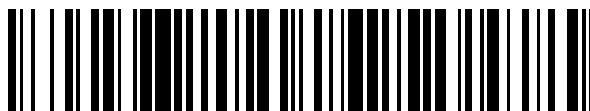


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 084**

51 Int. Cl.:

**A23J 1/14** (2006.01)

**A23J 3/16** (2006.01)

**A23L 2/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/CA2010/001016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11000097**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10793474 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2448424**

54 Título: **Producción de aislados de proteína de soja solubles en ácido ("S800")**

30 Prioridad:

**30.06.2009 US 213646 P**

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

**13.03.2018**

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 2 659 084 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 aislados de proteína de soja solubles en ácido ("S800")

Campo de la invención

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

5 Antecedentes de la invención

En las Solicitudes de Patente Provisionales de los Estados Unidos Nos. 61/107,112 (7865-373) presentada el 21 de octubre de 2008, 61/193,457 (7865-374) presentada el 2 de diciembre de 2008, 61/202,070 (7865-376) presentada el 26 de enero, 2009, 60/202,553 presentada el 12 de marzo de 2009 (7865-383), 61/213,717 (7865-389) presentada el 7 de julio de 2009, 61/272,241 (7865-400) presentada el 3 de septiembre de 2009 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 12/603,087 (7865-415) presentada el 21 de octubre de 2009 (Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2010-0098818), asignada al cesionario de la misma, se describe la preparación de un producto de proteína de soja, preferiblemente un aislado de proteína de soja, que es completamente soluble a bajos valores de pH y es capaz de proporcionar soluciones transparentes y estables al calor a valores de pH tan bajos. Este producto de proteína de soja se puede usar para el enriquecimiento de proteínas, en particular, refrescos y bebidas deportivas, así como otros sistemas acuosos ácidos, sin precipitación de proteína. El producto de proteína de soja se produce extrayendo una fuente de proteína de soja con solución acuosa de cloruro cálcico a pH natural, diluyendo opcionalmente la solución acuosa de proteína de soja resultante, ajustando el pH de la solución acuosa de proteína de soja a un pH de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4.4, de preferencia aproximadamente 2.0 a aproximadamente 4.0, para producir una solución de proteína de soja clara acidificada, que se puede concentrar opcionalmente y/o diafiltrar antes del secado.

Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado que un producto de proteína de soja de propiedades comparables se puede formar mediante un procedimiento que implica la extracción de la fuente de proteína de soja con agua seguido de la adición de cloruro de calcio a la solución de proteína extraída, después de la concentración tal como se define en las reivindicaciones. El precipitado formado después de la adición del cloruro de calcio se elimina antes del procesamiento posterior.

El producto de proteína de soja proporcionado en este documento es soluble a valores de pH ácido para proporcionar soluciones acuosas transparentes y termoestables de los mismos. El producto de proteína de soja puede usarse para el enriquecimiento proteico de, en particular, refrescos y bebidas deportivas, sin precipitación de proteína.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se provee un método para producir un producto de proteína de soja con un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) en base al peso seco (d.b.), preferiblemente al menos 90% en peso, más preferiblemente al menos 100% en peso, que comprende:

(a) extraer una fuente de proteína de soja con agua a una temperatura de al menos 1°C, preferiblemente de 15° a 35°C, para provocar la solubilización de proteína de soja en la fuente de proteína de soja y formar una solución de proteína acuosa que tenga un contenido de proteína de 5 a 50 g/l, preferiblemente de 10 a 50 g/l, y un pH de 1.5 a 11, preferiblemente de 5 a 7,

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

(c) aumentar la concentración de proteína de la solución de proteína acuosa de 50 a 400 g/l, preferiblemente de 100 a 250 g/l, mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva para proporcionar una solución de proteína concentrada,

(d) opcionalmente diafiltrar la solución de proteína concentrada,

(e) añadir solución de sal de calcio, preferiblemente solución acuosa de cloruro de calcio, a la solución de proteína concentrada a una conductividad de 5 mS a 30 mS, preferiblemente de 15 mS a 25 mS para provocar que se forme un precipitado en la solución de proteína concentrada,

(f) eliminar el precipitado de la solución de proteína concentrada,

(g) diluir la solución de proteína concentrada clarificada en 2 a 20 volúmenes de agua, preferiblemente de 10 a 15 volúmenes de agua, que tengan una temperatura de 2° a 90°C, preferiblemente de 10° a 50°C, más preferiblemente de 20° a 30°C,

(h) acidificar la solución resultante a un pH de 1.5 a 4.4, preferiblemente 2.0 a 4.0, para producir una solución de proteína clara acidificada,

(i) opcionalmente pulir la solución de proteína clara acidificada,

(j) aumentar la concentración de la solución de proteína clara acidificada de 50 a 300 g/l, preferiblemente de 100 a 200 g/l, mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva para proporcionar una segunda solución de proteína concentrada,

(k) opcionalmente diafiltrar la segunda solución de proteína concentrada, y

5 (l) opcionalmente secar la segunda solución de proteína concentrada para proporcionar un producto de proteína de soja que tenga un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) d.b., preferiblemente al menos 90% en peso, más preferiblemente al menos 100% en peso.

10 Aunque la presente invención se refiere principalmente a la producción de aislados de proteína de soja, se contempla que pueden proporcionarse productos de proteína de soja de menor pureza que tengan propiedades similares al aislado de proteína de soja. Tales productos de pureza menores pueden tener una concentración de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) d.b.

El novedoso producto de proteína de soja de la invención se puede mezclar con bebidas en polvo para la formación de refrescos acuosos o bebidas deportivas disolviéndolo en agua. Tal mezcla puede ser una bebida en polvo.

15 El producto de proteína de soja proporcionado aquí se puede proporcionar como una solución acuosa del mismo que tiene un alto grado de claridad a valores de pH ácido y que es termoestable a estos valores de pH.

20 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una solución acuosa del producto de soja proporcionado aquí que es termoestable a bajo pH. 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 solubilidad excelente a pH 6 hasta pH 8, proporcionando soluciones acuosas con excelente claridad y estabilidad térmica. Una solución acuosa del producto de proteína de soja preparada a pH 6 hasta pH 8 puede ser una bebida.

