

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 475**

51 Int. Cl.:

A23J 1/14 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014** **PCT/EP2014/074940**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015** **WO15071499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014** **E 14809775 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 3071045**

54 Título: **Método para extraer proteínas de guisante**

30 Prioridad:

18.11.2013 EP 13193388

18.11.2013 EP 13193383

13.03.2014 BE 201400174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2020

73 Titular/es:

COSUCRA GROUPE WARCOING S.A. (100.0%)

Rue de la Sucrierie 1

7740 Warcoing, BE

72 Inventor/es:

BOURGEOIS, AUDREY;

GRAMAIN, ANTHONY y

DESCAMPS, MARY

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 800 475 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

Método para extraer proteínas de guisante

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para extraer y purificar proteínas. En particular, la presente invención se refiere a la extracción de proteína de guisante. La invención se refiere además a proteínas de guisante que se pueden obtener por los métodos anteriores, así como a alimentos o productos alimenticios que contienen tales proteínas de guisante. La invención también se refiere al uso de tales proteínas de guisante en la industria alimentaria o de piensos.

Antecedentes de la invención

Los aislados de proteínas de origen vegetal representan una alternativa o suplemento valioso a las proteínas animales en alimentos o piensos. Por ejemplo en alimentos, además de proteínas vegetales puede reemplazar eficazmente las proteínas animales, a menudo a menor coste. Además, muchos productos que tradicionalmente contienen proteínas animales, en particular productos lácteos, puede ser una causa importante de alergias alimenticias.

Las leguminosas son notables porque la mayoría de ellas tienen bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno en estructuras llamadas nódulos radiculares. Esta disposición significa que los nódulos radiculares son fuentes de nitrógeno para las leguminosas, haciéndolos relativamente ricos en proteínas vegetales. Todas las proteínas contienen aminoácidos nitrogenados. Por lo tanto, el nitrógeno es un ingrediente necesario en la producción de proteínas. Por lo tanto, las leguminosas se encuentran entre las mejores fuentes de proteína vegetal. Como leguminosas, tales como los guisantes (*Pisum sativum*), además de tener un alto contenido de proteínas, están fácilmente disponibles y tienen una composición de aminoácidos particularmente bien equilibrada, éstos representan una fuente de proteínas que es una alternativa valiosa para las proteínas animales.

Los principales desafíos para proporcionar proteínas vegetales giran en torno a la composición y pureza de las proteínas, e incluyen aspectos relacionados, por ejemplo, con la extracción, fraccionamiento y tratamientos preaislamiento y postaislamiento. Para cuando la proteína vegetal esté aislada y disponible en una forma más o menos pura, todas las manipulaciones previas tienen un gran impacto en la calidad de la proteína vegetal aislada. Por ejemplo, el tipo y la cantidad de impurezas en los aislados o extractos de proteínas determinan su valor final. Dichas impurezas incluyen, por ejemplo, carbohidratos. Mientras que en general los carbohidratos son impurezas no deseadas en el aislado de proteína final, algunas otras impurezas, tales como vitaminas o minerales pueden, por definición, no ser indeseables, o incluso pueden ser beneficiosas para los aspectos nutricionales y/o fisicoquímicos del aislado de proteína. Además de afectar a la composición final de los aislados o extractos de proteínas, el proceso de extracción y/o purificación puede afectar drásticamente a las propiedades fisicoquímicas o funcionales del aislado de proteína. En particular, la solubilidad de proteínas, la viscosidad, la capacidad emulsionante, el color, el gusto o el olfato están fuertemente influenciados por las técnicas utilizadas.

Como se puede apreciar de lo anterior, obtener un aislado de proteína de alta calidad que tenga propiedades deseadas específicas puede ser engorroso y, a menudo, implica múltiples manipulaciones costosas y/o que requieren mucho tiempo. A la vista de esto, todavía existe la necesidad de mejorar el aislamiento de proteínas de las plantas, en particular, de leguminosas, tales como el guisante.

El documento FR2889416A1 se refiere a composiciones de proteína de guisante caracterizadas por un perfil de distribución de peso molecular particular y solubilidad en agua, así como los métodos para obtenerlos.

El documento FR2889417A1 se refiere a una composición de proteína de guisante granulada caracterizada por un diámetro medio de partícula y un valor de compresibilidad, así como métodos para producirlos.

El documento WO 2010/022702 se refiere a un proceso para obtener proteína de leguminosa que contiene grasa.

El documento US 2013/0017310 se refiere a un proceso para fabricar proteínas vegetales solubles y funcionales.

Khattab R Y et al (Nutritional quality of legume seed as affected by some physical treatments, Parte 1: Protein quality evaluation; Food Science and Technology, vol. 42, N.º 6, 2009, p1107-1112;) describe los efectos de diferentes métodos de procesamiento sobre la calidad nutricional del caupí, de semillas de guisantes y frijoles, tales como el contenido de factores antinutricionales, incluidos los taninos, ácido fítico, inhibidores de la tripsina y oligosacáridos.

Camacho L et al (Mejoramiento nutricional de legumbres de consumo habitual fermentado por cultivos del grano lactobacillus; Alimentos, vol 16, 1991, p5-11) describe los efectos de la fermentación de ácido láctico en el contenido de oligosacáridos y fitatos en la harina de lentejas, garbanzos y guisantes.

Deshpande S S (capítulo 4: Fermentation of grain legumes, seeds and nuts in latin America and the Caribbean, Fermented grain legumes, seeds and nuts: A global perspective (serie de libros: FAO agricultural services bulletin),

Food and Agriculture organization of the United Nations, vol. 142, 2000, p99-105, 107) describe alimentos fermentados derivados de granos de cereales y tubérculos.

5 Schindler Sabrina et al (Improvement of the Aroma of Pea (*Pisum sativum*) Protein extracts by lactic acid fermentation; Food biotechnology, vol. 26, 2012, No. 1) describe la formación de un sabor desagradable verde o tostado durante el almacenamiento de extractos de proteínas de leguminosas que limita su aplicación en los alimentos. Los extractos de proteína de guisante se sometieron a fermentación de ácido láctico para mejorar el sabor reduciendo la formación de mal sabor o enmascarando notas verdes indeseables.

10 Por consiguiente, uno de los objetos de la presente invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

Sumario de la invención

15 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para extraer proteínas de guisante. El método para extraer proteínas de guisante comprende las etapas de:

(a) proporcionar una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

20 (b) aislar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(c) obtener dichas proteínas de guisante aisladas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8;

25 (d) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C,

en donde la etapa (b) comprende ajustar el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5;

30 en donde la etapa (d) comprende someter dichas proteínas de guisante precipitadas a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s.

Según una realización de dicho método, la extracción de proteína de guisante implica proporcionar proteínas de guisante que se someten a precipitación isoeléctrica seguida de tratamiento térmico del precipitado de proteína.

40 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporcionan extractos de proteína de guisante que se pueden obtener o se obtienen mediante el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de proteína de guisante, que comprende al menos el 60 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de la composición, en donde
45 dicha composición de proteína de guisante tiene un índice de solubilidad de nitrógeno a pH 7,0 de como máximo el 15 %, tal como se mide en una composición acuosa que comprende el 3 % en peso de dicha composición de proteína de guisante basándose en el peso total de la composición acuosa.

También se describe en el presente documento que se proporciona una composición comestible, preferentemente un
50 producto alimenticio o de pienso, que comprende las proteínas de guisante según el segundo aspecto de la invención, o la composición de proteína de guisante según el tercer aspecto de la invención, o las proteínas de guisante obtenidas por el método según el primer aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de extractos de proteína de guisante según el segundo
55 aspecto de la invención, o composición de proteína de guisante según el tercer aspecto de la invención, o extractos de proteína de guisante obtenidos por el método según el primer aspecto de la invención en productos alimenticios o de pienso, preferentemente, en productos alimenticios de panadería y confitería.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de proteínas de guisante según el segundo aspecto
60 de la invención, o composición de proteína de guisante según el tercer aspecto de la invención, o proteínas de guisante obtenidas por el método según el primer aspecto de la invención para aclarar brebajes o bebidas, preferentemente vino o zumos de frutas.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las proteínas de guisante que tienen características
65 funcionales, fisicoquímicas y organolépticas particulares cuando una composición acuosa que comprende proteínas de guisante se somete a etapas de aislamiento tales como precipitación de proteínas, después de lo cual las proteínas

aisladas se someten a tratamiento térmico.

En particular, se ha descubierto inesperadamente que los métodos según la invención tal como se describe en el presente documento permiten obtener composiciones de proteína de guisante, o extractos o concentrados de proteína de guisante que tienen, entre otros, un contenido de cenizas más bajo, mayor densidad (tanto aparente como tras el asentamiento), mejor fluidez, mejor humectabilidad, baja solubilidad, menor viscosidad y menor fuerza del gel, en comparación con los extractos de proteína de guisante que no se obtienen de acuerdo con los métodos de la invención tal como se describen en el presente documento.

Las composiciones de proteína de guisante de la invención tienen baja afinidad por el agua, lo cual es interesante en aplicaciones con baja disponibilidad de agua.

