 a 100.000 Daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales y configuraciones de membrana y, para operación continua, dimensionados para permitir el grado de concentración deseado a medida que la solución acuosa de proteína acuosa pasa a través de las membranas.

20 Como es bien conocido, las técnicas de ultrafiltración y técnicas similares de membrana selectiva permiten que las especies de bajo peso molecular pasen a través de ellas mientras se impide que las especies de mayor peso molecular lo hagan. Las especies de bajo peso molecular incluyen no sólo las especies iónicas de la sal grado alimentario, sino también los materiales de bajo peso molecular extraídos del material que sirve de fuente, tales como carbohidratos, pigmentos, proteínas de bajo peso molecular y factores antinutricionales, tales como el inhibidor de tripsina, que en sí mismos son proteínas de bajo peso molecular. El corte de peso molecular de la membrana se elige generalmente para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, mientras que permite que los contaminantes pasen a través suyo teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y configuraciones.

30 La solución de proteína de soja concentrada puede someterse después a una etapa de diafiltración usando agua o una solución salina diluida. La solución de diafiltración puede estar a su pH natural o a un pH igual al de la solución de proteína que se va a diafiltrar o a cualquier valor de pH entre ellos. Dicha diafiltración puede efectuarse utilizando de 2 a 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente de 5 a 25 volúmenes de solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, se eliminan cantidades adicionales de contaminantes de la solución acuosa de proteína de soja mediante el paso a través de la membrana con el permeado. Esto purifica la solución acuosa de proteína y puede también reducir su viscosidad. La operación de diafiltración puede efectuarse hasta que no existan cantidades adicionales significativas de contaminantes o de color visible en el permeado o hasta que la fracción retenida haya sido suficientemente purificada para que cuando se haya secado, proporcione un aislado de proteína de soja con un contenido de proteína de al menos aproximadamente 90% en peso (N x 6,25) en base seca. Tal diafiltración puede efectuarse usando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración puede efectuarse utilizando una membrana separada con un corte de peso molecular diferente, tal como una membrana que tenga un corte de peso molecular en el intervalo de 3.000 a 1.000.000 Daltons, preferiblemente de 5.000 a 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales de membrana y configuración.

45 Alternativamente, la etapa de diafiltración se puede aplicar a la solución acuosa de proteína antes de la concentración o a la solución acuosa de proteína parcialmente concentrada. La diafiltración también se puede aplicar en múltiples puntos durante el proceso de concentración. Cuando se aplica la diafiltración antes de la concentración o a la solución parcialmente concentrada, la solución diafiltrada resultante se puede concentrar adicionalmente. La reducción de la viscosidad lograda mediante diafiltración varias veces a medida que se concentra la solución de proteína puede permitir que se consiga una mayor concentración final de proteína totalmente concentrada. Esto reduce el volumen de material a secar.

50 La etapa de concentración y la etapa de diafiltración pueden efectuarse aquí de tal manera que el producto de proteína de soja posteriormente recuperado contenga menos del 90% en peso de proteína (N x 6,25) en base seca, tal como al menos 60% en peso de proteína (N x 6,25) en base seca. Mediante la concentración parcial y/o la diafiltración parcial de la solución acuosa de proteína de soja, es posible eliminar sólo parcialmente los contaminantes. Esta solución de proteína puede ser entonces secada para proporcionar un producto de proteína de soja con niveles más bajos de pureza. El producto de proteína de soja es todavía capaz de producir soluciones de proteínas transparentes en condiciones ácidas.

55

- 5 Un antioxidante puede estar presente en el medio de diafiltración durante al menos parte de la etapa de diafiltración. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, tal como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleada en el medio de diafiltración depende de los materiales empleados y puede variar de 0,01 a 1% en peso, preferiblemente 0,05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier compuesto fenólico presente en la solución de proteína de soja concentrada.
- 10 La etapa de concentración y la etapa opcional de diafiltración pueden efectuarse a cualquier temperatura conveniente, generalmente de 2°C a 65°C, preferiblemente de 20°C a 35°C, y durante el período de tiempo para efectuar el grado deseado de concentración y diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas en algún grado dependen del equipo de membrana usado para efectuar el procesamiento de membrana, la concentración deseada de proteína de la solución y la eficiencia de la eliminación de contaminantes al permeado.
- 15 Existen dos inhibidores de tripsina principales 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 puede controlarse mediante la manipulación de diversas variables de proceso.
- 20 Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento térmico de la solución acuosa de proteína de soja se puede usar para inactivar los inhibidores de tripsina termolábiles. La solución de proteína de soja parcialmente concentrada o totalmente concentrada también puede ser tratada térmicamente para inactivar los inhibidores de tripsina lábil al calor. Cuando se aplica el tratamiento térmico a la solución de proteína de soja parcialmente concentrada, la solución resultante tratada térmicamente puede entonces concentrarse adicionalmente.
- 25 Además, las etapas de concentración y/o diafiltración pueden operarse de una manera favorable para la eliminación de los inhibidores de tripsina en el permeado junto con los otros contaminantes. La eliminación de los inhibidores de tripsina se promueve mediante la utilización de una membrana de mayor tamaño de poro (tal como aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 1.000.000 Da), operando la membrana a temperaturas elevadas (tal como aproximadamente a 30°C hasta aproximadamente 65°C) y empleando mayores volúmenes de medio de diafiltración (tal como aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 volúmenes).
- 30 La extracción y/o el procesamiento por membrana de la solución de proteína a un pH inferior (1,5-3,0) puede reducir la actividad inhibidora de la tripsina con respecto al procesamiento de la solución a pH más alto (3,0-5,0). Cuando la solución de proteína se concentra y se diafiltra en el extremo inferior del intervalo de pH, puede ser deseable elevar el pH de la fracción retenida antes del secado. El pH de la solución de proteína concentrada y diafiltrada puede aumentarse hasta el valor deseado, por ejemplo, pH 3, mediante la adición de cualquier álcali conveniente de calidad alimentaria tal como hidróxido de sodio. Si se desea reducir el pH de la fracción retenida antes del secado, esto puede hacerse mediante la adición de cualquier ácido conveniente de grado alimentario tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico.
- 35 Además, se puede conseguir una reducción en la actividad inhibidora de tripsina exponiendo los materiales de soja a agentes reductores que alteran o reordenan los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores adecuados incluyen sulfito de sodio, cisteína y N-acetilcisteína.
- 40 La adición de tales agentes reductores puede efectuarse en diversas etapas del proceso total. El agente reductor puede añadirse con el material que sirve de fuente de proteína de soja en la etapa de extracción, puede añadirse a la solución acuosa de proteína de soja clarificada después de la eliminación del material residual que sirve de fuente de proteína de soja, se puede añadir a la solución de proteína concentrada antes o después de la diafiltración o puede mezclarse en seco con el producto de proteína de soja seco. La adición del agente reductor puede combinarse con una etapa de tratamiento térmico y las etapas de procesamiento de membrana, como se ha descrito anteriormente.
- 45 Si se desea retener los inhibidores de tripsina activos en la solución de proteína concentrada, esto puede lograrse mediante la eliminación o reducción de la intensidad de la etapa de tratamiento térmico, sin utilizar agentes reductores, operando las etapas de concentración y diafiltración en el extremo superior del intervalo de pH (3,0 a 5,0), utilizando una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro más pequeño, operando la membrana a temperaturas más bajas y empleando menos volúmenes de medio de diafiltración.
- 50 La solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada puede someterse a una operación de desgrasado adicional, si se requiere, tal como se describe en las patentes US Nos. 5.844.086 y 6.005.076. Alternativamente, el desgrasado de la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada puede conseguirse mediante cualquier otro procedimiento conveniente.
- La solución acuosa de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada puede tratarse con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar compuestos coloreados y/o olorosos. Dicho tratamiento adsorbente puede llevarse a cabo bajo cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura

ambiente de la solución de proteína concentrada. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0,025% hasta aproximadamente 5% p/v, preferiblemente de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 2% p/v. El adsorbente puede retirarse de la solución de proteína de soja por cualquier medio conveniente, tal como por filtración.