25 Los productos de proteína de soja producidos de acuerdo con el proceso aquí carecen del sabor característico de los aislados de proteína de soja y son adecuados, no solo para el enriquecimiento proteico de medios ácidos, sino que pueden usarse en una amplia variedad de aplicaciones convencionales de aislados de proteína, que incluyen pero no se limitan a la fortificación con proteínas de alimentos y bebidas procesados, emulsificación de aceites, como formador de cuerpo en productos horneados y agente espumante en productos que atrapan gases. Además, el producto de proteína de soja se puede formar en fibras de proteína, útil en análogos de carne, se puede usar como un sustituto de clara de huevo o extendedor en productos alimenticios en los que se usa clara de huevo como aglutinante. El producto de proteína de soja se puede usar en suplementos nutricionales. Otros usos de los productos de proteína de soja son

30 en alimentos para mascotas, alimentación animal y en aplicaciones industriales y cosméticas y en productos para cuidado personal.

#### Descripción general de la invención

35 La etapa inicial del proceso de proporcionar el producto de proteína de soja implica solubilizar la proteína de soja de una fuente de proteína de soja usando agua. La fuente de proteína de soja puede ser soja o cualquier producto de soja o subproducto derivado del procesamiento de soja, que incluye, pero no se limita a, harina de soja, copos de soja, sémola de soja y harina de soja. La fuente de proteína de soja se puede usar en la forma con grasa completa, forma parcialmente desengrasada o forma completamente desengrasada. Cuando la fuente de proteína de soja contiene una cantidad apreciable de grasa, generalmente se requiere una etapa de eliminación de aceite durante el proceso. La proteína de soja recuperada de la fuente de proteína de soja puede ser la proteína que se encuentra naturalmente

40 en la soja o el material proteínico puede ser una proteína modificada por manipulación genética pero que posee propiedades hidrófobas y polares características de la proteína natural.

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

50 En un proceso continuo, la extracción de la proteína de la fuente de proteína de soja se lleva a cabo de cualquier manera consistente con efectuar una extracción continua de proteína de la fuente de proteína de soja. En una realización, la fuente de proteína de soja se mezcla continuamente con agua y la mezcla se transporta a través de una tubería o conducto que tiene una longitud y un caudal durante un tiempo de residencia suficiente para efectuar la extracción deseada de acuerdo con los parámetros descritos aquí. En dicho procedimiento continuo, la etapa de solubilización de proteína 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 posible. La solubilización en el procedimiento continuo se efectúa a temperaturas entre 1°C y 100°C, preferiblemente entre 15°C y 35°C.

55 La extracción se lleva a cabo al pH natural del sistema fuente de proteína de soja /agua, generalmente de 5 a 7. Alternativamente, el pH de la extracción puede ajustarse a cualquier valor deseado dentro del rango de 1.5 a 11,

preferiblemente de 5 a 7 mediante el uso de cualquier ácido conveniente, generalmente ácido clorhídrico, o álcali, generalmente hidróxido de sodio, según sea necesario.

La concentración de la fuente de proteína de soja en el agua durante la etapa de solubilización puede variar ampliamente. Los valores de concentración típicos son de aproximadamente 5 a aproximadamente 15% en p/v.

- 5 La etapa de extracción de proteínas con el agua tiene el efecto adicional de solubilizar las grasas que pueden estar presentes en la fuente de proteína de soja, que luego da como resultado que las grasas estén presentes en la fase acuosa.

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

- 10 Un antioxidante puede estar presente durante la etapa de extracción. El antioxidante puede ser cualquier antioxidante conveniente, como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleado puede variar de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso de la solución, preferiblemente aproximadamente 0.05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier compuesto fenólico en la solución de proteína.

- 15 La fase acuosa resultante de la etapa de extracción es separada entonces de la fuente de proteína de soja residual, de cualquier manera conveniente, por ejemplo con el empleo de una centrifuga decantadora, seguido de centrifugación y/o filtración en disco para eliminar el material residual de proteína de soja residual. La fuente de proteína de soja residual separada puede secarse para su eliminación. Alternativamente, la fuente de proteína de soja residual separada se procesa para recuperar alguna proteína residual. Por ejemplo, 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, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,844,086 y 6,005,076, cedidas al cesionario de la misma, entonces las etapas de desengrase descritas en este documento pueden efectuarse en la solución de proteína acuosa separada. Alternativamente, la eliminación de grasa de la solución de proteína acuosa se puede lograr mediante cualquier otro procedimiento conveniente.

- 25 La solución acuosa de proteína de soja se puede tratar con un adsorbente, tal como carbono activado en polvo o carbono activado granulado, para eliminar el color y/o los compuestos olorosos. Tal tratamiento adsorbente se puede llevar a cabo en cualquier condición conveniente, generalmente a temperatura ambiente, de la solución de proteína acuosa separada. Para el carbono activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% p/v, preferiblemente de aproximadamente 0.05% a 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 Como una alternativa al procesamiento de la solución de proteína acuosa al pH de extracción, la solución acuosa de proteína de soja que resulta de la etapa de extracción puede ajustarse el pH al rango de 5 a 7, antes del procesamiento adicional como se discute a continuación. Tal ajuste de pH puede efectuarse usando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico o álcali, tal como hidróxido de sodio, según sea apropiado. Si es necesario, la solución de proteína se puede clarificar mediante cualquier procedimiento conveniente tal como centrifugación o filtración después del ajuste del pH y antes del procesamiento adicional.

- 35 La solución acuosa de proteína de soja es entonces concentrada para aumentar la concentración de proteína de la misma mientras se mantiene la fuerza iónica de la misma sustancialmente constante. Tal concentración se efectúa para proporcionar una solución de proteína concentrada que tiene una concentración de proteína de 50 g/L a 400 g/L, preferiblemente 100 a 250 g/L.