Las características específicas de los extractos de proteína de guisante y las composiciones de proteína de guisante según la invención como se describe en el presente documento en particular hacen que tales extractos de proteína de guisante y composiciones de proteína de guisante sean particularmente adecuados para su uso en la industria alimentaria o de piensos, en particular en productos alimenticios de panadería o confitería, tales como galletas, panes, gofres, pasteles, dulces de leche, cereales extrudidos y barras, etc. Sorprendentemente, se ha descubierto que los extractos de proteína de guisante y las composiciones de proteína de guisante según la invención como se describe en el presente documento se pueden usar en los productos de panadería y confitería anteriores y permiten que se añada menos agua durante la preparación de estos productos alimenticios, mientras se mantiene o incluso se mejora la calidad (como la textura o el sabor) o la vida útil de dichos productos alimenticios y sin comprometer la trabajabilidad de, por ejemplo, la masa utilizada para preparar los productos de panadería. Otra ventaja de usar menos agua en la preparación de productos alimenticios de panadería en particular es que se facilita la evaporación del agua durante la cocción de dichos productos alimenticios, que no solo es más rentable, sino que también afecta de forma beneficiosa a la calidad general de los productos alimenticios (horneados). También se puede prolongar el tiempo de conservación de los productos alimenticios que contienen extractos de proteína de guisante y composiciones de proteína de guisante según la invención como se describe en el presente documento. Los extractos de proteína de guisante y las composiciones de proteína de guisante como se describen en el presente documento según la invención también son particularmente adecuados para reemplazar, por ejemplo, proteínas animales, tales como las proteínas de la leche en los productos alimenticios, pero también para reemplazar otras proteínas vegetales, en particular proteínas vegetales alergénicas tales como la proteína de trigo, en productos alimenticios. Por ejemplo, los extractos de proteína de guisante y las composiciones de proteína de guisante según la invención como se describe en el presente documento se pueden usar para reemplazar parcial o completamente proteínas de la leche en productos de confitería, como por ejemplo dulces de leche, o en barritas de dulce de leche, para lo cual se ha observado sorprendentemente que se puede obtener una textura más suave con las proteínas de acuerdo con la invención.

Además, se ha descubierto inesperadamente que los extractos de proteína de guisante y las composiciones de proteína de guisante según la invención como se describe en el presente documento son particularmente adecuados para su uso en el aclarado o la clarificación de líquidos, por ejemplo brebajes o bebidas, tales como vino, cerveza o zumos de frutas. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se hipotetiza que la solubilidad particularmente baja de los extractos de proteína de guisante y las composiciones de proteína de guisante según la invención como se describe en el presente documento puede ser responsable de la capacidad de aclarado o clarificación de las proteínas, en particular en relación con la reducción de la turbidez de los líquidos.

Las reivindicaciones independientes y dependientes establecen características particulares y preferidas de la invención. Las características de las reivindicaciones dependientes se pueden combinar con las características de las reivindicaciones independientes u otras dependientes según corresponda. Las reivindicaciones adjuntas también se incluyen explícitamente por referencia en la descripción.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa esquemáticamente un proceso de extracción de acuerdo con una realización de la invención.

La Figura 2 representa un gráfico que representa la fuerza del gel a pH 6 de cada extracto (A) a (D).

La Figura 3 representa un gráfico que representa el perfil del índice de solubilidad de nitrógeno en función del pH para cada extracto (A) a (D).

La Figura 4 representa un gráfico que representa el perfil de viscosidad expresado en función del pH para cada extracto (A) a (D).

La Figura 5 representa un gráfico que representa el perfil del índice de solubilidad de nitrógeno expresado en función del pH para cada extracto E a G.

La Figura 6 representa un gráfico que representa la turbidez de diferentes soluciones que comprenden taninos

después de la incubación durante 96 h a 4 °C.

La Figura 7 representa un gráfico que representa la turbidez de diferentes soluciones que comprenden taninos en función del tiempo de incubación a 4 °C.

La Figura 8 representa un gráfico que representa la turbidez de diferentes soluciones que comprenden SiO₂ después de la incubación durante 96 h a 4 °C.

La Figura 9 representa un gráfico que representa la turbidez de diferentes soluciones que comprenden SiO₂ en función del tiempo de incubación a 4 °C.

La Figura 10 representa un gráfico que representa la turbidez de diferentes soluciones después de la incubación durante 96 h a 4 °C.

La Figura 11 representa un gráfico que representa la turbidez de diferentes soluciones de proteína de guisante después de la incubación durante 96 h a 4 °C.

La Figura 12 representa un gráfico que representa el índice de fermentación de diferentes masas preparadas con extractos de proteína de guisante.

La Figura 13 representa un gráfico que representa el volumen del pan preparado en el ejemplo 5.

La Figura 14 representa un gráfico que representa la dureza de la miga de pan del pan preparado en el ejemplo 5.

La Figura 15 representa un gráfico que representa la dureza de las barras en función de la vida útil de las barras preparadas en el ejemplo 5.

La Figura 16 representa un gráfico que representa el perfil del índice de solubilidad de nitrógeno en función del pH para cada extracto H e I.

La Figura 17 representa un gráfico que representa la concentración de azúcar/materia seca en % en función del tiempo de fermentación de los guisantes fermentados con *Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus Crispatus* LMG 12005 o *Lactobacillus Acidophilus* LMG 8151.

La Figura 18 representa un gráfico que representa el pH de los guisantes desvainados (7A) fermentados con *Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus Crispatus* LMG 12005 o *Lactobacillus Acidophilus* LMG 8151 y el pH de la solución acuosa (zumo) (7B) en función del tiempo de fermentación.

La Figura 19 representa un gráfico que representa la acidez de los guisantes desvainados (8A) fermentados con *Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus Crispatus* LMG 12005 o *Lactobacillus Acidophilus* LMG 8151 y la acidez de la solución acuosa (zumo) (8B) en función del tiempo de fermentación.

La Figura 20 representa un gráfico que representa las bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus Crispatus* LMG 12005 o *Lactobacillus Acidophilus* LMG 8151) concentración de la solución acuosa (jugo) en función del tiempo de fermentación.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir el presente método de la invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a métodos particulares, componentes, productos o combinaciones descritas, ya que tales métodos, componentes, productos y combinaciones pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/una", "una" y "el/la" incluyen referencias en singular y plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto de" como se usan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "que incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método adicionales y no citadas. Se apreciará que los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido de" tal como se usan en el presente documento comprenden los términos "que consiste en", "consiste" y "consiste en", así como los términos "que consisten esencialmente en", "consiste esencialmente" y "consiste esencialmente en".

La enumeración de intervalos numéricos por valores extremos incluye todos los números y fracciones abarcados dentro de los intervalos respectivos, así como los valores extremos enumerados.

El término "sobre" o "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un valor medible como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, se refiere a que abarca variaciones de +/- el 20 % o menos, preferentemente +/- el 10 % o menos, más preferentemente +/- el 5 % o menos, y aún más preferentemente +/- el 1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones son apropiadas para realizar la invención desvelada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "sobre" o "aproximadamente" también se divulga de forma específica y preferente.

Mientras que los términos "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más o al menos uno o más miembros de un grupo de miembros, es claro per se, por medio de más ejemplos, el término abarca, entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera de ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 etc. de dichos miembros, y hasta todos los dichos miembros.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos usados para desvelar la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la presente invención. Mediante una guía adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

En los siguientes pasajes, se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una realización" o "realización" significa que un rasgo particular, estructura o característica particular descrita junto con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una realización" o "en la realización" en diversos lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente a la misma realización, pero puede. Además, los rasgos particulares, las estructuras o características pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como sería evidente para una persona experta en la técnica a partir de la presente divulgación, en una o más realizaciones. Además, mientras que algunas realizaciones descritas en el presente documento incluyen algunas pero no otras características incluidas en otras realizaciones, las combinaciones de características de diferentes realizaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la invención, y forman diferentes realizaciones, como entenderán los expertos en la materia. Por ejemplo, en las reivindicaciones adjuntas, cualquiera de las realizaciones reivindicadas puede usarse en cualquier combinación.

En la siguiente descripción detallada de la invención, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma, y en los que se muestran a modo de ilustración solo de realizaciones específicas en las que se puede practicar la invención. El ámbito de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

También se describen en el presente documento las afirmaciones numeradas de la 1 a la 68.

1. Un método para extraer proteínas de guisante, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(b) aislar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante, preferentemente usando precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía;

(c) obtener dichas proteínas de guisante aisladas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8;

(d) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura de al menos 75 °C.

Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (c) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua.

2. El método de acuerdo con la afirmación 1, en donde la etapa (d) comprende someter dicha suspensión acuosa a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C, preferentemente, en el rango de 85 °C a 160 °C, por ejemplo, de 90 °C a 150 °C.

3. El método según la afirmación 1 o 2, en donde la etapa (d) comprende someter dicha suspensión acuosa a un

tratamiento térmico durante al menos 0,01 segundo, preferentemente durante un tiempo en el rango de 0,01 segundo a 20 minutos, preferentemente, en el rango de 10 segundos a 10 minutos.