5 La solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada resultante de la operación de desgrasado opcional y la etapa opcional de tratamiento con adsorbente pueden someterse a una etapa de pasteurización para reducir la carga microbiana. Dicha pasteurización puede efectuarse bajo cualquier condición de pasteurización deseada. Generalmente, la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se calienta a una temperatura de 55° a 70°C, preferiblemente de 60° a 65°C, durante 30 segundos a 60 minutos, preferiblemente 10 minutos a 15 minutos. La solución de proteína de soja concentrada y diafiltrada pasteurizada puede entonces enfriarse para el secado o procesamiento adicional, preferiblemente a una temperatura de 20° a 35°C.

10 En un aspecto de la invención, la solución de proteína concentrada resultante de la etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional, la etapa opcional de desgrasado, la etapa opcional de tratamiento con adsorbente y la etapa opcional de pasteurización, se ajusta opcionalmente en un pH dentro del intervalo de 1,5 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 7,0, más preferiblemente de 5,0 a 7,0 y después se diluye mezclando la solución de proteína concentrada con agua que tiene el volumen requerido para alcanzar el grado de dilución deseado. Cuando la intención es separar la proteína precipitada de la fase acuosa residual, denominada sobrenadante, como es el caso de este aspecto de la presente invención, el grado de dilución es generalmente de aproximadamente 5 veces hasta 25 veces, preferiblemente 10 veces hasta 20 veces. El agua con la que se mezcla la solución de proteína concentrada preferiblemente tiene una temperatura de 1° a 65°C, preferiblemente de 20° a 35°C.

15 En una operación discontinua, el lote de solución de proteína concentrada se añade a un cuerpo estático de agua que tiene el volumen deseado, como se ha discutido anteriormente. La dilución de la solución de proteína concentrada disminuye la fuerza iónica y provoca la formación del precipitado de proteína. En el procedimiento discontinuo, el precipitado de proteína se deja sedimentar en el cuerpo de agua. La sedimentación puede ser asistida, tal como por centrifugación. Dicha sedimentación inducida disminuye el contenido de humedad y el contenido de sal ocluido de la proteína precipitada.

20 Alternativamente, la operación de dilución puede llevarse a cabo de manera continua pasando continuamente la solución de proteína concentrada a través de una entrada de un tubo en forma de T, mientras que el agua de dilución es alimentada a la otra entrada del tubo en forma de T, permitiendo la mezcla en el tubo. El agua de dilución se alimenta al tubo en forma de T a una velocidad suficiente para conseguir el grado de dilución deseado de la solución de proteína concentrada.

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

30 En el procedimiento continuo, se deja que el precipitado proteico se deposite en el recipiente de sedimentación y se continúa el procedimiento hasta que se ha acumulado una cantidad deseada del precipitado en el fondo del recipiente de sedimentación, después de lo cual se remueve el precipitado acumulado del recipiente de sedimentación. En lugar de separación por sedimentación, el precipitado puede separarse continuamente por centrifugación.

35 Mediante la utilización de un proceso continuo para la recuperación del precipitado de proteína de soja en comparación con el proceso discontinuo, la etapa de extracción inicial de proteína puede reducirse significativamente en tiempo 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 el proceso puede llevarse a cabo en un equipo más compacto.

40 El precipitado sedimentado se separa de la fase acuosa residual o sobrenadante, por ejemplo por decantación de la fase acuosa residual de la masa sedimentada o por centrifugación. El precipitado se puede lavar para eliminar el sobrenadante residual, por ejemplo con 1 a 10, preferiblemente 2 a 3 volúmenes de agua y luego se recupera de nuevo el precipitado, como anteriormente. El precipitado opcionalmente lavado se puede usar en forma húmeda o puede secarse, mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por pulverización o liofilización, hasta una forma seca. El precipitado seco tiene un alto contenido de proteína, más del 60% en peso de proteína, preferiblemente al menos 90% en peso de proteína (N x 6,25), y más preferiblemente al menos 100% en peso (N x 6,25).

45 El sobrenadante que surge de la etapa de dilución puede secarse para proporcionar un producto de proteína de soja. Alternativamente, puede procesarse el sobrenadante para disminuir el contenido de impurezas del mismo y/o la actividad inhibitoria de tripsina del mismo, por cualquier medio conveniente tal como ajuste de pH y/o tratamiento

térmico y/o procesamiento a través de membrana. El sobrenadante procesado puede entonces secarse para proporcionar un producto de proteína de soja.

Como se mencionó anteriormente, el precipitado de proteína sedimentado formado en la etapa de dilución puede secarse directamente para producir el producto proteico. Alternativamente, el precipitado de proteína húmeda puede ser resuspendido en agua, tal como 2 a 3 volúmenes, y volver a solubilizarlo ajustando el pH de la muestra a 1,5 a 4,4, preferiblemente 2,0 a 4,0, usando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico. La solución de proteína resolubilizada puede ser secada luego mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por pulverización o liofilización hasta una forma seca. El producto de proteína seca tiene un contenido de proteína superior al 60% en peso de proteína, preferiblemente al menos 90% en peso de proteína, más preferiblemente al menos 100% en peso de proteína (N x 6,25).

Como una alternativa adicional, la solución de proteína de soja resolubilizada puede someterse a un tratamiento térmico para inactivar cualquier resto de factores antinutricionales lábiles al calor. Dicha etapa de calentamiento también proporciona el beneficio adicional de reducir la carga microbiana. Generalmente, la solución de proteína se calienta a una temperatura de 70° a 160°C, preferiblemente de 80° a 120°C, más preferiblemente de 85° a 95°C, durante 10 segundos a 60 minutos, preferiblemente 30 segundos a 5 minutos. La solución de proteína de soja tratada térmicamente puede entonces enfriarse para un procesamiento adicional como se describe a continuación, a una temperatura de 2° a 65°C, preferiblemente de 20° a 35°C.

La solución de proteína resolubilizada y opcionalmente tratada térmicamente puede ser opcionalmente limpiada por cualquier medio conveniente, tal como por filtración, para eliminar cualquier partícula residual.