- 40 La etapa de concentración puede efectuarse de cualquier manera conveniente consistente con una operación discontinua o continua, tal como el empleo de cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, usando membranas, tales como membranas de fibra hueca o membranas enrolladas en espiral, con un corte de peso molecular adecuado, tal como 3000 a 1000000 daltons, preferiblemente 5000 a 100000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales y configuraciones de membrana, y, para un funcionamiento continuo, dimensionado para permitir el grado deseado de concentración a medida que la solución acuosa de proteína pasa a través de las membranas.

- 45 Como es bien sabido, la ultrafiltración y las técnicas de membrana selectiva similares permiten que especies de bajo peso molecular pasen a su través a la vez que evitan que las especies de mayor peso molecular lo hagan. Las especies de bajo peso molecular incluyen materiales de bajo peso molecular extraídos del material de origen, tales como carbohidratos, pigmentos, proteínas de bajo peso molecular y factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina, que a su vez son proteínas de bajo peso molecular. El corte de peso molecular de la membrana se elige habitualmente para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, al tiempo que permite que los contaminantes pasen teniendo en cuenta los diferentes materiales y configuraciones de la membrana.

La solución de proteína puede someterse a una etapa de diafiltración, antes o después de la concentración completa, usando agua o una solución de sal acuosa de la misma conductividad y pH que la solución de proteína. Tal diafiltración puede efectuarse usando 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 que pasa a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración puede efectuarse hasta que no estén presentes cantidades significativas adicionales de contaminantes ni haya color visible en el permeado. Dicha diafiltración puede efectuarse usando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración puede efectuarse usando 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 3000 a 1000000 daltons, preferiblemente de 5000 a 100000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y configuración.

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

La etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional pueden efectuarse a cualquier temperatura conveniente, generalmente 2° a 60°C, preferiblemente 20° a 35°C, y durante el período de tiempo necesario para efectuar el grado deseado de concentración y diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas hasta cierto punto dependen del equipo de membrana utilizado para efectuar la transformación de la membrana de la concentración de proteína deseada de la solución y la eficacia de la eliminación de contaminantes en el permeado.

Por ejemplo, las etapas de concentración y/o diafiltración se pueden operar 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 usando una membrana de mayor tamaño de poro, como 30000 a 1000000 Da, operando la membrana a temperaturas elevadas, como 30 a 60°C y empleando mayores volúmenes de medio de diafiltración, como 20 a 40 volúmenes.

Además, se puede lograr una reducción en la actividad del inhibidor de la 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.

La adición de tales agentes reductores se puede efectuar en diversas etapas del proceso global. El agente reductor se puede agregar con la fuente de proteína de soja en la etapa de extracción, se puede agregar a la solución acuosa de proteína de soja clarificada después de eliminar el material de proteína de soja residual, se puede agregar a la solución de proteína concentrada antes o después de la diafiltración, se añade a la solución de proteína concentrada acidificada antes o después de la diafiltración, o se puede mezclar en seco con el producto de proteína de soja seco. La adición del agente reductor se puede combinar con las etapas de procesamiento de la membrana, como se describe anteriormente o una etapa de tratamiento térmico como se describe a continuación.

Si se desea retener inhibidores de tripsina activos en la solución de proteína concentrada, esto se puede lograr utilizando una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro más pequeño, operando la membrana a temperaturas más bajas, empleando menos volúmenes de medio de diafiltración y no empleando un agente reductor.

La solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada puede someterse a una operación de desengrase adicional, si se requiere, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos números 5,844,086 y 6,005,076. Alternativamente, la eliminación de grasa de la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede lograr mediante cualquier otro procedimiento conveniente.

La solución de proteína acuosa concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede tratar con un adsorbente, tal como carbono activado en polvo o carbono activado granulado, para eliminar el color y/o los compuestos olorosos. Tal tratamiento adsorbente puede llevarse a cabo en cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura ambiente de la solución de proteína concentrada. Para el carbono activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% p/v, preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 2% p/v. El adsorbente puede eliminarse de la solución de proteína de soja por cualquier medio conveniente, tal como por filtración.

La solución de proteína de soja concentrada y opcionalmente diafiltrada puede someterse a pasteurización para reducir la carga microbiana. Tal pasteurización puede efectuarse en 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 de 10 minutos a 15 minutos. La solución de proteína de soja concentrada pasteurizada puede luego enfriarse para un procesamiento adicional como se describe a continuación, preferiblemente a una temperatura de 20° a 35°C.

Después de la etapa de concentración y las etapas de diafiltración, desengrase, tratamiento adsorbente y pasteurización opcionales, se agrega a la solución resultante una sal de calcio, habitualmente solución de cloruro de

calcio. Esta adición provoca la formación de un precipitado que contiene principalmente fitato. Se agrega suficiente cloruro de calcio para proporcionar una solución que tiene una conductividad generalmente de 5 a 30 mS, preferiblemente de 15 a 25 mS.

5 Aunque la adición de sal de calcio se efectúa normalmente usando solución de cloruro de calcio, se pueden usar soluciones de otras sales de calcio.

La adición de la sal de calcio puede efectuarse a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 70°C, preferiblemente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C. Después de la adición de la sal de calcio, el material precipitado se elimina de la solución de proteína por cualquier medio conveniente, tal como por centrifugación o filtración.

10 La solución de proteína concentrada de la precipitación de fitato se diluye a continuación mezclando el retenido con agua que tiene un volumen requerido para alcanzar el grado de dilución deseado. La solución de proteína concentrada generalmente se diluye de 2 a 20 veces, preferiblemente de 10 a 15 veces. El agua con la que se mezcla la solución de proteína concentrada tiene una temperatura de 2° a 90°C, preferiblemente de 10° a 50°C, más preferiblemente de 20° a 30°C. La dilución de la solución de proteína concentrada da como resultado la formación de un precipitado de proteína. La acidificación de la solución diluida vuelve a solubilizar la proteína y da como resultado una solución transparente procesada posteriormente como se detalla a continuación.