- 5 4. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 3, en donde la etapa (d) comprende someter dicha suspensión acuosa a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s.
- 10 5. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 4, en donde el tiempo de someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura de al menos 75 °C en la etapa (d) disminuye cuando aumenta la temperatura.
- 15 6. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 5, en donde dicha etapa (b) comprende concentrar dichas proteínas de guisante.
- 20 7. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 6, en donde dicha etapa (b) comprende al menos una etapa de precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.
- 25 8. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 7, en donde la etapa (b) comprende la precipitación isoeléctrica.
- 30 9. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 8, en donde la etapa (b) comprende ajustar el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5.
- 35 10. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 9, en donde la etapa (c) comprende ajustar o mantener el pH de la suspensión acuosa para variar de 4,0 a 5,8.
- 40 11. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 10, en donde dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) tiene un pH de al menos 6,0, preferentemente, en el rango de 6,0 a 9,0, preferentemente, en el rango de 6,5 a 8,5.
- 45 12. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 11, en donde el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) se ajusta a al menos 6,0, preferentemente, en el rango de 6,0 a 9,0, preferentemente, en el rango de 6,5 a 8,5.
- 50 13. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 12, en donde antes de la etapa (a) una composición acuosa que comprende guisantes, preferentemente guisantes desvainados, se somete a fermentación, preferentemente en presencia de bacterias de ácido láctico.
- 55 14. El método de acuerdo con la afirmación 13, en donde dicha fermentación se realiza en presencia de uno o más *Lactobacillus* sp.
- 60 15. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 14, en donde antes o durante la etapa (b) dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante, o dichas proteínas de guisante se someten a un tratamiento térmico, preferentemente se someten a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo de al menos 40 °C, por ejemplo, como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 50 °C y como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 53 °C y como máximo 78 °C, por ejemplo de al menos 54 °C y de como máximo 75 °C.
- 65 16. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 15, en donde antes o durante la etapa (b) dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante, o dichas proteínas de guisante se someten a pasteurización.
- 70 17. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 16, que comprende además la etapa de secar dicha suspensión acuosa después de la etapa (d), preferentemente con secado por pulverización, obteniendo preferentemente una composición de proteína de guisante que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8, tal como se mide a temperatura ambiente en 10 g de composición de proteína de guisante suspendida en 90 g de agua
- 75 18. Proteínas de guisante que se pueden obtener por el método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17.
- 80 19. Composición de proteína de guisante, que comprende al menos el 60 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de la composición, en donde dicha composición de proteína de guisante tiene un índice de

- solubilidad de nitrógeno (ISN) a pH 7,0 de como máximo el 15 %, tal como se mide en una composición acuosa que comprende el 3 % en peso de dicha composición de proteína de guisante basada en el peso total de la composición acuosa, y preferentemente un ISN de como máximo el 11 %, preferentemente, como máximo, el 10 %, preferentemente, como máximo, el 9 %, preferentemente, como máximo, el 8 %. Preferentemente, la composición de proteína de guisante tiene una materia seca de al menos el 90 % basándose en el peso total de la composición.
- El contenido de nitrógeno (% en peso atómico) de muestras seleccionadas se determinó usando un analizador LECO. La técnica utilizada fue el método clásico de Dumas, que utiliza la detección de conductividad térmica (DCT): Las muestras pesadas se queman en oxígeno a 1200 °C. Los productos de combustión (incluido N₂ y NO_x) se barren con un gas de vehículo de helio a través de catalizadores de combustión, depuradores, y a través de un tubo lleno de cobre reducido. El cobre elimina el exceso de oxígeno y reduce el NO_x a N₂. El N₂ luego se mide con DCT.
20. Composición de proteína de guisante según la afirmación 19, en donde dicha composición tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8, tal como se mide a temperatura ambiente en 10 g de composición de proteína de guisante suspendida en 90 g de agua.
21. Una composición comestible, preferentemente, un producto alimenticio o pienso, que comprende las proteínas de guisante de acuerdo con la afirmación 18, o las composiciones de proteína de guisante de acuerdo con una cualquiera de las declaraciones 19 o 20.
22. Uso de las proteínas de guisante de acuerdo con la afirmación 18, o las composiciones de proteína de guisante de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 19 o 20, en productos alimenticios o piensos, preferentemente, en productos alimenticios de panadería y en productos alimenticios de confitería, tales como galletas, panes, gofres, pasteles, dulces de leche, cereales extrudidos y barras, etc.
23. Uso de las proteínas de guisante de acuerdo con la afirmación 18, o las composiciones de proteína de guisante de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 19 o 20, para aclarar bebidas y/o brebajes, preferentemente vino, zumo de frutas, cerveza.
24. El método según la afirmación 13 o 14, en donde después de dicha fermentación, los guisantes se muelen.
25. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17 y 24, en donde antes de la etapa (a) dicho método comprende las etapas de:
- proporcionar guisantes, preferentemente guisantes desvainados,
 - opcionalmente moler dichos guisantes; e
 - hidratar dichos guisantes, o dichos guisantes opcionalmente molidos;
26. El método de acuerdo con cualquiera de las declaraciones 1 a 17, 24 y 25, en donde antes de la etapa (a) dicho método comprende las etapas de:
- (a1) someter a fermentación una composición acuosa que comprende guisantes, preferentemente en presencia de una o más bacterias de ácido láctico;
 - (b1) moler dichos guisantes; obteniendo así guisantes molidos;
 - (c1) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas, también denominada composición acuosa que comprende proteínas de guisantes.
27. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26, en donde dichos guisantes en la etapa (a1) se someten a fermentación hasta que el pH en dichos guisantes sea como máximo 5,5, preferentemente como máximo 5,0, más preferentemente, en el rango de pH 3,5 a pH 5,0, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua.
28. El método según cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 y 27, en donde dichos guisantes en la etapa (a1) se someten a fermentación hasta que el pH en dichos guisantes se reduce en al menos 1 unidad de pH, preferentemente en al menos 1,5 unidades de pH, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua.
29. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 28, en donde la etapa (a1) comprende añadir guisantes secos y/o guisantes desvainados a una solución acuosa, preferentemente añadiendo guisantes secos que tienen un contenido de materia seca en el rango del 80 % al 95 % basándose en el peso total de los guisantes secos.

30. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 29, en donde dichos guisantes después de la etapa (a1) y antes de la etapa (b1) tienen un contenido de materia seca en el rango del 35 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
31. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 30, en donde la etapa (a1) comprende fermentar dichos guisantes hasta que tengan un contenido en materia seca en el rango del 35 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
32. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 31, en donde dichos guisantes en la etapa (a1) se someten a fermentación durante al menos 3 h, preferentemente durante al menos 3 h y como máximo 24 h.
33. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 32, en donde dichos guisantes en la etapa (a1) se someten a fermentación a una temperatura en el rango de 30 °C a 50 °C, preferentemente, en el rango de 35 °C a 45 °C.
34. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 33, en donde la etapa (a1) comprende fermentar dichos guisantes en presencia de bacterias del ácido láctico, preferentemente en presencia de uno o más *Lactobacillus* sp.
35. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 34, en donde dichos guisantes en la etapa (a1) se someten a fermentación en presencia de al menos 10² ufc a, como máximo, 10¹⁰ ufc de bacterias del ácido láctico por ml de dicha composición acuosa que comprende guisantes.
36. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 35, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c1) comprende separar al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes del resto del guisante, preferentemente en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción.
37. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 26 a 36, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c1) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente al menos 7, más preferentemente un pH de al menos 8 y de como máximo 9. Este ajuste de pH se puede realizar utilizando cualquier base adecuada, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.
38. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 26 a 37, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c1) comprende someter dichos guisantes molidos a una o más etapas de separación, preferentemente una o más etapas de decantación, preferentemente, una o más etapas de decantación centrífuga.
39. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 38, en donde la etapa (a1) comprende poner en contacto guisantes desvainados con una solución acuosa.
40. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 39, en donde la etapa (a1) comprende poner en contacto guisantes desvainados secos con una solución acuosa, preferentemente guisantes desvainados secos que tienen un contenido de materia seca en el rango del 80 % al 95 % basándose en el peso total del guisante desvainado seco.
41. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 40, en donde la etapa (a1) comprende fermentar dichos guisantes hasta que tengan un contenido en materia seca en el rango del 40 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
42. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 41, en donde dichos guisantes después de la etapa (a1) y antes de la etapa (b1) tienen un contenido de materia seca en el rango del 40 % al 50 % basándose en el peso total de los guisantes.
43. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 42, en donde antes, durante y/o después de la etapa de molienda (b1) se añade una solución acuosa, preferentemente agua, preferentemente tal como para obtener una composición acuosa que comprende los guisantes molidos, comprendiendo dicha composición del 15 % al 35 % de materia seca basándose en el peso total de la composición, que comprende preferentemente del 15 % al 35 %, preferentemente del 18 % al 33 %, por ejemplo del 20 % al 30 %, tal como al menos el 20 %, por ejemplo al menos el 21 %, por ejemplo al menos el 22 %, por ejemplo al menos el 23 %, por

ejemplo al menos el 24 %, por ejemplo al menos el 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, por ejemplo, como máximo, el 30%, por ejemplo, como máximo, el 35 %.

- 5 44. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 43, en donde dichos guisantes en la etapa (a1) se someten a fermentación durante un máximo de 24 h, por ejemplo, durante como máximo 20 h, por ejemplo, durante como máximo 18 h, por ejemplo, durante como máximo 12 h, por ejemplo, durante como máximo 10 h.
- 10 45. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 44, en donde al final de la etapa (a1) dichos guisantes tienen una acidez en el rango de 25 a 250 mEq OH⁻ por g de guisantes.
- 15 46. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 45, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c1) comprende ajustar el pH de la composición acuosa que comprende los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente al menos 7, preferentemente al menos 8, más preferentemente un pH de al menos 7,5 y de como máximo 9, preferentemente un pH de al menos 7,5 y como máximo de 8,5, y que separa una proteína que comprende una fracción de dichos guisantes molidos. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en la composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.
- 20 47. El método de acuerdo con la afirmación 46, en donde dicha al menos una fracción que comprende proteína se somete a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo de al menos 40 °C, por ejemplo de al menos 50 °C, por ejemplo de al menos 55 °C, por ejemplo, como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 50 °C y como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 53 °C y como máximo 78 °C, por ejemplo de al menos 54 °C y de como máximo 75 °C.
- 25 48. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 47, en donde dicha composición acuosa que comprende guisantes en la etapa (a1), comprende una solución acuosa, preferentemente agua.
- 30 49. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 48, en donde la cantidad de guisantes en dicha composición acuosa que comprende guisantes en la etapa (a) varía preferentemente de 150 a 500 kg de guisantes por m³ de composición acuosa que comprende los guisantes.
- 35 50. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 49, en donde dicha composición acuosa que comprende guisantes antes o al comienzo de la fermentación de la etapa (a1) tiene un pH de al menos 6, por ejemplo, al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,4, tal como se mide en la composición acuosa que comprende los guisantes, después de que dicha composición haya sido molida.
- 40 51. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17, o 24 a 50, en donde antes de la etapa (b) dicha composición acuosa que comprende proteína de guisante se somete a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo de al menos 55 °C, por ejemplo, como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 50 °C y como máximo 80 °C, por ejemplo, de al menos 55 °C y, como máximo, 78 °C.
- 45 52. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 51, en donde dichas bacterias de ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* y combinaciones de los mismos.
- 50 53. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 52, en donde las bacterias del ácido láctico son *Lactobacillus* sp, más preferentemente seleccionadas del grupo que comprende *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus casei* y mezclas de las mismas.
- 55 54. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 53, en donde las bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis* y mezclas de las mismas.
- 60 55. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 54, en donde las bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis* y mezclas de las mismas.
- 65 56. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 55, en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus fermentum*, o *Lactobacillus crispatus*.

57. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 53, en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, o *Lactobacillus plantarum*.

58. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 53, en donde dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, o *Lactobacillus acidophilus*.

59. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 58, en donde los guisantes secos antes del comienzo de la etapa (a1) tienen un pH de al menos 6,0, preferentemente un pH en el rango de 6,0 a 7,0 (es decir, antes de la fermentación), tal como por ejemplo al menos 6,0, por ejemplo, al menos 6,1, por ejemplo, al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,3, por ejemplo, como máximo 6,9, por ejemplo, como máximo 7,0, preferentemente, en el rango de 6,25 a 6,75, tal como se mide a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han molido con 95 g de agua.

60. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 13, 14, 24 o 26 a 59, en donde dicha fermentación es fermentación anaeróbica.

61. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17, o 24 a 60, que comprende las etapas de:

(i1) someter a fermentación una composición acuosa que comprende guisantes, preferentemente en presencia de una o más bacterias de ácido láctico;

(ii1) moler dichos guisantes en presencia de agua; obteniendo de este modo una composición acuosa que comprende guisantes molidos;

(iii1) fraccionar dicha composición acuosa que comprende guisantes molidos para obtener al menos una composición acuosa que comprende proteínas de guisante, preferentemente ajustando el pH de dicha composición acuosa a un pH de al menos 6.

Este ajuste de pH se puede realizar utilizando cualquier base adecuada, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.

62. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17, o 24 a 61, que comprende las etapas de:

(i) moler dichos guisantes; preferentemente guisantes secos;

(ii) fraccionar dichos guisantes molidos en presencia de una solución acuosa para obtener al menos una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(iii) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(iv) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8; y

(v) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura de al menos 75 °C.

Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (iv) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua.

63. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17, o 24 a 62, que comprende las etapas de:

(i) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación, preferentemente en presencia de una o más bacterias de ácido láctico;

(ii) moler dichos guisantes;

(iii) fraccionar dichos guisantes molidos en presencia de una solución acuosa para obtener al menos una

composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(iv) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(v) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8; y

(vi) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura de al menos 75 °C.

Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (v) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua.

64. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 26 a 63, en donde dicha etapa de fraccionamiento, comprende fraccionar dichos guisantes molidos en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción.

65. El método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 26 a 64, en donde dicha etapa de fraccionamiento comprende separar al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes del resto del guisante, preferentemente en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción.

66. El método de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 61 a 65, en donde obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 comprende ajustar o mantener el pH de la suspensión acuosa para que varíe de 4,0 a 5,8.

67. Composición de proteína de guisante que se puede obtener por el método de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones 1 a 17, o 24 a 66, que comprende al menos el 60 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de la composición, en donde dicha composición de proteína de guisante tiene un índice de solubilidad de nitrógeno a pH 7,0 de como máximo el 15 %, tal como se mide en una composición acuosa que comprende el 3 % en peso de dicha composición de proteína de guisante basada en el peso total de la composición acuosa, y preferentemente dicha composición de proteína de guisante tiene un ISN de, como máximo, el 11 %, preferentemente, como máximo, el 10 %, preferentemente, como máximo, el 9 %, preferentemente, como máximo, el 8 %.

68. Composición de proteína de guisante de acuerdo con una cualquiera de las afirmaciones 19, 20 y 67, en donde dicha composición tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8, tal como se mide a temperatura ambiente en 10 g de composición de proteína de guisante suspendida en 90 g de agua.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para extraer proteínas de guisante, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(b) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante preferentemente usando precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía;

(c) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8;

(d) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura de al menos 75 °C.

Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (c) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización se puede ajustar en esta medida mediante dilución con agua.

De acuerdo con la invención, las etapas (a) a (d) del método de acuerdo con la invención o como se especifica anteriormente pueden realizarse, y preferentemente se realizan en el siguiente orden, es decir, la etapa (a) precede a la etapa (b), que a su vez precede a la etapa (c), que a su vez precede a la etapa (d). Sin embargo, debe entenderse que el tratamiento térmico en la etapa (d) en cualquier caso se realiza después del aislamiento de las proteínas precipitadas en la etapa (c).

Tal como se usa en el presente documento, el término "guisante" se refiere a las semillas redondas contenidas en la vaina de *Pisum sativum* y su subespecie, variedades o variedades de cultivo. Preferentemente, los guisantes son guisantes amarillos, preferentemente guisantes amarillos secos, es decir, guisantes amarillos que se han cosechado en estado seco. Por lo tanto, "proteínas de guisante" como se usa en el presente documento se refiere a las proteínas contenidas en las semillas de guisante.

Tal como se usa en el presente documento, "extracción de proteínas de guisante" se refiere a la liberación y separación de proteínas de guisante de otros constituyentes de guisantes. La extracción de proteínas de guisante de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención puede abarcar el aislamiento o la purificación de proteínas de guisante. El experto en la materia comprenderá que los extractos de proteína de guisante no consisten enteramente en proteínas, y que una cierta cantidad de componentes adicionales (impurezas) pueden estar presentes en los extractos de proteína de guisante, tales como lípidos, hidratos de carbono, minerales, etc.

En algunas realizaciones de la invención, las proteínas de guisante, las composiciones de proteína de guisante y los extractos de proteína de guisante comprenden, basándose en la materia seca, al menos el 50 % en peso de proteínas (es decir, 50 g de proteínas por 100 g de materia seca total), preferentemente al menos el 75 % en peso de proteínas. En algunas realizaciones, los extractos de proteína de guisante comprenden, basándose en la materia seca, al menos el 50 % en peso a, como máximo, el 95 % en peso o el 99 % en peso de proteínas, tal como al menos el 75 % en peso a, como máximo, el 99 % en peso de proteínas. Los extractos crudos típicamente comprenden una fracción menor de proteína que los extractos refinados o purificados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "composición acuosa que comprende proteínas de guisante" o "solución acuosa que comprende proteínas de guisante" se refiere a una composición o solución que comprende agua y proteínas de guisante. En algunas realizaciones, dicha solución puede comprender constituyentes adicionales.

En una realización, la composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) del método de acuerdo con la invención o tal como se describe anteriormente comprende al menos el 1,0 % de materia seca basándose en el peso total de la composición, preferentemente, al menos el 2,0 % de materia seca, más preferentemente, al menos el 3,0 % de materia seca, tal como, por ejemplo, al menos el 4,0 % de materia seca, tal como, por ejemplo, al menos el 5,0 % de materia seca.

En otra realización, la composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) del método de acuerdo con la invención o, tal como se describió anteriormente, comprende del 1,0 % al 40 % de materia seca, preferentemente, del 2,0 % al 30 % de materia seca, más preferentemente, del 3,0 % al 20 % de materia seca, más preferentemente, del 3,0 % al 15 % de materia seca, tal como del 3,0 % al 10 %.

En una realización, la materia seca de la fracción que comprende la proteína comprende al menos el 50 % en peso de proteínas de guisante, preferentemente, al menos el 60 % en peso de proteínas de guisante, más preferentemente, al menos el 65 % en peso de proteínas de guisante, tal como, por ejemplo, al menos el 70 % en peso, tal como de al menos el 55 % en peso y, como máximo, el 80 % en peso, por ejemplo, del 60 % en peso al 80 % en peso, por ejemplo, del 60 % en peso al 78 % en peso.

En una realización, el pH de la composición acuosa que comprende proteínas de guisante tiene un pH o se ajusta a un pH de al menos 6,0, preferentemente, el pH es o se ajusta a un pH de al menos 6,5, preferentemente, en el rango de pH 6,0 a 8,5, preferentemente, en el rango de pH 6,5 a 8,5, preferentemente, en el rango de pH 7,0 a 8,5, preferentemente, de pH 7,3 a 8,0, tal como, por ejemplo, al menos pH 7,2, por ejemplo, al menos 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0. A este efecto, por ejemplo, se puede usar hidróxido de sodio o cualquier base adecuada para ajustar el pH al nivel deseado.