La solución de proteína transparente resolubilizada, opcionalmente tratada térmicamente, opcionalmente limpiada, puede concentrarse para aumentar la concentración de proteína de la misma. Tal concentración se efectúa usando cualquier técnica conveniente de membrana selectiva, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas con un corte de peso molecular adecuado que permite el paso de especies de bajo peso molecular, incluyendo sal, carbohidratos, pigmentos, inhibidores de tripsina y otros materiales de bajo peso molecular extraídos del material de la fuente de la proteína, a través de la membrana, mientras que retiene una proporción significativa de la proteína de soja en la solución. Se pueden usar membranas de ultrafiltración que tienen un corte de peso molecular de 3.000 a 1.000.000 Daltons, preferiblemente 5.000 a 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuración de la membrana. La concentración de la solución de proteína de esta manera también reduce el volumen de líquido que se necesita secar para recuperar la proteína. La solución de proteína generalmente se concentra hasta una concentración de proteína de 50 g/L a 300 g/L, preferiblemente de 100 a 200 g/L, antes del secado. Dicha operación de concentración puede llevarse a cabo en un modo discontinuo o en una operación continua, como se ha descrito anteriormente.

La solución de proteína de soja puede someterse a una etapa de diafiltración antes o después de la concentración completa usando agua. El agua puede estar a su pH natural o a un pH igual al de la solución de proteína que se diafiltra o a cualquier valor de pH entre ellos. Dicha diafiltración puede efectuarse utilizando de 2 a 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente de 5 a 25 volúmenes de solución de diafiltración. En la operación de diafiltración, se eliminan cantidades adicionales de contaminantes de la solución acuosa transparente de proteína de soja mediante el paso a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración puede efectuarse hasta que no existan cantidades adicionales significativas de contaminantes o color visible en el permeado o hasta que la fracción retenida haya sido suficientemente purificada para, cuando se haya secado, proporcionar un producto de proteína de soja con el contenido de proteína deseado, preferiblemente un aislado con un contenido de proteínas de al menos 90% en peso (N x 6,25) en base seca. Tal diafiltración puede efectuarse usando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración puede efectuarse utilizando una membrana separada con un corte de peso molecular diferente, tal como una membrana que tiene un corte de peso molecular en el intervalo de 3.000 a 1.000.000 Daltons, preferiblemente 5.000 a 100.000 Daltons, teniendo en cuenta diferentes materiales y configuración de membrana.

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración pueden efectuarse en este documento de tal manera que el producto de proteína de soja posteriormente recuperado por secado de la fracción retenida concentrada y diafiltrada contiene menos del 90% en peso de proteína (N x 6,25) en base seca, tal como al menos 60% en peso de proteína (N x 6,25) en base seca. Mediante la concentración parcial y/o la diafiltración parcial de la solución acuosa de proteína de soja, es posible eliminar sólo parcialmente los contaminantes. Esta solución de proteína puede ser entonces secada para proporcionar un producto de proteína de soja con niveles más bajos de pureza. El producto de proteína de soja es todavía capaz de producir soluciones de proteínas transparentes en condiciones ácidas.

Un antioxidante puede estar presente en el medio de diafiltración durante al menos parte de la etapa de diafiltración. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, tal como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleada en el medio de diafiltración depende de los materiales empleados y puede variar de 0,01 a 1% en peso, preferiblemente 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 de concentración opcional y la etapa opcional de diafiltración pueden efectuarse a cualquier temperatura conveniente, generalmente de 2° a 65°C, preferiblemente de 20° a 35°C, y durante el periodo de tiempo para efectuar el grado de concentración y diafiltración deseado. La temperatura y otras condiciones utilizadas en algún grado dependen del equipo de membrana usado para efectuar el procesamiento por membrana, la concentración de proteína deseada de la solución y la eficiencia de la eliminación de contaminantes al permeado.
- Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento térmico de la solución acuosa de proteína de soja re-solubilizada puede usarse para inactivar los inhibidores de tripsina restantes sensibles al calor. La solución de proteína de soja re-solubilizada parcialmente concentrada o completamente concentrada también puede ser tratada térmicamente para inactivar inhibidores de la tripsina sensibles al calor.
- 10 Además, las etapas de concentración y/o diafiltración pueden ser operadas de una manera favorable para la eliminación de inhibidores de tripsina en el permeado junto con los otros contaminantes. La eliminación de los inhibidores de tripsina se promueve utilizando una membrana de mayor tamaño de poro, tal como de 30.000 a 1.000.000 Daltons, operando la membrana a temperaturas elevadas, tales como de 30° a 65°C y empleando mayores volúmenes de medio de diafiltración, tales como 20 a 40 volúmenes.
- 15 La membrana que procesa la solución de proteína a un pH inferior (1,5 a 3) puede reducir la actividad del inhibidor de la tripsina con respecto al procesamiento de la solución a pH más alto (3 a 4,4). Cuando la solución de proteína se concentra y se diafiltra en el extremo inferior del intervalo de pH, puede ser deseable elevar el pH de la fracción retenida antes del secado. El pH de la solución de proteína concentrada y diafiltrada puede aumentarse hasta el valor deseado, por ejemplo, pH 3, mediante la adición de cualquier álcali conveniente de calidad alimentaria tal como hidróxido de sodio.
- 20 Además, puede conseguirse una reducción en la actividad inhibidora de tripsina exponiendo materiales de soja a agentes reductores que alteran o reordenan los enlaces disulfuro de los inhibidores. Los agentes reductores adecuados incluyen sulfito de sodio, cisteína y N-acetilcisteína.
- 25 La adición de tales agentes reductores puede efectuarse en diversas etapas del proceso total. El agente reductor puede añadirse al precipitado de proteína húmeda resultante de la etapa de dilución, puede añadirse a la solución de proteína formada re-solubilizando el precipitado, se puede añadir a la solución concentrada antes o después de la diafiltración o puede mezclarse en seco con el producto deshidratado de proteína de soja. La adición del agente reductor puede combinarse con una etapa de tratamiento térmico y las etapas de procesamiento por membrana, como se ha descrito anteriormente.
- 30 Si se desea retener los inhibidores de tripsina activos restantes en la solución de proteína concentrada, esto se puede conseguir eliminando o reduciendo la intensidad de la etapa de tratamiento térmico, sin utilizar agentes reductores, operando las etapas de concentración y diafiltración en el extremo superior del intervalo de pH (3 a 4,4), utilizando una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro más pequeño, operando la membrana a temperaturas más bajas y empleando menos volúmenes de medio de diafiltración.
- 35 La solución acuosa de proteína re-solubilizada, opcionalmente concentrada y opcionalmente diafiltrada puede tratarse con un adsorbente, tal como carbón activado en polvo o carbón activado granulado, para eliminar compuestos de color y/o olor. Dicho tratamiento adsorbente puede llevarse a cabo en cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura ambiente de la solución de proteína. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de 0,025% a 5% p/v, preferiblemente 0,05% a 2% p/v. El adsorbente puede retirarse de la solución de proteína de soja por cualquier medio conveniente, tal como por filtración.
- 40 La solución acuosa de proteína de soja re-solubilizada, opcionalmente concentrada y opcionalmente diafiltrada, puede ser secada por cualquier técnica conveniente, tal como secado por atomización o liofilización. El producto de proteína de soja seca tiene un contenido en proteínas de al menos 60% en peso (N x 6,25) en base seca, preferiblemente superior al 90% en peso (N x 6,25) en base seca, más preferiblemente al menos 100% en peso (N x 6,25) en base seca.
- 45 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la mezcla de solución de proteína concentrada y agua de dilución puede procesarse sin una etapa de fraccionamiento. En tal caso, el grado de dilución es generalmente de aproximadamente 1 a 25 veces, preferiblemente de 3 a 12 veces. El agua con la que se mezcla la solución de proteína concentrada tiene una temperatura de 1° a 65°C, preferiblemente 20°C a 35°C.
- 50 El agua de dilución, que contiene el precipitado de proteína depositado, se ajusta a un pH de 1,5 a 4,4, preferiblemente de 2,0 a 4,0, usando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico. El ajuste en el pH causa la resolubilización de la proteína depositada por dilución. La solución de proteína puede usarse en forma húmeda o puede secarse, mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por atomización o liofilización, hasta una forma seca.