20 El retenido diluido se ajusta a continuación en un pH de 1.5 a 4.4, preferiblemente de 2.0 a 4.0, mediante la adición de cualquier ácido adecuado, tal como ácido clorhídrico o ácido fosfórico, para dar como resultado una solución acuosa clara de proteína de soja. La solución de proteína diluida y acidificada se puede pulir opcionalmente por cualquier medio conveniente tal como filtración.

25 La solución de proteína de soja clara acidificada puede someterse a un tratamiento térmico para inactivar factores antinutricionales lábiles al calor, tales como inhibidores de tripsina, presentes en tal solución como resultado de la extracción del material 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°C a 160°C, preferiblemente de 80°C a 120°C, más preferiblemente de 85°C a 95°C, durante 10 segundos a 60 minutos, preferiblemente de 30 segundos a 5 minutos. La solución de proteína de soja acidificada tratada térmicamente puede luego enfriarse para un procesamiento posterior como se describe a continuación, preferiblemente a una temperatura de 2°C a 60°C, preferiblemente de 20°C a 35°C.

30 La solución de proteína de soja clara acidificada se concentra para aumentar la concentración de proteína de la misma mientras se mantiene su fuerza iónica sustancialmente constante. Tal concentración generalmente se efectúa para proporcionar una solución de proteína concentrada que tiene una concentración de proteína de 50 a 300 g/L, preferiblemente de 100 a 200 g/L.

35 La etapa de concentración puede efectuarse de cualquier manera conveniente consistente con la operación discontinua o continua, tal como el empleo de cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, usando membranas, tales como membranas de fibra hueca o membranas enrolladas en espiral, con un corte de peso molecular adecuado, tal como 3000 a 1000000 daltons, preferiblemente 5000 a 100000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales y configuraciones de membrana, y, para un funcionamiento continuo, dimensionado para permitir el grado deseado de concentración a medida que la solución acuosa de proteína pasa a través de las membranas.

40 Como es bien sabido, la ultrafiltración y técnicas de membranas selectivas similares permiten que especies de bajo peso molecular pasen a través de las mismas, al tiempo que evitan que las especies de mayor peso molecular lo hagan. Las especies de bajo peso molecular incluyen no solo las especies iónicas de la sal de calidad alimentaria sino también materiales de bajo peso molecular extraídos del material fuente, tales como carbohidratos, pigmentos, proteínas de bajo peso molecular y factores antinutricionales. El corte de peso molecular de la membrana se elige habitualmente para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, al tiempo que permite que los contaminantes pasen teniendo en cuenta los diferentes materiales y configuraciones de la membrana.

50 La solución de proteína puede someterse a una etapa de diafiltración, antes o después de la concentración completa, usando agua o una solución salina diluida. La solución de diafiltración puede estar a su pH natural o a un pH igual a la solución de proteína que se diafiltra o a cualquier valor de pH entre ellos. Tal diafiltración puede efectuarse usando 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 clara de proteína de soja que pasan a través de la membrana con el permeado. La operación de diafiltración puede efectuarse hasta que no estén presentes otras cantidades significativas de contaminantes o color visible en el permeado o hasta que el retenido se haya purificado suficientemente para, cuando se haya secado, proporcionar un aislado seco con un contenido de proteína de al menos aproximadamente 90% en peso sobre una base seca. Dicha diafiltración puede efectuarse usando la misma membrana que para la etapa de concentración. Sin embargo, si se desea, la etapa de diafiltración puede efectuarse usando 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 3000 a 1000000 daltons, preferiblemente de

5000 a 100000 daltons. teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y configuración.

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, como sulfito de sodio o ácido ascórbico. La cantidad de antioxidante empleada en el medio de diafiltración depende de los materiales empleados y puede variar de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso, preferiblemente aproximadamente 0.05% en peso. El antioxidante sirve para inhibir la oxidación de cualquier fenol presente en la solución de proteína de soja.

10 La etapa de concentración y la etapa de diafiltración opcional pueden efectuarse a cualquier temperatura conveniente, generalmente de 2°C a 60°C, preferiblemente de 20°C a 35°C, y durante el período de tiempo para efectuar el grado de concentración deseado y diafiltración. La temperatura y otras condiciones utilizadas hasta cierto punto dependen del equipo de membrana utilizado para efectuar la transformación de la membrana de la concentración de proteína deseada de la solución y la eficacia de la eliminación de los contaminantes en el permeado.

15 Hay dos inhibidores de tripsina principales en la soja, a saber, el inhibidor de Kunitz, que es una molécula lábil al calor con un peso molecular de aproximadamente 21000 Daltons, y el inhibidor de Bowman-Birk, una molécula más estable al calor con un peso molecular de aproximadamente 8000 Daltons. El nivel de actividad inhibidora de tripsina en el producto final de proteína de soja puede controlarse mediante la manipulación de diversas variables de proceso.

Como se indicó anteriormente, el tratamiento térmico de la solución de proteína de soja clara acidificada se puede usar para inactivar inhibidores de tripsina lábiles al calor. La solución de proteína de soja clara acidificada parcialmente concentrada o totalmente concentrada también puede tratarse térmicamente para inactivar los inhibidores de la tripsina lábiles al calor.

20 La acidificación y el procesamiento de la membrana de la solución de proteína diluida a un pH inferior (1.5 a 3.0) puede reducir la actividad del inhibidor de la tripsina en relación con el procesamiento de la solución a un pH superior (3.0 a 4.4). Cuando la solución de proteína se concentra y se diafiltra en el extremo inferior del intervalo de pH, puede desearse elevar el pH del retenido antes del secado. El pH de la solución de proteína concentrada y diafiltrada se puede elevar al valor deseado, por ejemplo pH 3, mediante la adición de cualquier álcali apto para uso alimentario tal como hidróxido sódico.

25 Como se mencionó anteriormente, las etapas de concentración y/o diafiltración se pueden operar 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 usando una membrana de mayor tamaño de poro, tal como 30000 a 1000000 Da, operando la membrana a temperaturas elevadas, como 30 a 60°C y empleando mayores volúmenes de medio de diafiltración, como 20 a 40 volúmenes.

Además, se puede lograr una reducción en la actividad del inhibidor de la 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.