En algunas realizaciones, la composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) del método de acuerdo con la invención o, tal como se describe anteriormente, es una composición acuosa que comprende guisantes molidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molienda" tiene su significado habitual en la materia. Mediante una guía adicional, molienda, tal como se usa en el presente documento, puede referirse al proceso de molienda de materias sólidas, es decir, guisantes, bajo exposición de fuerzas mecánicas que surcan la estructura al superar las fuerzas de unión interior. La molienda puede desintegrar la estructura natural de los guisantes. En una realización preferida, el tamaño de partícula molida de un guisante molido que comprende al menos el 25 % en peso de materia seca tiene un D50 de 300 μm como máximo, preferentemente de, como máximo, 250 μm , por ejemplo, como máximo, 200 μm , con D50 definido como el tamaño de partícula para el cual el cincuenta por ciento en volumen de las partículas tiene un tamaño menor que el D50; y D50 medido por análisis de difracción láser en un analizador tipo Malvern.

Por ejemplo, el D50 se puede medir por tamizado o por análisis de difracción láser. Por ejemplo, se pueden utilizar ventajosamente los sistemas de difracción láser de Malvern Instruments. El tamaño de partícula se puede medir por análisis de difracción láser en un analizador de tipo Malvern. El tamaño de partícula se puede medir mediante análisis

de difracción láser en un analizador de tipo Malvern después de que los guisantes se hayan molido y estén en una suspensión de agua con un 25 % de materia seca. Los sistemas Malvern adecuados incluyen Malvern 2000, Malvern MasterSizer 2000 (tal como Mastersizer S), las series Malvern 2600 y Malvern 3600. Dichos equipos, junto con su manual de operación, cumplen o incluso superan los requisitos establecidos en la norma ISO 13320. El Malvern MasterSizer (como el Mastersizer S) también puede ser útil, ya que puede medir con mayor precisión el D50 hacia el extremo inferior del intervalo, por ejemplo, para tamaños de partícula promedio de menos de 8 µm, aplicando la teoría de Mie, utilizando medios ópticos apropiados.

En determinadas realizaciones, los guisantes molidos son guisantes desvainados molidos, es decir, guisantes extraídos de la vaina. Los guisantes desvainados son guisantes de los que se retira el recubrimiento externo de las semillas. La extracción de la vaina se puede realizar mediante técnicas conocidas en la materia, como, por ejemplo, mecánicamente con desvainadoras. Debe entenderse que cuando se hace referencia en el presente documento a guisantes desvainados, en algunas realizaciones, no todos, pero, sin embargo, la gran mayoría de los guisantes individuales son desvainados, tal como preferentemente más del 90 % de los guisantes están desvainados.

En una realización, antes, durante o después de moler los guisantes, una solución acuosa, preferentemente agua, como agua del grifo o agua del pozo tratada, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano, se añade a los guisantes. En una realización adicional, se añade una cantidad de solución acuosa a los guisantes, de tal manera que dicha composición comprende del 15 % al 35 % de materia seca basándose en el peso total de la composición, que comprende preferentemente del 15 % al 35 %, preferentemente del 20 % al 30 %, tal como al menos el 19 %, tal como al menos el 20 %, tal como al menos el 21 %, tal como al menos el 22 %, por ejemplo al menos el 23 %, por ejemplo al menos el 24 %, por ejemplo al menos el 25 %, por ejemplo al menos el 26 %, por ejemplo al menos el 27 %, por ejemplo al menos el 28 %, por ejemplo al menos el 29 %, por ejemplo, como máximo, el 30 %, por ejemplo, como máximo, el 35 % de materia seca en función del peso total de la composición. En una realización preferida, el proceso de molienda es un proceso de molienda en húmedo, de tal manera que se añade una solución acuosa a los guisantes antes o durante la molienda.

El experto en la materia comprenderá que si la composición acuosa que comprende proteínas de guisante es una composición acuosa que comprende guisantes molidos, todos, o sustancialmente todos los constituyentes del guisante están comprendidos en la composición acuosa.

En una realización preferida, la composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) del método de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento se refiere a una fracción que comprende proteínas de guisante, preferentemente obtenida después de moler los guisantes, y más preferentemente obtenida después de fraccionar dichos guisantes molidos. En una realización, la etapa (c1) del método de acuerdo con la invención o, tal como se describe anteriormente, comprende fraccionar dichos guisantes molidos en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción. Tal como se usa en el presente documento, el término "fraccionamiento" se refiere a un proceso por el cual, al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes se separan del resto del guisante. Debe entenderse que, cuando se hace referencia al paso de fraccionamiento, en algunas realizaciones, no todas, pero, sin embargo, la mayoría de las proteínas individuales están separadas, tal como, preferentemente, al menos el 50 % en peso, preferentemente, al menos el 60 % en peso de las proteínas, basándose en el contenido total de proteínas de los guisantes molidos, se separan.

Proporcionar una composición acuosa que comprenda proteínas de guisante en la etapa (a) se puede lograr por cualquier medio conocido en la materia, tal como el fraccionamiento de guisantes molidos en una fracción proteica. El fraccionamiento de los guisantes molidos en una fracción que comprende proteínas se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica, como la adición de una base adecuada o una sal.

Preferentemente, los guisantes molidos se fraccionan ajustando el pH de los guisantes molidos. Preferentemente, los guisantes molidos se fraccionan aumentando el pH de una composición acuosa que comprende guisantes molidos. Preferentemente, la etapa de fraccionamiento (c1) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente al menos 7, más preferentemente un pH de al menos 8 y como máximo 9. Preferentemente, la etapa de fraccionamiento (c1) comprende aumentar el pH de una composición acuosa que comprende los guisantes molidos. En una realización preferida, el pH de la composición se ajusta a un pH de al menos 6, más preferentemente al menos 7. En otra realización preferida, el pH de la composición se ajusta a un valor en el rango de pH 6 a pH 9, más preferentemente, de pH 7 a pH 9, tal como al menos 7,0, por ejemplo, al menos 7,1, por ejemplo, al menos 7,2, por ejemplo, al menos 7,3, por ejemplo, al menos 7,4, por ejemplo, al menos 7,5, por ejemplo, al menos 7,6, por ejemplo, al menos 7,7, por ejemplo, al menos 7,8, por ejemplo, al menos 7,9, por ejemplo, al menos 8,0, por ejemplo, al menos 8,1, por ejemplo, al menos 8,2, por ejemplo, al menos 8,3, por ejemplo, al menos 8,4, por ejemplo, como máximo 8,5, por ejemplo, como máximo 8,6, por ejemplo, como máximo 8,7, por ejemplo, como máximo 8,8, por ejemplo, como máximo 8,9, por ejemplo, como máximo 9,0, lo más preferentemente, en el rango de pH 7,5 a pH 8,5, lo más preferentemente, pH 8 o aproximadamente pH 8. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de los guisantes

molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia. Este ajuste de pH se puede realizar utilizando cualquier base adecuada, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico y similares. En una realización preferida, el pH de las composiciones que contienen guisantes molidos se ajusta mediante la adición de hidróxido de sodio.

5 En una realización preferida, después del ajuste del pH, la fracción que comprende proteínas se separa de la composición acuosa que comprende guisantes molidos, por decantación o por el uso de un hidrociclón, preferentemente por decantación, preferentemente, decantación centrífuga (es decir, por medio de una centrífuga de decantación), en donde la fracción que comprende la proteína es el sobrenadante, y el sedimento es una fracción que
10 comprende, entre otros, el resto del contenido de los guisantes molidos y algunas proteínas residuales. En una realización, se puede realizar más de una etapa de fraccionamiento de manera secuencial. Por ejemplo, después de la decantación, el sedimento se puede suspender en una solución acuosa (preferentemente, en una solución acuosa, que preferentemente tiene un pH similar o mayor (preferentemente, pH 8,5 o aproximadamente pH 8,5) que en la primera etapa de fraccionamiento) y se somete a una etapa de decantación, para recuperar proteínas adicionales en
15 el sobrenadante.

Debe entenderse que el proceso de molienda de los guisantes se puede realizar de manera simultánea con el fraccionamiento de los guisantes molidos, o como alternativa, el proceso de molienda de los guisantes se puede realizar antes de la etapa de fraccionamiento.

20 Debe entenderse que la fracción que comprende proteínas también puede comprender constituyentes adicionales, notablemente aquellos que se vuelven solubles por o permanecen solubles por la etapa de fraccionamiento. En una realización preferida, la concentración (basada en el peso seco) de proteínas en la fracción que comprende la proteína es al menos el 50 % en peso, preferentemente, al menos el 60 % en peso, tal como de al menos el 55 % en peso y,
25 como máximo, el 80 % en peso, por ejemplo, del 60 % en peso al 80 % en peso, por ejemplo, del 60 % en peso al 78 % en peso.

En una realización, la fracción que comprende proteínas comprende al menos el 1,0 % de materia seca basándose en el peso total de la composición, preferentemente, al menos el 2,0 % de materia seca, más preferentemente, al menos el 3,0 % de materia seca, tal como, por ejemplo, al menos el 4,0 % de materia seca, tal como, por ejemplo, al menos el 5,0 % de materia seca.

30 En otra realización, la fracción que comprende proteínas comprende del 1,0 % al 40 % de materia seca, preferentemente, del 2,0 % al 30 % de materia seca, más preferentemente, del 3,0 % al 20 % de materia seca, más preferentemente, del 3,0 % al 15 % de materia seca, tal como del 3,0 % al 10 %.

En una realización, la materia seca de la fracción que comprende la proteína comprende al menos el 50 % en peso de proteínas de guisante, preferentemente, al menos el 60 % en peso de proteínas de guisante, más preferentemente, al menos el 65 % en peso de proteínas de guisante, tal como, por ejemplo, al menos el 70 % en peso, tal como de al menos el 55 % en peso y, como máximo, el 80 % en peso, o entre el 60 % en peso y el 80 % en peso, o entre el 60 % en peso y el 78 % en peso.