Como una alternativa adicional, la solución de proteína formada por el pH que ajusta la mezcla de precipitado de proteína y sobrenadante se puede procesar utilizando los mismos etapas descritos anteriormente para el precipitado aislado resolubilizado por ajuste de pH.

5 La solución acuosa de proteína de soja opcionalmente concentrada, opcionalmente diafiltrada, opcionalmente tratada térmicamente, opcionalmente limpiada, opcionalmente tratada con adsorbente puede ser luego secada mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por atomización o liofilización. El producto seco de proteína de soja tiene un contenido de proteína superior al 60% en peso de proteína, preferiblemente al menos 90% en peso, más preferiblemente 100% en peso (N x 6,25) en base seca.

10 Los productos de proteína de soja producidos en la presente invención son solubles en un entorno acuoso ácido, haciendo que el producto sea ideal para su incorporación en bebidas, tanto carbonatadas como no carbonatadas, para proporcionar fortificación con proteínas a las mismas. Tales bebidas tienen una amplia gama de valores de pH ácido, que oscilan entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 5. Los productos de proteína de soja proporcionados en la presente memoria pueden añadirse a tales bebidas en cualquier cantidad conveniente para proporcionar fortificación con proteínas a tales bebidas, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 g de la proteína de soja por porción. El producto de proteína de soja añadido se disuelve en la bebida y no perjudica la transparencia de la bebida, incluso después del procesamiento térmico. El producto de proteína de soja puede mezclarse con una bebida seca antes de la reconstitución de la bebida por disolución en agua. En algunos casos, la modificación de la formulación normal de las bebidas para tolerar la composición de la invención puede ser necesaria cuando los componentes presentes en la bebida pueden afectar negativamente la capacidad de la composición de permanecer disuelta en la bebida.

20 Ejemplos

Ejemplo comparativo 1:

Este ejemplo comparativo ilustra la preparación de soluciones proteicas transparentes térmicamente estables utilizando la extracción con solución de cloruro de calcio a pH bajo.

25 Se combinaron hojuelas blancas de soja (10 g) con solución de cloruro de calcio 0,15 M (100 ml) y se ajustó inmediatamente el pH de las muestras a 4,8 y 1,5 con HCl. Las muestras se extrajeron a temperatura ambiente durante 30 minutos usando un agitador magnético. El pH de las muestras se controló y se ajustó dos veces durante la extracción de 30 minutos. El extracto se separó de la harina gastada por centrifugación a 10.200 g durante 10 minutos y se clarificaron adicionalmente los centrifugados mediante filtración utilizando papel de filtro de tamaño de poro de 25 µm. La transparencia de los filtrados se midió usando un HunterLab ColorQuest XE operado en modo de transmisión para suministrar una lectura de turbidez en porcentaje. Las muestras se diluyeron después con un volumen de agua purificada por ósmosis inversa y se midió nuevamente el nivel de turbidez. El pH de las muestras diluidas se ajustó a continuación a 3 utilizando ya sea HCl o NaOH según fuera necesario. A continuación se analizó el nivel de turbidez de las muestras ajustadas al pH. A continuación, las muestras se sometieron a tratamiento térmico a 95°C durante 30 segundos, se enfriaron inmediatamente a temperatura ambiente en agua con hielo y se reevaluó el nivel de turbidez.

35 Los valores de turbidez determinados para las diversas muestras se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1 - Valores de turbidez para el tratamiento de muestras de extracción con solución de cloruro de calcio a pH 1,5

muestra	turbidez (%)
filtrado	27,8
Filtrado diluido	17,1
filtrado diluido a pH 3	16,8
filtrado diluido a pH 3 después de tratamiento térmico	10,4

Tabla 2 - Valores de turbidez para el tratamiento de muestras de extracción con solución de cloruro de calcio a pH 4,8

muestra	turbidez (%)
filtrado	36,2
filtrado diluido	99,1
filtrado diluido a pH 3	8,4
filtrado diluido a pH 3 después de tratamiento térmico	6,0

5 Como puede observarse a partir de los resultados presentados en las Tablas 1 y 2, los filtrados iniciales eran algo turbios, sin embargo se pudo haber obtenido una mejor transparencia mediante la utilización de un filtro más fino. La dilución con un volumen de agua mejoró la transparencia de la muestra de pH 1,5 pero introdujo precipitación en la muestra de pH 4,8. El ajuste del pH de las muestras diluidas a 3 produjo una buena transparencia a la muestra que originalmente estaba a pH 4,8, mientras que la muestra que originalmente estaba a pH 1,5 tuvo tal vez una ligera turbidez. Después del tratamiento térmico, ambas muestras se consideraron transparentes.

Ejemplo comparativo 2:

10 Este Ejemplo ilustra la preparación de un aislado de proteína de soja.

15 Se añadieron 20 Kg de harina de soja desgrasada, tratada térmicamente mínimamente a 200 L de solución de cloruro de calcio 0,15 M a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos para proporcionar una solución acuosa de proteína. Inmediatamente después de dispersar la harina en la solución de cloruro de calcio, se ajustó el pH del sistema a 3 mediante la adición de HCl diluido. El pH se controló y se corrigió a 3 periódicamente durante el transcurso de la extracción de 30 minutos. La harina de soja residual se eliminó por centrifugación para producir 174 L de solución de proteína con un contenido de proteína de 3,37% en peso. La solución de proteína se combinó a continuación con 174 L de agua purificada por ósmosis inversa y el pH se corrigió a 3. Esta solución se limpió después mediante filtración para producir 385 L de solución de proteína filtrada que tenía un contenido de proteína de 1,21% en peso.

20 La solución de proteína filtrada se redujo en volumen hasta 25 L por concentración en una membrana de PVDF que tenía un corte de peso molecular de 5.000 Daltons. La solución de proteína concentrada se diafiltró a continuación con 125 L de agua purificada por ósmosis inversa. La solución de proteína concentrada diafiltrada resultante tenía un contenido de proteína de 14,51% en peso y representaba un rendimiento de 81,3% en peso de la solución de proteína filtrada. La solución de proteína concentrada diafiltrada se secó entonces para producir un producto que se encontró que tenía un contenido de proteína de 99,18% (N x 6,25) en base seca. El producto se denominó S005-A13-09A S703.