35 Si se desea retener inhibidores de tripsina activos en la solución de proteína concentrada, esto se puede lograr utilizando una membrana de concentración y diafiltración con un tamaño de poro más pequeño, operando la membrana a temperaturas más bajas, empleando menos volúmenes de medio de diafiltración y no empleando un agente reductor.

40 La solución de proteína acidificada acuosa concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede tratar con un adsorbente, tal como carbono activado en polvo o carbono activado granulado, para eliminar el color y/o los compuestos olorosos. Tal tratamiento adsorbente puede llevarse a cabo en cualquier condición conveniente, generalmente a la temperatura ambiente de la solución de proteína concentrada. Para el carbono activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% p/v, preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 2% p/v. El adsorbente puede eliminarse de la solución de proteína de soja por cualquier medio conveniente, tal como por filtración.

45 La solución acuosa de proteína de soja clara acidificada, concentrada y opcionalmente diafiltrada se puede secar mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por pulverización o liofilización. La etapa de pasteurización descrita anteriormente puede efectuarse en la solución de proteína de soja antes del secado. El producto de proteína de soja seca tiene un contenido de proteína superior a 60% en peso de proteína. Preferiblemente, el producto de proteína de soja seco es un aislado que contiene al menos un 90% en peso de proteína, más preferiblemente al menos un 100% en peso (N x 6.25). El producto de proteína de soja es bajo en contenido de ácido fítico, generalmente menos de aproximadamente 1.5% en peso. Al concentrar parcialmente y/o diafiltrar parcialmente la solución acuosa de proteína de soja, es posible eliminar solo parcialmente los contaminantes y de ese modo dar como resultado un producto de proteína de soja seco de menor pureza.

55 El producto de proteína de soja producido en la presente invención es soluble en un entorno acuoso ácido, lo que hace que el producto sea ideal para la incorporación en bebidas, tanto carbonatadas como no carbonatadas, para proporcionar fortificación de proteínas a las mismas. Dichas bebidas tienen una amplia gama de valores de pH ácido, que varían de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 5. Los productos de proteína de soja proporcionados en la presente memoria se pueden añadir a tales bebidas en cualquier cantidad conveniente para proporcionar fortificación

de proteínas a tales bebidas, por ejemplo, para suministrar al menos aproximadamente 5 g de proteína de soja por porción. El producto de proteína de soja añadido se disuelve en la bebida y no perjudica la claridad de la bebida, incluso después del procesamiento térmico. El producto de proteína de soja se puede mezclar con bebida seca antes de la reconstitución de la bebida por disolución en agua. En algunos casos, la modificación de la formulación normal puede ser necesaria cuando los componentes presentes en la bebida pueden afectar negativamente a la capacidad de la composición para permanecer disuelta en la bebida.

**Ejemplos**

**Ejemplo comparativo 1:**

Este Ejemplo comparativo ilustra la preparación de un aislado de proteína de soja seco.

Se añadieron 20 kg de harina de soja desengrasada, mínimamente tratada térmicamente a 200 L de agua purificada por ósmosis inversa a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa. El grueso de la harina de soja residual se eliminó por centrifugación para proporcionar 173 L de solución que tenía un contenido de proteína de 3.68% en peso. Se añadió suficiente cloruro de calcio para elevar la conductividad de la solución a 19 mS y se formó un precipitado. Este precipitado se eliminó por centrifugación para proporcionar 133 L de solución con un contenido de proteína de 2.15%. Esta solución se combinó con 133 L de agua purificada por ósmosis inversa y el pH se redujo a 3 mediante la adición de HCl diluido. La solución resultante tenía un contenido de proteína de 1.03% en peso y una conductividad de 14.53 mS. Esta solución fue pulida por filtración. Después de la clarificación, se obtuvo un volumen total de 293 L de solución que tenía un contenido de proteína de 0.81% en peso.

Los 293 L de solución de proteína filtrada se redujeron en volumen a 28 kg por concentración en una membrana de PVDF que tenía un corte de peso molecular de 5000 daltons. La solución de proteína concentrada se diafiltró a continuación con 140 L de agua purificada por ósmosis inversa. La solución de proteína concentrada diafiltrada resultante tenía un contenido de proteína de 7.35% en peso y representaba un rendimiento de 83.5% en peso de la solución de proteína filtrada inicial. La solución de proteína concentrada diafiltrada se secó luego para producir un producto que se encontró que tenía un contenido de proteína de 101.96% (N x 6.25) d.b. El producto se denominó S005-A14-09A S800.

Se preparó una solución de proteína al 3.2% p/v de S005-A14-09A S800 en agua y se evaluó el color y la claridad usando un instrumento HunterLab ColorQuest XE operado en modo de transmisión. El pH también se midió con un medidor de pH.

Los valores de pH, color y claridad se exponen en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1- Puntajes de pH y HunterLab para solución de proteína al 3.2% de S005-A14-09A S800

| Muestra           | pH   | L*    | a*    | b*    | turbidez (%) |
|-------------------|------|-------|-------|-------|--------------|
| S005-A14-09A S800 | 3.35 | 97.03 | -1.23 | 10.25 | 0.0          |

Como puede verse en la Tabla 1, el color de la solución S800 fue muy ligero y no se detectó turbidez.

El color del polvo seco también se evaluó con el instrumento HunterLab ColorQuest XE en modo de reflectancia. Los valores de color se establecen en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2 - Puntajes de HunterLab para polvo seco S005-A14-09A S800

| Muestra           | L*    | a*   | b*   |
|-------------------|-------|------|------|
| S005-A14-09A S800 | 86.04 | 0.11 | 9.90 |

Como puede verse en la Tabla 2, el producto seco era de color muy claro.

**Ejemplo comparativo 2:**

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 1 (S800).

Se produjo una solución de proteína al 2% p/v de S005-A14-09A S800 en agua y el pH se ajustó a 3. La claridad de esta solución se evaluó mediante medición de turbidez con HunterLab. La solución luego se calentó a 95°C, se



mantuvo a esta temperatura durante 30 segundos y luego se enfrió inmediatamente a temperatura ambiente en un baño de hielo. La claridad de la solución tratada térmicamente se midió de nuevo.