En algunas realizaciones, en una etapa adicional, la fracción que comprende la proteína, también referida en el presente documento como la composición acuosa que comprende proteínas de guisante se somete a al menos un
45 tratamiento térmico, preferentemente dicha fracción que comprende proteína se somete a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo, al menos 40 °C, por ejemplo, al menos 50 °C, por ejemplo, dicha fracción que comprende proteína se somete a una temperatura en el rango de 30 °C a 90 °C, más preferentemente, en el rango de 50 °C a 80 °C, incluso más preferentemente, en el rango de 55 °C a 75 °C, tal como, por ejemplo, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C o 75 °C. En una realización, el tratamiento térmico es de 50 °C a 60 °C, por ejemplo, de 55 °C a 65 °C, por ejemplo, de 60 °C a 70 °C, por ejemplo, de 65 °C a 75 °C, por ejemplo, de 70 °C a 80 °C. El experto comprenderá que dicho
50 tratamiento térmico puede ser pasteurización. La pasteurización es bien conocida en la técnica y puede comprender un tratamiento térmico a una temperatura específica o intervalo de temperatura durante un tiempo o intervalo de tiempo específico. El experto en la materia entenderá que, de manera general, cuando la temperatura del tratamiento térmico, aumenta, la duración del tratamiento térmico disminuye.

55 La etapa (b) del presente proceso comprende aislar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante (es decir, de dicha fracción que comprende proteína). Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" o "aislamiento" puede referirse a un proceso que separa las proteínas de dichas proteínas que comprenden la fracción. El término "concentración" también se puede usar indistintamente con "aislamiento". Por consiguiente, en una realización, en la etapa (b) del método de acuerdo con la invención o tal como se describe anteriormente, las proteínas de guisante se concentran a partir de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante. Preferentemente, dicha etapa de aislamiento o concentración se puede realizar usando precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía, o una combinación de los mismos.

65 También se describe en el presente documento un método para extraer proteínas de guisante, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una composición acuosa que comprende proteínas de guisante, en donde dicha composición se obtiene mediante un método que comprende las etapas de:

5 (a1) moler guisantes, preferentemente guisantes desvainados;

(b1) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas formando así una composición acuosa que comprende proteínas de guisantes;

10 (b) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante preferentemente usando precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía;

(c) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8;

15 (d) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura de al menos 75 °C.

20 Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (c) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización se puede ajustar en esta medida mediante dilución con agua.

25 En una realización, el aislamiento o la concentración de dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante se puede realizar usando precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.

Preferentemente, las proteínas se aíslan o concentran mediante precipitación isoelectrica o por ultrafiltración. En una realización preferida, el aislamiento o la concentración de proteínas de guisante de dicha composición comprende al menos una etapa de precipitación isoelectrica de dichas proteínas. Preferentemente, el pH de la composición que comprende las proteínas de guisante se ajusta al punto isoelectrico de las proteínas. Tal como se usa en el presente documento, el término "punto isoelectrico" se refiere al pH al cual las proteínas tienen una carga iónica neta de 0, o sustancialmente 0 (es decir, la suma de las cargas positivas y negativas es 0, o sustancialmente 0). Si bien se aprecia que el punto isoelectrico de las proteínas individuales puede variar, tal como se usa en el presente documento, el pH isoelectrico de las composiciones de proteínas tal como se usa en el presente documento se refiere al pH de la composición al que la carga global de las proteínas en la composición es 0, o sustancialmente 0. El pH isoelectrico de proteínas y composiciones de proteínas se puede determinar mediante técnicas conocidas en la técnica. En el presente documento, el pH isoelectrico se determina como el pH al cual el índice de solubilidad de nitrógeno es el más bajo. En una realización preferida, el pH de la composición que comprende las proteínas se ajusta en el intervalo de 4,0 a 5,8, preferentemente de 4,5 a 5,5, tal como, por ejemplo, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8. El ajuste de pH se puede efectuar mediante la adición de un ácido, tal como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. En el punto isoelectrico, la mayoría de las proteínas precipitan o se agregan.

En determinadas realizaciones, el aislamiento de las proteínas precipitadas o agregadas se efectúa separando una fracción líquida de una fracción insoluble, comprendiendo ésta última las proteínas de guisante precipitadas o agregadas. La separación de las proteínas precipitadas o agregadas se puede efectuar por decantación, preferentemente decantación centrífuga. En una realización preferida, el contenido de materia seca (en peso) después de la separación de las proteínas precipitadas o agregadas varía del 20 % al 40 %, tal como, por ejemplo, al menos el 25 %, por ejemplo al menos el 26 %, por ejemplo al menos el 27 %, por ejemplo al menos el 28 %, por ejemplo al menos el 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o el 35 %, preferentemente al menos el 27 % y como máximo el 38 % basándose en el peso total de las proteínas precipitadas o agregadas. El contenido de materia seca se puede ajustar aún más, por ejemplo, mediante la adición de una solución acuosa a las proteínas precipitadas o agregadas, obteniendo así una composición de proteínas precipitadas, preferentemente agua, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano. Preferentemente, el contenido de materia seca se puede ajustar para variar del 10 % al 25 %, preferentemente del 15 % al 20 %, tal como, por ejemplo, al menos el 15 %, por ejemplo, al menos el 16 %, preferentemente, al menos el 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, basándose en el peso total de la composición de proteínas precipitadas. Opcionalmente, el proceso de aislamiento de las proteínas se puede repetir al menos una vez más. Preferentemente, la etapa de concentrar las proteínas se realiza solo una vez.

En una realización preferida, las proteínas precipitadas o agregadas se resuspenden preferentemente en una solución acuosa, preferentemente agua, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano. El contenido de materia seca varía preferentemente del 10 % al 25 %, preferentemente del 15 % al 20 %, tal como, por ejemplo, al menos el 15 %, por ejemplo al menos el 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % de la composición de proteína resuspendida.

65 De acuerdo con la invención, el pH de la composición que comprende las proteínas reconstituidas se ajusta (si es necesario) o se mantiene en un intervalo de 4,0 a 5,8, preferentemente de pH 4,5 a 5,5, tal como, por ejemplo, pH 4,5,

4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5. A este efecto, por ejemplo, se puede usar hidróxido de sodio o ácido sulfúrico para ajustar el pH al nivel deseado. Por consiguiente, obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 en la etapa (c) del método descrito anteriormente comprende ajustar o mantener el pH de la suspensión acuosa para que varíe de 4,0 a 5,8, preferentemente de pH 4,5 a 5,5, tal como, por ejemplo, pH 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende las proteínas reconstituidas que tienen una materia seca de, como máximo, el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de la composición se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.

En la etapa (d) como se describe en el presente documento, dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 se somete a tratamiento térmico a una temperatura de al menos 75 °C, preferentemente, la suspensión acuosa se somete a una temperatura de al menos 77 °C, preferentemente, al menos 78 °C, preferentemente, al menos 80 °C, aún más preferentemente, al menos 85 °C, aún más preferentemente, al menos 90 °C, por ejemplo, al menos 95 °C, preferentemente, como máximo 160 °C, aún más preferentemente, como máximo 210 °C. Preferentemente, dichas proteínas se someten a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C, preferentemente, en el rango de 85 °C a 160 °C, más preferentemente, en el rango de 90 °C a 150 °C. El tratamiento térmico se puede realizar ventajosamente por medio de uno o más intercambiadores de calor o por inyección directa o indirecta de vapor. En una realización, la duración del tratamiento térmico es de al menos 0,01 segundo, preferentemente, en el rango de 0,01 segundo a 20 min, preferentemente, en el rango de 10 segundos a 10 minutos. El experto en la materia apreciará que cuanto mayor sea la temperatura, menor será la duración del tratamiento térmico. Por ejemplo, el tratamiento térmico puede ser a una temperatura en el rango entre 115 °C y 210 °C durante un tiempo en el rango de 0,01 s a 15 s. Como alternativa, por ejemplo, el tratamiento térmico puede ser a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 5 min. Como alternativa, por ejemplo, el tratamiento térmico puede ser a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 min. En una realización preferida, el tratamiento térmico se realiza a una temperatura en el rango entre 75 °C y 110 °C, incluso, más preferentemente, a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C, durante un tiempo en el rango de 2 min a 10 min, preferentemente, durante un tiempo en el rango de 5 min a 8 min. En otra realización preferida, el tratamiento térmico se realiza a una temperatura en el rango entre 130 °C y 150 °C durante un tiempo en el rango de 1 s a 8 s. Después del tratamiento térmico, las composiciones que contienen proteínas se pueden mantener a una temperatura en el rango de 70 °C a 90 °C; preferentemente, en el rango de 70 °C a 85 °C, antes del secado.

De acuerdo con la invención, en la etapa (d) del método de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento, dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 se somete a tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s. Preferentemente, el tiempo del tratamiento térmico disminuye cuando aumenta la temperatura del tratamiento térmico.

En una realización, dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C puede someterse a secado después de la etapa (d) del método de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento. El secado se puede realizar por cualquier medio en la técnica, tal como por aplicación de aire caliente, evaporación, liofilización, secado por contacto, secado al vapor, secado dieléctrico, secado de rodillos, secado instantáneo, etc. En una realización preferida, la suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C se seca mediante secado por pulverización. Opcionalmente, las proteínas se pueden someter a granulación, mediante técnicas conocidas en la materia.

En determinadas realizaciones, las proteínas de guisante en la composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) de los métodos según la invención como se describe en el presente documento pueden provenir de guisantes molidos. En una realización, dichos guisantes molidos, se emiten a partir de guisantes que se han hidratado, o dichos guisantes se muelen en seco y se hidratan.