25 Se disolvió suficiente S005-A13-09A S703 para suministrar 0,48 g de proteína en 15 mL de agua purificada por ósmosis inversa y se evaluó el color y la transparencia de la solución utilizando un instrumento HunterLab Color Quest XE operado en modo de transmisión. El pH de la solución se midió con un medidor de pH.

Los valores de pH, color y transparencia se exponen en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3: Valores de pH y de HunterLab para la solución de S005-A13-09A S703

muestra	pH	L*	a*	b*	turbidez (%)
S703	3,12	87,31	0,67	18,99	43,9

30 Como puede observarse en la Tabla 3, la solución de S703 en agua era semitransparente, no transparente. El nivel relativamente alto de turbidez en esta muestra dio como resultado que el valor de L* fuera algo más bajo de lo esperado.

35 El color del polvo seco se evaluó también con el instrumento HunterLab Color Quest XE en modo de reflectancia. Los valores de color se exponen en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4- Valores de HunterLab para el polvo seco de S005-A13-09A S703

muestra	L*	a*	b*
S703	85,67	0,05	10,57

Como puede observarse en la Tabla 4, el producto seco era de color muy claro.

Ejemplo comparativo 3:

- 5 Este ejemplo comparativo contiene una evaluación de la estabilidad térmica en agua del aislado de proteína de soja producido por el método del ejemplo comparativo 2 (S703).

10 Se preparó una disolución de S005-A13-09A S703 disolviendo suficiente proteína en polvo para suministrar 0,8 g de proteína en 40 mL de agua RO, luego se ajustó el pH a 3. Se evaluó la transparencia de esta solución mediante medición de turbidez con el Instrumento HunterLab ColorQuest XE. La solución se calentó después a 95°C, se mantuvo a esta temperatura durante 30 segundos y después se enfrió inmediatamente a temperatura ambiente en un baño de hielo. La transparencia de la solución tratada térmicamente se midió nuevamente.

La transparencia de la solución de proteína antes y después del calentamiento se expone en la siguiente Tabla 5:

Tabla 5- Efecto del tratamiento térmico sobre la transparencia de la solución de S005-A13-09A S703

muestra	turbidez (%)
antes de calentamiento	43,6
después de calentamiento	30,7

- 15 Como puede observarse a partir de los resultados de la Tabla 5, se encontró que la solución inicial de S005-A13-09A S703 era bastante turbia. Sin embargo, la solución era térmicamente estable, con el nivel de turbidez realmente reducido en cierta medida por el tratamiento térmico.

Ejemplo comparativo 4:

- 20 Este ejemplo comparativo contiene una evaluación de la solubilidad en agua del aislado de proteína de soja producido por el método del ejemplo comparativo 2 (S703). Se ensayó la solubilidad con base en la solubilidad de la proteína (denominado método de proteína, una versión modificada del procedimiento de Morr et al., J. Food Sci. 50: 1715-1718) y la solubilidad total del producto (denominado método del precipitado).

25 Se pesó suficiente proteína en polvo para suministrar 0,5 g de proteína en un vaso de precipitados y después se añadió una pequeña cantidad de agua purificada por ósmosis inversa (RO) y la mezcla se agitó hasta formar una pasta suave. Se añadió entonces agua adicional para llevar el volumen hasta aproximadamente 45 mL. El contenido del vaso de precipitados se agitó luego lentamente durante 60 minutos usando un agitador magnético. El pH se determinó inmediatamente después de dispersar la proteína y se ajustó al nivel apropiado (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) con NaOH o HCl diluido. También se preparó una muestra a pH natural. Para las muestras ajustadas de pH, se midió el pH y se corrigió dos veces durante los 60 minutos de agitación. Después de los 60 minutos de agitación, las muestras se llevaron hasta un volumen total de 50 mL con agua RO, produciendo una dispersión de proteína al 1% p/v. El contenido de proteína de las dispersiones se midió usando un determinador de nitrógeno Leco FP528. Después se transfirieron alícuotas (20 mL) de las dispersiones a tubos de centrifuga previamente pesados que se habían secado durante la noche en un horno a 100°C y luego se enfriaron en un desecador y se taparon los tubos. Las muestras se centrifugaron a 7,800 g durante 10 minutos, lo que sedimentó material insoluble y produjo un sobrenadante claro. Se midió el contenido de proteína del sobrenadante mediante análisis Leco y luego se desecharon el sobrenadante y las tapas de los tubos y se secó durante la noche el material precipitado en un horno ajustado a 100°C. A la mañana siguiente los tubos se transfirieron a un desecador y se dejaron enfriar. Se registró el peso del material precipitado seco. El peso seco del polvo de proteína inicial se calculó multiplicando el peso de polvo utilizado por un factor de $((100 - \text{contenido de humedad del polvo (\%)} / 100)$. La solubilidad del producto se calculó entonces de dos maneras diferentes:

- 1) Solubilidad (método de proteína) (%) = (% de proteína en el sobrenadante/% de proteína en la dispersión inicial) x 100
- 2) Solubilidad (método del precipitado) (%) = (1 – (peso seco del material precipitado insoluble/((peso de 20 mL de la dispersión/peso de 50 mL de la dispersión) x peso seco inicial de la proteína en polvo))) x 100

5

El valor de pH natural del aislado de proteína producido en el ejemplo comparativo 1 en agua (1% de proteína) se muestra en la Tabla 6:

Tabla 6: pH natural de la solución de S703 preparada en agua con 1% de proteína

Lote	producto	pH natural
S005-A13-09A	S703	3,36

- 10 Los resultados de solubilidad obtenidos se exponen en las siguientes Tablas 7 y 8:

Tabla 7 - Solubilidad de S703 a diferentes valores de pH con base en el método de la proteína

Lote	Producto	Solubilidad (método de la proteína) (%)						
		pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH natural
S005-A13-09A	S703	95,8	100	81,7	0,0	71,7	100	100

Tabla 8 - Solubilidad de S703 a diferentes valores de pH basados en el método del precipitado

Lote	Producto	Solubilidad (método proteína) (%)						
		pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH natural
S005- A13-09A	S703	95,9	95,9	83,8	11,9	69,2	96,0	95,2

- 15 Como puede observarse a partir de los resultados de las Tablas 7 y 8, el producto S703 era altamente soluble a los valores de pH 2, 3 y 7 así como al pH natural. La solubilidad fue ligeramente inferior a pH 4.

Ejemplo comparativo 5:

Este ejemplo comparativo contiene una evaluación de la transparencia en agua del aislado de proteína de soja producido por el método del ejemplo comparativo 2 (S703).

- 20 La transparencia de las soluciones de proteína al 1% p/v preparadas como se describió en el ejemplo comparativo 4 se evaluó midiendo la absorbancia a 600 nm, con valor de absorbancia menor que indica una mayor transparencia. El análisis de las muestras en un instrumento HunterLab ColorQuest XE en modo de transmisión también proporcionó una lectura de turbidez en porcentaje, otra medición de la transparencia.