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

Tabla 3 - Efecto del tratamiento térmico sobre la claridad de la solución S005-A14-09A S800

| Muestra                   | turbidez (%) |
|---------------------------|--------------|
| antes de calentar         | 3.2          |
| después del calentamiento | 3.4          |

5

Como se puede ver a partir de los resultados en la Tabla 3, la solución inicial de S800 tenía muy poca turbidez. El tratamiento térmico tuvo poco efecto en el nivel de turbidez.

**Ejemplo comparativo 3:**

Este Ejemplo comparativo contiene una evaluación de la solubilidad en agua del aislado de proteína de soja producido por el método del Ejemplo comparativo 1 (S800). La solubilidad se probó basándose en la solubilidad de la proteína (método denominado 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 pella).

Se pesó suficiente proteína en polvo para suministrar 0.5 g de proteína en un vaso de precipitados y luego se añadió una pequeña cantidad de agua purificada por ósmosis inversa (RO) y la mezcla se agitó hasta que se formó una pasta suave. Luego se añadió agua adicional para llevar el volumen a 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 o 7) con NaOH o HCl diluido. También se preparó una muestra a pH natural. Para las muestras ajustadas al pH, el pH se midió y corrigió dos veces durante los 60 minutos de agitación. Después de los 60 minutos de agitación, las muestras se prepararon hasta 50 ml de volumen total 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. Se transfirieron luego 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, a continuación se enfriaron en un desecador y se taparon los tubos. Las muestras se centrifugaron a 7800 g durante 10 minutos, lo que sedimentó material insoluble y produjo un sobrenadante transparente. El contenido de proteína del sobrenadante se midió por análisis de Leco y luego el sobrenadante y las tapas de los tubos se descartaron y el material del gránulo se secó durante la noche 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 de pellas seco. El peso seco de la proteína en polvo inicial se calculó multiplicando el peso del polvo utilizado por un factor de  $((100 - \text{contenido de humedad del polvo (\%)})/100)$ . La solubilidad del producto se calculó de dos maneras diferentes:

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

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

Tabla 4 - pH natural de la solución S800 preparada en agua al 1% de proteína

| Lote         | Producto | pH Natural |
|--------------|----------|------------|
| S005-A14-09A | S800     | 3.41       |

Los resultados de solubilidad obtenidos se exponen en las siguientes tablas 5 y 6:

Tabla 5 - Solubilidad de S800 a diferentes valores de pH con base en el método de la proteína

|              |          | Solubilidad (método de proteína) (%) |      |      |      |      |      |         |
|--------------|----------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|---------|
| Lote         | Producto | pH 2                                 | pH 3 | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | Nat. pH |
| S005-A14-09A | S800     | 96.8                                 | 92.7 | 100  | 19.3 | 50.8 | 97.6 | 91.9    |

Tabla 6 - Solubilidad de S800 a diferentes valores de pH con base en el método de pella

|              |          | Solubilidad (método de pella) (%) |      |      |      |      |      |         |
|--------------|----------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|---------|
| Lote         | Producto | pH2                               | pH3  | pH4  | pH5  | pH6  | pH7  | Nat. pH |
| S005-A14-09A | S800     | 97.8                              | 97.6 | 97.8 | 12.9 | 50.1 | 97.4 | 97.4    |

5 Como se puede ver en los resultados de las Tablas 5 y 6, el producto S800 fue muy soluble en el rango de pH de 2 a 4 y también a pH 7.

**Ejemplo comparativo 4:**

Este Ejemplo comparativo contiene una evaluación de la claridad en agua del aislado de proteína de soja producido por el método del Ejemplo comparativo 1 (S800).

10 La claridad de las soluciones de proteína al 1% p/v preparadas como se describe en el Ejemplo comparativo 3 se evaluó midiendo la absorbancia a 600 nm, correspondiendo una menor puntuación de absorbancia a una mayor claridad. El análisis de las muestras en un instrumento HunterLab ColorQuest XE en modo de transmisión también proporcionó una lectura de porcentaje de turbidez, otra medida de claridad.

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

Tabla 7 - Claridad de la solución S800 a diferentes valores de pH según valuación por A600

|              |          | A600  |       |       |       |       |       |         |
|--------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Lote         | Producto | pH 2  | pH 3  | pH 4  | pH 5  | pH 6  | pH 7  | Nat. pH |
| S005-A14-09A | S800     | 0.008 | 0.006 | 0.022 | > 3.0 | > 3.0 | 0.024 | 0.007   |

15

Tabla 8 - Claridad de la solución S800 a diferentes valores de pH según lo evaluado por el análisis de HunterLab

|              |          | Lectura de la turbidez HuriterLab (%) |      |      |      |      |      |         |
|--------------|----------|---------------------------------------|------|------|------|------|------|---------|
| Lote         | Producto | pH 2                                  | pH 3 | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | Nat. pH |
| S005-A14-09A | S800     | 0.0                                   | 0.0  | 0.0  | 90.8 | 90.8 | 0.0  | 0.0     |

Como se puede ver en los resultados de las Tablas 7 y 8, las soluciones de S800 fueron extremadamente claras en el rango de pH 2 a 4 así como a pH 7.

20 **Ejemplo comparativo 5:**

Este Ejemplo comparativo contiene una evaluación de la solubilidad en un refresco (Sprite) y bebida deportiva (Gatorade Naranja) del aislado de proteína de soja producido por el método del Ejemplo comparativo 1 (S800). La

solubilidad se determinó con la proteína añadida a las bebidas sin corrección de pH y nuevamente con el pH de las bebidas fortificadas con proteína ajustadas al nivel de las bebidas originales.

5 Cuando se evaluó la solubilidad sin corrección del 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 una bebida adicional para llevar el volumen a 50 ml, y luego las soluciones se agitaron lentamente en un agitador magnético durante 60 minutos para producir una dispersión de proteína al 2% p/v. El contenido de proteína de las muestras se analizó usando un determinador de nitrógeno LECO FP528 y luego se centrifugó una parte alícuota de las bebidas que contenían proteína a 7800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante.