En otra realización, dichos guisantes molidos han sido fermentados antes de la molienda. Cuando los guisantes enteros se someten a fermentación antes de la molienda, ventajosamente eliminación de los microorganismos fermentadores, así como subproductos de fermentación, tales como ácido láctico, pero también compuestos secretados como enzimas, que puede afectar el procesamiento aguas abajo, se separan fácilmente y de manera rentable de los guisantes después de la fermentación. Además, inesperadamente, al fermentar guisantes enteros el contenido en monosacáridos, disacáridos y/u oligosacáridos de los guisantes y, en particular, los azúcares monoméricos o diméricos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y/o azúcares flatulentos, tales como rafinosa, estaquiosa y verbascosa, todos los cuales están dentro de los guisantes se reducen drásticamente, lo cual es aún más sorprendente cuando se tiene en cuenta la duración limitada de la fermentación en algunas realizaciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término "azúcar" o "azúcar libre" se refiere a monosacáridos, disacáridos y/u oligosacáridos que consisten en hasta 10 unidades de monómero. En algunas realizaciones, cuando se hace referencia a "azúcares totales" o "azúcares libres totales", éstos abarcan el total de monosacáridos, disacáridos y/u oligosacáridos que consisten en hasta 10 unidades de monómero. En otras realizaciones, se especifica un subconjunto específico de azúcares.

En una realización, una composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación, preferentemente en presencia de una o más bacterias del ácido láctico. Preferentemente, los guisantes que se fermentan son guisantes sin moler (es decir, guisantes enteros). Sin embargo, los guisantes pueden ser, en una realización, guisantes partidos. En una realización, los guisantes son redondos cuando se cosechan y se secan. Después de quitar la vaina, la división natural en el cotiledón de la semilla se puede separar de forma manual o mecánica, dando como resultado "guisantes partidos".

Los guisantes, tal como se usan en el presente documento, se pueden clasificar antes de someterlos a fermentación. Por ejemplo, las piedras o el material vegetal más grande, pero también los guisantes dañados, se pueden retirar de los guisantes que se van a usar de acuerdo con la invención.

En tales realizaciones donde los guisantes se someten a fermentación, los guisantes, preferentemente guisantes secos, preferentemente guisantes desvainados, tales como los guisantes secos desvainados se suspenden en una solución acuosa. En una realización preferida, la solución acuosa es agua. En una realización, el agua puede ser agua potable o agua de pozo que ha sido tratada para hacerla potable. El agua utilizada es preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano.

En algunas realizaciones, la cantidad de guisantes que se añade a la solución acuosa para reconstituir la composición acuosa que comprende guisantes varía preferentemente de 150 a 500 kg de guisantes por m³ de composición acuosa que comprende los guisantes, es decir, por 150 a 500 kg de guisantes, se añade una solución acuosa hasta que se alcanza un volumen final de 1 m³.

En una realización, la composición acuosa que comprende los guisantes al comienzo de la fermentación, tiene un pH de al menos 6,0, preferentemente al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,4, tal como se mide en la composición acuosa que comprende los guisantes, después de que dicha composición haya sido molida.

En una realización preferida, los guisantes que se ponen en contacto con la composición acuosa se cosechan naturalmente en seco, o en una realización los guisantes pueden ser guisantes frescos. Preferentemente, los guisantes son guisantes secos, y tienen un contenido de materia seca (en peso) de al menos el 80 % (es decir, al menos 80 g de materia seca por 100 g de peso total de los guisantes secos), más preferentemente, de al menos el 85 %, por ejemplo, de al menos el 90 %, por ejemplo, de al menos el 95 %, como, por ejemplo, en el rango del 80 % al 95 %, por ejemplo del 85 % al 95 %, por ejemplo del 90 % al 95 %.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fermentación" tiene su significado habitual en la materia. Mediante una guía adicional, la fermentación es un proceso metabólico microbiológico que comprende la conversión de azúcar a ácidos y/o gases utilizando levadura y/o bacterias. Someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación como se usa en el presente documento, por lo tanto, se puede referir a incubar la composición acuosa que comprende guisantes con bacterias y/o levadura, preferentemente bacterias del ácido láctico, en condiciones adecuadas para que las bacterias y/o levaduras sean metabólicamente activas.

Tal como se usa en el presente documento, "bacteria del ácido láctico" se refiere a una población de cocos o bacilos Gram-positivos, con bajo contenido de GC, tolerantes a los ácidos, generalmente no esporulantes, que no respiran, que están asociadas por sus características metabólicas y fisiológicas comunes, y que producen ácido láctico como principal producto final metabólico de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias, normalmente se pueden encontrar en productos lácticos y plantas en descomposición. Tal como se usa en el presente documento, las bacterias del ácido láctico pueden no ser patógenas en el sentido de que no causan daño o no llevan a efectos nocivos cuando se ingieren. Preferentemente, las bacterias del ácido láctico tal como se usan en el presente documento son uno o más géneros bacterianos seleccionados de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* y combinaciones de los mismos. Lo más preferentemente, las bacterias del ácido láctico son *Lactobacillus* sp, más preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii*, y *Lactobacillus casei*, y mezclas de las mismas, por ejemplo del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acidophilus* y mezclas de las mismas, por ejemplo del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis* y mezclas de las mismas, por ejemplo dicha bacteria es *Lactobacillus fermentum*, o *Lactobacillus crispatus*. En algunas realizaciones, la fermentación puede ser fermentación espontánea (es decir, en la cual no se agregan deliberadamente microorganismos fermentadores, pero la fermentación se efectúa por microorganismos,

preferentemente bacterias del ácido láctico, que se dan en la naturaleza sobre/dentro de los guisantes y/o en el medio ambiente) o pueden ser fermentaciones inoculadas (es decir, en las cuales microorganismos fermentadores, preferentemente bacterias del ácido láctico, se añaden deliberadamente). La fermentación también se puede efectuar transfiriendo parte o la totalidad de la fracción acuosa de una etapa de fermentación a la siguiente fermentación que se iniciará, por ejemplo transfiriendo al menos 1/10 del primer volumen de fermentación a al menos una segunda etapa de fermentación. En una realización preferida, la fermentación es fermentación anaeróbica, (no estrictamente anaeróbica). En una realización preferida, dicha *Lactobacillus fermentum* es *Lactobacillus fermentum* LMG 6902 o LMG 18026. En una realización preferida, dicha *Lactobacillus Crispatus* es *Lactobacillus Crispatus* LMG 12005. En una realización preferida, dicha *Lactobacillus acidophilus* es *Lactobacillus acidophilus* LMG 8151.

En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación hasta que el pH en los guisantes sea como máximo 5,5, preferentemente como máximo 5,0, más preferentemente, que varíe de 3,5 a 5, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental. En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación hasta que el pH en los guisantes varíe de 3,5 a 4,5, por ejemplo, de 4,0 a 5,0, preferentemente de 4,5 a 5,5, tal como por ejemplo al menos 3,5, por ejemplo, al menos 3,75, por ejemplo, al menos 4,0, por ejemplo, al menos 4,25, por ejemplo, al menos 4,50, por ejemplo, al menos 4,75, por ejemplo, como máximo 5,0, por ejemplo, como máximo 5,25, por ejemplo, como máximo 5,5, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental.

En una realización, los guisantes secos tienen un pH de al menos 6,0, preferentemente, en el rango de 6,0 a 7,10 antes de la fermentación, tal como por ejemplo al menos 6,0, por ejemplo, al menos 6,1, por ejemplo, al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,3, por ejemplo, 6,4, por ejemplo, 6,5, por ejemplo, 6,6, por ejemplo, 6,7, por ejemplo, 6,8, por ejemplo, 6,9, por ejemplo, 7,10, preferentemente, en el rango de 6,25 a 6,75, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental.

En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación hasta que el pH en los guisantes disminuye al menos 1 unidad de pH, preferentemente en al menos 1,5 unidades de pH, tal como por ejemplo al menos 1, por ejemplo, al menos 1,1, por ejemplo, al menos 1,2, por ejemplo, al menos 1,3, por ejemplo, al menos 1,4, por ejemplo, al menos 1,5, por ejemplo, al menos 1,6, por ejemplo, al menos 1,7, por ejemplo, al menos 1,8, por ejemplo, al menos 1,9, por ejemplo, al menos 2, por ejemplo, al menos 2,1, por ejemplo, al menos 2,2, por ejemplo, al menos 2,3, por ejemplo, al menos 2,4, por ejemplo, al menos 2,5, por ejemplo, al menos 2,6, por ejemplo, al menos 2,7, por ejemplo, al menos 2,8, por ejemplo, al menos 2,9, por ejemplo, al menos 3 unidades de pH, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental. En otra realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación hasta que el pH en los guisantes disminuye en 1 unidad de pH a 3 unidades de pH, preferentemente, en 1,5 unidades de pH a 3 unidades de pH, tal como, por ejemplo, en 1,5 unidades de pH a 2,5 unidades de pH, por ejemplo, en 2,0 unidades de pH a 3,0 unidades de pH, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental. A modo de ejemplo, y sin limitación, al comienzo de la fermentación, el pH en los guisantes puede ser 6,5, y al final de la fermentación, el pH en los guisantes puede ser 5,0, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que han sido molidos y luego suspendidos en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental.