Los resultados de transparencia se exponen en las siguientes Tablas 9 y 10:

Tabla 9 - Transparencia de la solución de S703 a diferentes valores de pH según se evaluó mediante A600

Lote	Producto	A600						
		pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH natural
S005- A13-09A	S703	0,098	0,152	1,381	> 3,0	1,876	0,155	0,192

Tabla 10 - Transparencia de la solución de S703 a diferentes valores de pH según se evaluó mediante el análisis de HunterLab

Lote	Producto	Lecturas de turbidez de HunterLab (%)						
		pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH natural
S005-A13-09A	S703	12,0	20,8	86,3	91,6	90,0	19,7	29,8

- 5 Como puede observarse a partir de los resultados de las Tablas 9 y 10, las soluciones de S703 eran transparentes a ligeramente turbias a pH 2-3. También se obtuvo una solución ligeramente turbia a pH 7.

Ejemplo comparativo 6:

- 10 Este ejemplo comparativo contiene una evaluación de la solubilidad en un refresco (Sprite) y una bebida deportiva (Gatorade Naranja) del aislado de proteína de soja producido por el método del ejemplo comparativo 2 (S703). La solubilidad se determinó con la proteína añadida a las bebidas sin corrección de pH y de nuevo con el pH de las bebidas fortificadas con proteína ajustado al nivel de las bebidas originales.

- 15 Cuando se evaluó la solubilidad sin corrección de pH, se pesó una cantidad suficiente de proteína en polvo para suministrar 1 g de proteína en un vaso de precipitados y se añadió una pequeña cantidad de bebida y se agitó hasta que se formó una pasta suave. Se añadió bebida adicional para llevar el volumen hasta 50 ml, y luego se agitaron las soluciones lentamente en un agitador magnético durante 60 minutos para producir una dispersión de proteína al 2% p/v. El contenido de proteína de las muestras se analizó usando un determinador de nitrógeno Leco FP528, después se centrifugó una alícuota de las bebidas que contenían proteínas a 7.800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante.

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

- 20 Cuando se evaluó la solubilidad con corrección de pH, se midió el pH del refresco (Sprite) (3,39) y de la bebida deportiva (Gatorade Naranja) (3,19) sin proteína. Se pesó una cantidad suficiente de proteína en polvo para suministrar 1 g de proteína en un vaso de precipitados y se añadió una pequeña cantidad de bebida y se agitó hasta formar una pasta suave. Se añadió bebida adicional para llevar el volumen hasta aproximadamente 45 mL, y luego se agitaron las
- 25 proteínas lentamente en un agitador magnético durante 60 minutos. Se midió el pH de las bebidas que contenían proteína y después se ajustó al pH original sin proteína con HCl o NaOH según fuera necesario. El volumen total de cada solución se llevó entonces hasta 50 mL con bebida adicional, produciendo una dispersión de proteína al 2% p/v. El contenido proteico de las muestras se analizó usando un determinador de nitrógeno Leco FP528, después se centrifugó una alícuota de las bebidas que contenían proteína a 7.800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante.

- 30
$$\text{Solubilidad (\%)} = (\% \text{ de proteína en el sobrenadante} / \% \text{ de proteína en la dispersión inicial}) \times 100$$

Los resultados obtenidos se exponen en la siguiente Tabla 11:

Tabla 11 - Solubilidad de S703 en Sprite y Gatorade Naranja

Lote	Producto	sin corrección de pH		con corrección de pH	
		Solubilidad (%) en Sprite	Solubilidad (%) en Gatorade Naranja	Solubilidad (%) en Sprite	Solubilidad (%) en Gatorade Naranja
S005 - A13 - 09A	S703	94,8	100	99,0	93,6

5 Como puede observarse a partir de los resultados de la Tabla 11, el S703 era altamente soluble en la Sprite y el Gatorade Naranja. Como S703 es un producto acidificado, la adición de proteína tuvo poco efecto sobre el pH de la bebida.

Ejemplo comparativo 7:

Este ejemplo comparativo contiene una evaluación de la transparencia en un refresco y una bebida deportiva del aislado de proteína de soja producido por el método del ejemplo comparativo 2 (S703).

10 La transparencia de las dispersiones de proteína al 2% p/v preparadas en refresco (Sprite) y bebida deportiva (Gatorade Naranja) en el ejemplo comparativo 6 se evaluaron usando los métodos descritos en el ejemplo comparativo 5. Para las mediciones de absorbancia a 600 nm, se preparó un blanco del espectrofotómetro con la bebida apropiada antes de realizar la medición.

Los resultados obtenidos se exponen en las siguientes Tablas 12 y 13:

Tabla 12 - Transparencia (A600) de S703 en Sprite y Gatorade Naranja

Lote	Producto	sin corrección de pH		con corrección de pH	
		A600 en Sprite	A600 en Gatorade Naranja	A600 en Sprite	A600 en Gatorade Naranja
S005 - A13 - 09A	S703	0,460	0,404	0,471	0,539

15

Tabla 13 - Lecturas de la turbidez HunterLab para S703 en Sprite y Orange Gatorade

Lote	Producto	sin corrección de pH		con corrección de pH	
		turbidez (%) en Sprite	turbidez (%) en Gatorade Naranja	turbidez (%) en Sprite	turbidez (%) en Gatorade Naranja
sin proteína		0,0	44,0	0,0	44,0
S005 - A13 - 09A	S703	58,5	74,3	55,6	79,5

20 Como puede observarse a partir de los resultados de las Tablas 12 y 13, los buenos resultados de solubilidad obtenidos para el S703 en la Sprite y el Gatorade Naranja no se tradujeron en transparencia en estas bebidas. De hecho, las soluciones resultantes eran bastante turbias.

Ejemplo 8:

Este Ejemplo ilustra la preparación de aislados de proteína de soja de acuerdo con la invención.

5 Se añadieron 100 g de hojuelas blancas de soja desgrasada a 1000 mL de solución de CaCl_2 0,15 M a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos para proporcionar una solución acuosa de proteína. Inmediatamente después de humedecer las hojuelas con la solución de cloruro de calcio, el pH del sistema se ajustó a 4,5 con una solución de ácido clorhídrico. El pH se controló y se corrigió periódicamente a lo largo de la extracción de 30 minutos. Después de la etapa de extracción, se eliminaron las hojuelas blancas de soja residual y se clarificó la solución de proteína resultante por centrifugación y filtración para producir 578 mL de solución de proteína filtrada que tenía un contenido de proteína de 2,05% en peso.

10 Se redujeron 530 mL de la solución de extracto de proteína hasta 45 mL en una membrana de polietersulfona que tenía un corte de peso molecular de 10.000 Daltons, produciendo una solución de proteína concentrada con un contenido de proteína de 19,40% en peso. La solución de proteína concentrada se dividió luego en dos porciones.