10 
$$\text{Solubilidad (\%)} = (\% \text{ proteína en sobrenadante} / \% \text{ proteína en dispersión inicial}) \times 100$$

15 Cuando se evaluó la solubilidad con corrección de pH, se midió el pH de la bebida refrescante (Sprite) (3.39) y 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 que se formó una pasta suave. Se añadió una bebida adicional para llevar el volumen a aproximadamente 45 ml, y luego las soluciones se agitaron lentamente en un agitador magnético durante 60 minutos. Se midió el pH de las bebidas que contenían proteína y luego se ajustó al pH original sin proteína con HCl o NaOH, según fuera necesario. El volumen total de cada solución se llevó luego a 50 ml con bebida adicional, produciendo una dispersión de proteína al 2% p/v. El contenido de proteína de las muestras se analizó usando un determinador de nitrógeno LECO FP528 y luego se centrifugó una parte alícuota de las bebidas que contenían proteínas a 7800 g durante 10 minutos y se midió el contenido de proteína del sobrenadante.

20 
$$\text{Solubilidad (\%)} = (\% \text{ proteína en sobrenadante} / \% \text{ proteína en dispersión inicial}) \times 100$$

Los resultados de solubilidad obtenidos se exponen en la siguiente Tabla 9:

Tabla 9 - Solubilidad de S800 en Sprite y Gatorade Naranja

| Lote         | Producto | Sin corrección de pH      |                                     | Corrección de pH          |                                     |
|--------------|----------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
|              |          | Solubilidad en Sprite (%) | Solubilidad en Gatorade Naranja (%) | Solubilidad en Sprite (%) | Solubilidad en Gatorade Naranja (%) |
| S005-A14-09A | S800     | 100                       | 99.5                                | 96.4                      | 94.6                                |

25 Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 9, el S800 fue altamente soluble en Sprite y en Gatorade Naranja. Como S800 es un producto acidificado, la adición de proteína tuvo poco efecto sobre el pH de la bebida.

**Ejemplo comparativo 6:**

Este Ejemplo comparativo contiene una evaluación de la claridad en una bebida refrescante y bebida deportiva del aislado de proteína de soja producido por el método del Ejemplo comparativo 1 (S800).

30 La claridad de las dispersiones de proteína al 2% p/v preparadas en bebida refrescante (Sprite) y bebida deportiva (Gatorade Naranja) en el Ejemplo comparativo 5 se evaluaron usando los métodos descritos en el Ejemplo comparativo 4. Para las mediciones de absorbancia a 600 nm, el espectrofotómetro ajustó en un blanco con la bebida apropiada antes de realizar la medición.

Los resultados obtenidos se exponen en las siguientes tablas 10 y 11:

35 Tabla 10 - Claridad (A600) de S800 en Sprite y Gatorade Naranja

| Lote         | Producto | Sin corrección de pH |                          | Corrección de pH |                          |
|--------------|----------|----------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
|              |          | A600 en Sprite       | A600 en Gatorade Naranja | A600 en Sprite   | A600 en Gatorade Naranja |
| S005-A14-09A | S800     | 0.023                | 0.000                    | 0.014            | 0.000                    |

Tabla 11 - Lecturas de turbidez HunterLab para S800 en Sprite y Gatorade Naranja

| Lote         | Producto | Sin corrección de pH   |                                  | 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-A14-09A | S800     | 2.0                    | 49.2                             | 0.0                    | 40.6                             |

5 Como se puede ver a partir de los resultados de las Tablas 10 y 11, el producto S800 no tuvo esencialmente ningún efecto sobre la claridad del Sprite o el Gatorade Naranja.

**Ejemplo comparativo 7:**

Este Ejemplo comparativo contiene una evaluación de la claridad y la estabilidad térmica en agua a pH 7 a 8 del aislado de proteína de soja producido por el método del Ejemplo comparativo 1 (S800).

10 Se produjo una solución de proteína al 2% p/v de S005-A14-09A S800 en agua y se ajustó el pH a 7, 7.5 u 8 con hidróxido de sodio diluido. La claridad de estas soluciones se evaluó mediante medición de turbidez con HunterLab. La solución luego se calentó a 95°C y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La claridad de la solución tratada térmicamente se midió de nuevo.

La claridad de las soluciones de proteína antes y después del calentamiento se exponen en la siguiente Tabla 12:

Tabla 12 - Efecto del tratamiento térmico sobre la claridad de la solución S005-A14-09A S800 a pH 7-8

| Muestra pH | (%) turbidez antes de calentar | (%) turbidez después de calentar |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 7.0        | 2.8                            | 7.3                              |
| 7.5        | 0.8                            | 2.5                              |
| 8.0        | 0.7                            | 3.9                              |

15 Como se puede ver a partir de los resultados en la Tabla 12, las soluciones iniciales de S800 tenían muy poca turbidez. El tratamiento térmico tuvo poco efecto en el nivel de turbidez.