15 Se diluyeron 20 mL de la solución de proteína concentrada a 24°C se diluyó en 200 mL de agua purificada por ósmosis inversa (RO) con una temperatura de 24°C. Se formó una nubosidad blanca y se dejó sedimentar. A continuación, la muestra se centrifugó para separar el precipitado de proteína de la fracción sobrenadante. Se recogieron 5,72 g de precipitado de proteína húmeda y después se resolubilizó en 20 mL de agua RO con solución de HCl añadida para reducir el pH a 2,99. El precipitado de proteína resolubilizado, recuperado con un rendimiento de 23,8% en peso de la solución de proteína filtrada, se liofilizó para proporcionar un producto que se denominó S703-7300. Se encontró que el producto seco tenía un contenido de proteína de 101,75% (N x 6,25) en base seca

20 Se diluyeron otros 21 mL de la solución de proteína concentrada a 24°C en 210 mL de agua RO con una temperatura de 24°C. El pH de la muestra se redujo luego de 4,76 a 2,98 con solución de HCl. Se redujeron 220 mL de la solución acidificada hasta un volumen de 33 mL sobre una membrana de polietersulfona que tenía un corte de peso molecular de 10.000 Daltons, produciendo una solución de proteína concentrada con un contenido de proteína de 9,76% en peso. Esta solución de proteína concentrada, recuperada con un rendimiento de 30,1% en peso de la solución de proteína filtrada, se liofilizó para proporcionar un producto denominado S703-7301. Se encontró que el producto seco tenía un contenido de proteína de 92,21% (N x 6,25) en base seca.

25 Se prepararon soluciones de S703-7300 y S703-7301 disolviendo suficiente polvo para suministrar 0,48 g de proteína en 15 mL de agua RO. El color y la transparencia de las soluciones se evaluaron utilizando un HunterLab ColorQuest XE operado en modo de transmisión. El pH de las soluciones se midió con un medidor de pH.

Los valores de pH, color y transparencia se exponen en la siguiente Tabla 14.

Tabla 14 - Valores de pH y HunterLab para las soluciones S703-7300 y S703-7301

muestra	pH	L*	a*	b*	turbidez (%)
S703-7300	2,83	88,67	0,71	15,57	38,9
S703-7300	3.10	88.71	0.80	14.84	30.8

30

Como puede observarse a partir de los resultados presentados en la Tabla 14, las soluciones de S703-7300 y S703-7301 fueron translúcidas y de color claro.

Ejemplo 9:

35 Este Ejemplo ilustra la generación de un precipitado de proteína tras la dilución de soluciones proteicas concentradas preparadas a pH bajo y luego ajustado en pH antes de la etapa de dilución.

40 Se añadieron 100 g de hojuelas blancas de soja desgrasada a 1000 mL de disolución de CaCl_2 0,15 M a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos para proporcionar una solución acuosa de proteína. Inmediatamente después de que la hojuelas se humedecieran con la solución de cloruro de calcio, el pH del sistema se ajustó a 3,0 con una solución de ácido clorhídrico. El pH se controló y se corrigió periódicamente a lo largo de la extracción de 30 minutos. Después de la etapa de extracción, se eliminaron las hojuelas blancas de soja residual y se clarificó la solución de proteína resultante por centrifugación y filtración para producir 568 mL de solución de proteína filtrada que tenía un contenido de proteína de 2,78% en peso.

45 Se redujeron 550 mL de la solución de extracto de proteína hasta 84 mL en una membrana de polietersulfona que tenía un corte de peso molecular de 10.000 Daltons, produciendo una solución de proteína concentrada con un contenido de proteína de 15,18% en peso.

5 La fracción retenida por ultrafiltración, que tenía un pH de 3,11, se dividió en alícuotas y el pH se ajustó con NaOH 6 M y HCl 0,5 M según fuera necesario hasta aproximadamente 4, 5, 6 ó 7. Se midió el contenido de proteína de las muestras de la fracción retenida ajustadas al pH. Las alícuotas de las muestras de fracción retenida ajustadas al pH se clarificaron por centrifugación a 7.800 g durante 10 minutos, después se determinó el contenido de proteína de los centrifugados. Se diluyeron alícuotas adicionales de las muestras de fracciones retenidas ajustadas al pH con 10 volúmenes de agua RO, se mezclaron con agitación tipo vórtice y se determinó el pH, la conductividad, A600 y el contenido de proteína de las muestras diluidas. Las muestras diluidas se clarificaron por centrifugación a 7.800 g durante 10 minutos, después se determinó el contenido de proteína del concentrado.

10 La elevación del pH de las fracciones retenidas provocó que todas las muestras se volvieran más turbias, independientemente del pH final. La determinación del contenido de proteína antes y después de la clarificación indicó que aproximadamente el 20% de la proteína en la muestra se precipitó mediante el ajuste del pH. (Tabla 15).

Tabla 15 - Contenido de proteína de muestras de fracción retenida ajustadas a pH antes y después de la clarificación

fracción retenida ajustado al pH	A600 antes de clarificación	% p/p de proteína antes de clarificación	% p/p de proteína después de clarificación	% proteína precipitada por ajuste de pH
3,11	0,437	15,18	15,54	0,00
4,00	2,667	15,13	12,06	20,3
5,01	2,879	14,94	11,75	21,4
6,04	2,877	15,02	11,99	20,2
7,00	2,889	14,91	12,03	19,3

15 La dilución de las muestras de fracciones retenidas ajustadas a pH dio como resultado muestras que estaban muy turbias, particularmente cuando la fracción retenida estaba a pH 4 y superior (Tabla 16). El análisis de la concentración de proteínas de las muestras, antes y después de la clarificación indicó que se precipitó alguna proteína a todos los valores de pH, pero particularmente cuando el pH de la fracción retenida era 4 o mayor antes de la etapa de dilución. El alto grado de precipitación de proteínas en las muestras de pH 4-7 indica que la etapa de dilución está introduciendo precipitación de proteínas más allá de la inducida por el ajuste de pH.

20 Tabla 16 - Propiedades de las muestras de retentado ajustadas por pH (sin clarificación) después de la dilución

fracción retenida ajustado a pH	pH	Conductividad (mS)	A600	% p/p proteína (sin clarificar)	% p/p proteína después de clarificación	% p/p proteína precipitada por dilución
3,11	3,34	3,27	1,625	1,33	0,89	33,1
4,00	4,36	3,02	2,601	1,01	0,08	92,1
5,01	5,25	2,82	2,425	0,96	0,02	97,9
6,04	6,24	2,96	2,574	0,99	0,12	87,9
7,00	7,03	2,90	2,706	1,13	0,13	88,5

Resumen de la divulgación

25 En resumen de esta descripción, la presente invención proporciona un método para producir un aislado de proteína de soja que es soluble en medio ácido, con base en la extracción de un material que sirve de fuente de proteína de soja usando solución acuosa de cloruro de calcio a pH bajo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de soja de al menos 60% en peso (N x 6,25) en base seca, que comprende:
- 5 (a) extraer una fuente de proteína de soja con una solución acuosa de sal de calcio a un pH de 1,5 a 5 para provocar la solubilización de la proteína de soja de la fuente de proteína de soja y formar una solución acuosa de proteína de soja,
- (b) separar al menos parcialmente la solución acuosa de proteína de soja de la fuente de proteína de soja residual,
- (c) concentrar la solución acuosa de proteína de soja manteniendo al mismo tiempo su fuerza iónica sustancialmente constante para producir una solución de proteína de soja concentrada que tiene una concentración de proteína de 50 a 300 g/L y la solución de proteína de soja concentrada es opcionalmente diafiltrada,
- 10 (d) diluir la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada para formar un precipitado, y o bien
- (A) (e) (i) separar el precipitado del sobrenadante del mismo, y
- (f) (i) secar el precipitado separado para proporcionar el producto de proteína de soja o solubilizar el precipitado en agua a pH bajo para formar una solución de proteína de soja, que se seca opcionalmente para proporcionar el producto de proteína de soja, o
- 15 (B) (e) (ii) volver a solubilizar el precipitado en el agua de dilución mediante ajuste de pH para formar una solución de proteína de soja, y
- (f) (ii) secar opcionalmente la solución de proteína de soja para formar el producto de proteína de soja.
2. El procedimiento reivindicado en la reivindicación 1, en donde dicha etapa de extracción se efectúa usando una solución acuosa de cloruro de calcio que contiene opcionalmente un antioxidante y que tiene una concentración de 20 menos de 1,0 M, preferiblemente de 0,10 a 0,15 M, a una temperatura de 15° a 35°C, para proporcionar 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.
3. El procedimiento reivindicado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde, después de dicha etapa de separación,
- 25 (I), dicha solución acuosa de proteína de soja se trata con un adsorbente para eliminar los compuestos de color y/o olor de la solución acuosa de proteína de soja, y/o
- (II) se ajusta el pH de la solución acuosa de proteína a un valor diferente dentro del intervalo de 1,5 a 5,0, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, y/o dicha solución acuosa de proteína de soja se diluye hasta una conductividad de menos de 90 mS preferiblemente utilizando de 0,5 a 10 volúmenes de diluyente acuoso, tal como agua o solución salina diluida, para proporcionar una conductividad de dicha solución de proteína de soja de 4 a 30 31 mS, teniendo dicho diluyente acuoso una temperatura de 2°C a 70°C, preferiblemente de 15° a 65°C, más preferiblemente de 20° a 35°C.
4. El procedimiento reivindicado en la reivindicación 3, en donde, después de dicha etapa de dilución, el pH de la solución acuosa de proteína se ajusta a un valor diferente dentro del intervalo de 1,5 a 5,0, preferiblemente de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0.
- 35 5. El procedimiento reivindicado en la reivindicación 4, en donde dicha solución de proteína de soja, después de las etapas de dilución y ajuste de pH, tiene una conductividad de menos de 95 mS, preferiblemente de 4 a 36 mS.
6. Un procedimiento como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde dicha solución concentrada de proteína de soja tiene una concentración de proteína de 100 a 200 g/L y dicha etapa de concentración se efectúa por ultrafiltración usando una membrana que tiene un corte de peso molecular de 3.000 a 1.000.000 Daltons, 40 preferiblemente 5.000 a 100.000 Daltons, y
- en donde se efectúa una etapa de diafiltración utilizando agua, solución salina diluida, agua acidificada o solución salina diluida acidificada sobre la solución de proteína de soja antes o después de su concentración parcial o completa, utilizando 2 a 40 volúmenes de solución de diafiltración, preferiblemente de 5 a 25 volúmenes,
- 45 en donde dicha diafiltración se efectúa hasta que no queden cantidades significativas adicionales de contaminantes o de color visible en el permeado, y

en donde dicha diafiltración se efectúa hasta que la fracción retenida ha sido suficientemente purificada de modo que, cuando se seca, proporciona un aislado de proteína de soja con un contenido de proteína de al menos 90% en peso (N x 6,25) en base seca,

5 en donde dicha diafiltración se efectúa usando una membrana que tiene un corte de peso molecular de 3.000 a 1.000.000 Daltons, preferiblemente 5.000 a 100.000 Daltons,

estando opcionalmente presente un antioxidante en el medio de diafiltración durante al menos parte de la etapa de diafiltración,

siendo llevada a cabo dicha etapa de concentración y dicha etapa opcional de diafiltración a una temperatura de 2° a 65°C, preferiblemente de 20° a 35°C.

10 7. El procedimiento reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se ajusta en pH antes de la etapa de dilución a un pH de 1,5 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 7,0, más preferiblemente de 5,0 a 7,0

15 8. El procedimiento reivindicado en la reivindicación 7, en donde la dilución se efectúa de 5 a 25 veces, preferiblemente de 10 a 20 veces, con agua, el agua utilizada para efectuar la dilución tiene una temperatura de 1° a 65°C, preferiblemente de 20° a 35°C.

9. El procedimiento reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde, en la alternativa (A), el precipitado se lava con 1 a 10 volúmenes, preferiblemente 2 a 3 volúmenes de agua, y luego el precipitado se separa del sobrenadante y se seca para formar un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 90% en peso (N x 6,25) en base seca, preferiblemente 100% en peso (N x 6,25) en base seca

20 10. El procedimiento reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde, en la alternativa (A), el precipitado se solubiliza en agua, preferiblemente 2 a 3 volúmenes, a pH bajo, preferiblemente a un pH de 1,5 a 4,4, más preferiblemente de 2,0 a 4,0, para formar una solución de proteína de soja, que puede ser secada para formar un producto de proteína de soja que tiene un contenido en proteínas de al menos 90% en peso (N x 6,25) en base seca, preferiblemente 100% en peso (N x 6,25) en base seca

25 11. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde, en la alternativa (B), la solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se ajusta en pH antes de la etapa de dilución hasta un pH de 1,5 a 7,0, preferiblemente de 4,0 a 7,0, más preferiblemente de 5,0 a 7,0.

30 12. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde, en la alternativa (B), el precipitado se resolubiliza en el agua de dilución mediante el ajuste del pH de la mezcla posterior a la etapa de dilución a un pH de 1,5 a 4,4, preferiblemente de 2,0 a 4,0, siendo dicha dilución preferiblemente de 1 a 25 veces, preferiblemente de 3 a 12 veces, teniendo el agua utilizada para efectuar la dilución una temperatura de 1° a 65°C, preferiblemente de 20° a 35°C.

35 13. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde, en la alternativa (B), la solución de proteína de soja se seca para formar un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 90% en peso (N x 6,25) en base seca, preferiblemente 100% en peso (N x 6,25) en base seca.

14. Procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicha solución acuosa de proteína, solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada, y/o en la alternativa (A) o (B), dicha solución de proteína de soja, se somete a una etapa de tratamiento térmico para inactivar los factores antinutricionales sensibles a la temperatura, incluyendo los inhibidores de la tripsina sensibles a la temperatura,

40 en donde la etapa de tratamiento térmico también pasteuriza la solución acuosa de proteína de soja, siendo efectuado el tratamiento térmico a una temperatura de 70° a 160°C durante 10 segundos a 60 minutos, preferiblemente 80° a 120°C durante 10 segundos a 5 minutos, más preferiblemente de 85°C a 95°C durante 30 segundos a 5 minutos, y

en donde la solución de proteína de soja tratada térmicamente se enfría a una temperatura de 2° a 65°C, preferiblemente 20° a 35°C durante un procesamiento adicional, o

45 dicha solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada se pasteuriza antes del secado a una temperatura de 55 a 70°C durante 30 segundos a 60 minutos, preferiblemente de 60 a 65°C durante 10 a 15 minutos.

15. El procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde está presente un agente reductor durante dicha etapa de extracción, concentración y/o etapas opcionales de diafiltración y/o el producto de

proteína de soja seco para interrumpir o reordenar los enlaces disulfuro de inhibidores de tripsina para lograr una reducción en la actividad del inhibidor de la tripsina.