Resumen de la divulgaciónn

20 En resumen de esta divulgación, la presente invención proporciona un nuevo procedimiento para formar un producto de proteína de soja que es soluble en medios ácidos y forma soluciones transparentes y termoestables en los mismos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un producto de proteína de soja con un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) d.b., preferiblemente al menos 90% en peso, más preferiblemente al menos 100% en peso, que comprende:
- 5 (a) extraer una fuente de proteína de soja con agua, que contiene opcionalmente un antioxidante, a una temperatura de al menos 1°C, preferiblemente de 15° a 35°C, para provocar la solubilización de la proteína de soja en la fuente de proteína de soja y formar una solución acuosa de proteína que tiene un contenido de proteína de 5 a 50 g/L, preferiblemente de 10 a 50 g/L, y un pH de 1.5 a 11, preferiblemente de 5 a 7,
- (b) separar la solución de proteína acuosa de la fuente de proteína de soja residual,
- 10 (c) tratar opcionalmente la solución de proteína acuosa con un adsorbente para eliminar el color y/o los compuestos olorosos de la solución de proteína acuosa;
- (d) aumentar la concentración de proteína de la solución de proteína acuosa a 50 a 400 g/L, preferiblemente 100 a 250 g/L, mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva, preferiblemente empleando una membrana que tiene un corte de peso molecular de 3000 a 1000000 daltons, más preferiblemente de 5000 a 100000 daltons, para proporcionar una solución de proteína concentrada,
- 15 (e) opcionalmente diafiltrar la solución de proteína concentrada, preferiblemente usando agua o solución salina diluida, antes o después de la concentración completa de la misma, preferiblemente usando de 2 a 40 volúmenes de solución de diafiltración, más preferiblemente de 5 a 25 volúmenes, preferiblemente usando una membrana que tiene un corte de peso molecular de 3000 a 1000000 daltons, más preferiblemente de 5000 a 100000 daltons, preferiblemente con un antioxidante presente durante al menos parte de la etapa de diafiltración, preferiblemente hasta que no haya
- 20 cantidades significativas adicionales de contaminantes o color visible en el permeado,
- (f) opcionalmente pasteurizar la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada, preferiblemente a una temperatura de 55° a 70°C durante 30 segundos a 60 minutos, más preferiblemente 60° a 65°C durante 10 a 15 minutos, seguido opcionalmente por enfriamiento a una temperatura de 20°C a 35°C,
- (g) añadir solución de sal de calcio, preferiblemente solución acuosa de cloruro de calcio, a la solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada a una conductividad de 5 a 30 mS, preferiblemente de 15 a 25 mS, para hacer
- 25 que se forme un precipitado en la solución de proteína concentrada,
- (h) eliminar el precipitado de la solución de proteína concentrada,
- (i) diluir la solución de proteína concentrada clarificada en 2 a 20 volúmenes de agua, preferiblemente de 10 a 15 volúmenes de agua, que tienen una temperatura de 2° a 90°C, preferiblemente de 10° a 50° C, más preferiblemente
- 30 de 20° a 30°C,
- (j) acidificar la solución resultante a un pH de 1.5 a 4.4, preferiblemente 2.0 a 4.0, para producir una solución de proteína clara acidificada,
- (k) opcionalmente pulir la solución de proteína clara acidificada,
- (l) aumentar la concentración de la solución de proteína clara acidificada a 50 a 300 g/L, preferiblemente 100 a 200
- 35 g/L mientras se mantiene la fuerza iónica sustancialmente constante usando una técnica de membrana selectiva, preferiblemente usando una membrana que tiene un corte de peso molecular de 3000 a 1000000 daltons, más preferiblemente de 5000 a 100000 daltons, para proporcionar una segunda solución de proteína concentrada,
- (m) opcionalmente diafiltrar la segunda solución de proteína concentrada, preferiblemente usando agua o solución salina diluida, antes o después de la concentración completa de la misma, preferiblemente usando de 2 a 40
- 40 volúmenes de solución de diafiltración, más preferiblemente de 5 a 25 volúmenes, preferiblemente usando una membrana que tiene un peso molecular de 3000 a 1000000 daltons, más preferiblemente de 5000 a 100000 daltons, preferiblemente con un antioxidante presente durante al menos parte de la etapa de diafiltración, preferiblemente hasta que no estén presentes cantidades significativas adicionales de contaminantes o color visible en el permeado,
- (n) tratar opcionalmente la segunda solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada con un adsorbente
- 45 para eliminar el color y/o los compuestos olorosos, y
- (o) opcionalmente secar la segunda solución de proteína concentrada y opcionalmente diafiltrada para proporcionar un producto de proteína de soja que tiene un contenido de proteína de al menos 60% en peso (N x 6.25) d.b., preferiblemente al menos 90% en peso, más preferiblemente al menos 100% en peso.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho paso de concentración y/o paso de diafiltración opcional se
- 50 operan de una manera favorable a la eliminación de inhibidores de tripsina usando una membrana que tiene un tamaño de poro de 30000 a 1000000 Dalton, operando la membrana a una temperatura de 30° a 60°C y usando 20 a 40 volúmenes de medio de diafiltración.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha concentración y pasos de diafiltración opcionales se llevan a cabo a una temperatura de 2 a 60°C, preferiblemente de 20 a 35°C.
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde un agente reductor está presente o se agrega para romper o reordenar los enlaces disulfuro de inhibidores de tripsina para lograr una reducción en la actividad inhibidora de tripsina durante la etapa de extracción y/o durante los pasos de concentración y pasos de diafiltración opcionales y/o antes del secado y/o el producto de proteína de soja seco.
- 5
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha solución de proteína de soja acidificada, dicha solución de proteína de soja parcialmente concentrada y/o dicha solución de proteína de soja concentrada, se someten a un tratamiento térmico para inactivar factores antinutricionales lábiles al calor, incluyendo inhibidores de tripsina termolábiles, siendo efectuado dicho tratamiento térmico a una temperatura de 70° a 160°C durante 10 segundos a 60 minutos, preferiblemente a 80°C a 120°C durante 30 segundos a 5 minutos, más preferiblemente 85° a 95°C durante 30 segundos a 5 minutos, siendo enfriada la solución de proteína de soja tratada térmicamente opcionalmente después de eso a una temperatura de 2° a 60°C, preferiblemente de 20° a 35°C, para su posterior procesamiento.
- 10
6. Un producto de proteína de soja producido por el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 15
7. Una solución ácida o una solución con un pH casi neutro, tal como en el rango de pH de 6 a 8, que tiene disuelto en ella el producto de proteína de soja de la reivindicación 6, preferiblemente en donde la solución es una solución acuosa que es una bebida.
- 20
8. El producto de proteína de soja de la reivindicación 6, que se mezcla con materiales en polvo solubles en agua para la producción de soluciones acuosas de la mezcla.
9. La mezcla de la reivindicación 8 que es una bebida en polvo.
10. El producto de proteína de soja de la reivindicación 6 que tiene un bajo contenido de ácido fítico, preferiblemente menos de 1.5% en peso.