En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación durante al menos 3 h, preferentemente, al menos 4 h, más preferentemente, al menos 6 h. En otra realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación durante un tiempo en el rango de 3 h a 24 h, preferentemente, en el rango de 4 h a 24 h, más preferentemente, en el rango de 4 h a 20 h, tal como, por ejemplo, al menos 3 h, por ejemplo, al menos 4 h, por ejemplo, al menos 5 h, por ejemplo, al menos 6 h, por ejemplo, al menos 7 h, por ejemplo, al menos 8 h, al menos 9 h, alrededor de 10 h, alrededor de 11 h, alrededor de 12 h, alrededor de 13 h, alrededor de 14 h, por ejemplo, como máximo 15 h, por ejemplo, como máximo 16 h, por ejemplo, como máximo 17 h, por ejemplo, como máximo 18 h, por ejemplo, como máximo 19 h, por ejemplo, como máximo 20 h, por ejemplo, como máximo 21 h, por ejemplo, como máximo 22 h, por ejemplo, como máximo 23 h, por ejemplo, como máximo 24 h. El experto apreciará que, por ejemplo, las fermentaciones espontáneas pueden llevar más tiempo que las fermentaciones que se efectúan mediante la adición de bacterias, en vista de las diferentes cantidades de microorganismos al inicio de la fermentación.

En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación a una temperatura óptima para el microorganismo fermentador, preferentemente, a una temperatura que es como máximo 5 °C más alta o más baja que la temperatura que es óptima para el microorganismo de fermentación. Las temperaturas óptimas para las bacterias y/o levaduras tal como se definen en el presente documento son conocidas en la técnica. Por medio de orientación adicional, y sin limitación, una temperatura óptima tal como se define en el presente documento se refiere a la temperatura a la cual se maximiza el crecimiento. En una realización adicional, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo, en el rango de 30 °C a 50 °C, preferentemente, en el rango de 35 °C a 45 °C. En otra realización, la composición acuosa que comprende

guisantes se somete a fermentación a una temperatura en el rango de 30 °C a 40 °C, de 35 °C a 45 °C, o de 40 °C a 50 °C, preferentemente 40 °C, o aproximadamente 40 °C.

En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en presencia de microorganismos fermentadores, tales como bacterias y/o levaduras, preferentemente, que comprenden una o más bacterias del ácido láctico, más preferentemente, dichas bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende uno o más *Lactobacillus* sp.. En una realización, la fermentación se realiza en presencia de uno o más de los microorganismos especificados anteriormente, preferentemente bacterias del ácido láctico, a una concentración en el rango de 10^2 ufc/ml a 10^{10} ufc/ml de dicha composición acuosa que comprende los guisantes, tal como al menos 10^4 ufc/ml, por ejemplo, al menos 10^5 ufc/ml, por ejemplo, al menos 10^6 ufc/ml, por ejemplo, al menos 10^7 ufc/ml, por ejemplo, al menos 10^8 ufc/ml, por ejemplo, al menos 10^9 ufc/ml de dicha composición acuosa que comprende los guisantes. Las "ufc" (unidades formadoras de colonias) son bien conocidas en la materia y se pueden determinar, por ejemplo, mediante recuento de placas. Debe entenderse que "ufc/ml" se refiere a la cantidad de ufc por ml de la composición acuosa total que comprende guisantes, es decir, incluidos los guisantes.

En otra realización, la composición acuosa que comprende los guisantes se somete a fermentación en presencia de microorganismos fermentadores, preferentemente, que comprenden una o más bacterias del ácido láctico, preferentemente que comprende una o más *Lactobacillus* sp., en donde los microorganismos, preferentemente bacterias del ácido láctico, se añaden a una concentración de al menos 10^2 ufc/ml de composición acuosa que comprende guisantes.

En una realización, los guisantes al final de la fermentación y antes de la etapa de molienda, tienen un contenido de materia seca (en peso) en el rango del 35 % al 60 %, preferentemente, del 35 % al %, por ejemplo del 40 % al 50 %, tal como, por ejemplo, al menos el 40 %, por ejemplo, al menos el 41 %, al menos el 42 %, por ejemplo, al menos el 43 %, por ejemplo, al menos el 44 %, por ejemplo, al menos el 45 %, por ejemplo, al menos el 46 %, por ejemplo, al menos el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, por ejemplo, como máximo, el 50 %, por ejemplo, como máximo, el 55 %, por ejemplo, como máximo el 60 % basado en el peso total de los guisantes al final de la fermentación, es decir, después de que los guisantes se hayan aislado de la composición acuosa.

En una realización adicional, los guisantes se fermentan hasta que tienen un contenido de materia seca (en peso) en el rango del 35 % al 60 %, preferentemente del 35 % al 55 %, por ejemplo del 40 % al 50 %, tal como, por ejemplo, al menos el 40 %, por ejemplo, al menos el 41 %, al menos el 42 %, por ejemplo, al menos el 43 %, por ejemplo, al menos el 44 %, por ejemplo, al menos el 45 %, por ejemplo, al menos el 46 %, por ejemplo, al menos el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, por ejemplo, como máximo, el 50 %, por ejemplo, como máximo, el 55 %, por ejemplo, como máximo el 60 % basado en el peso total de los guisantes al final de la fermentación, es decir, después de que los guisantes se hayan aislado de la composición acuosa. En esta realización, los guisantes tienen preferentemente un contenido de materia seca (en peso) antes de la fermentación, o al comienzo de la fermentación de al menos el 80 % (es decir, al menos 80 g de materia seca por 100 g de peso total de los guisantes secos), más preferentemente, de al menos el 85 %, por ejemplo, de al menos el 90 %, por ejemplo, de al menos el 95 %, como, por ejemplo, en el rango del 80 % al 95 %, por ejemplo del 85 % al 95 %, por ejemplo del 90 % al 95 %.

En una realización, se muelen los guisantes que han sido sometidos a fermentación. A este efecto, en una realización, los guisantes pueden retirarse de la composición acuosa después de la fermentación y luego someterse a molienda. Preferentemente, los guisantes se lavan o enjuagan después de la fermentación y antes de la molienda. El lavado o enjuague se puede realizar con una solución acuosa, preferentemente agua, como agua o agua de pozo tratada, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano.

En una realización preferida, el método para extraer proteínas de guisante de *Pisum sativum* ssp., comprende las etapas de:

(i) proporcionar guisantes;

(ii) moler dichos guisantes;

(iii) fraccionar dichos guisantes molidos en presencia de una solución acuosa para obtener al menos una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(iv) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante;

(v) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8; y

(vi) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C;

- en donde la etapa (b) comprende ajustar el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5;
- 5 en donde la etapa (d) comprende someter dichas proteínas de guisante precipitadas a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s.
- 10 Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (v) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización se puede ajustar en esta medida mediante dilución con agua.
- 15 En una realización preferida, el método para extraer proteínas de guisante de *Pisum sativum* ssp, comprende las etapas de:
- (i) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación, preferentemente en presencia de una o más bacterias de ácido láctico;
- 20 (ii) moler dichos guisantes;
- (iii) fraccionar dichos guisantes molidos en presencia de una solución acuosa para obtener al menos una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;
- 25 (iv) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante;
- (v) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8; y
- 30 (vi) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C;
- 35 en donde la etapa (b) comprende ajustar el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5;
- en donde la etapa (d) comprende someter dichas proteínas de guisante precipitadas a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s.
- 40 Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (v) tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización se puede ajustar en esta medida mediante dilución con agua.
- 45 En una realización preferida, el método para extraer proteínas de guisante de *Pisum sativum* ssp., comprende las etapas de:
- 50 (i1) proporcionar una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;
- (ii1) aislar o concentrar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante, preferentemente usando precipitación isoeléctrica, preferentemente ajustando el pH de dicha composición acuosa a un pH en el rango de 4,0 a 5,8;
- 55 (iii1) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8;
- 60 (iv1) opcionalmente ajustar el contenido de materia seca de la suspensión acuosa a un valor en el rango del 10 % al 25 %, preferentemente del 15 % al 20 %;
- (v1) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C;
- 65 en donde la etapa (b) comprende ajustar el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante

a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5;

en donde la etapa (d) comprende someter dichas proteínas de guisante precipitadas a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s;

(vi1) secar dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8, obteniendo preferentemente una composición de proteína de guisante que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8, tal como se mide a temperatura ambiente en 10 g de composición de proteína de guisante suspendida en 90 g de agua.

Preferentemente, la suspensión acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (iii1) tiene una materia seca de, como máximo, el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización se puede ajustar en esta medida mediante dilución con agua.

Los extractos de proteína de guisante obtenidos por los métodos de acuerdo con la presente invención tal como se describe en el presente documento tienen características diferentes, tales como diferentes características bioquímicas y/u organolépticas, así como una diferencia en los valores de los parámetros asociados a la calidad en comparación con las proteínas de guisante conocidas de la técnica anterior.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención abarca extractos de proteína de guisante y composiciones de proteína de guisante obtenidas por o que se pueden obtener por los métodos de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de proteína de guisante que comprende al menos el 60 % en peso de proteína basada en la materia seca total de la composición, en donde dicha composición de proteína de guisante tiene un índice de solubilidad de nitrógeno a pH 7,0 de como máximo el 15 %, tal como se mide en una composición acuosa que comprende el 3% en peso de dicha composición de proteína de guisante basada en el peso total de la composición acuosa, y preferentemente un ISN a pH 7,0 de como máximo el 11 %, preferentemente, como máximo, el 10 %, preferentemente, como máximo, el 9 %, preferentemente, como máximo, el 8 %. En una realización preferida, dicha composición se obtiene por el método de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de proteína de guisante que tiene una fuerza de gel a pH 6 de, como máximo 100 g, preferentemente, como máximo 75 g, incluso más preferentemente, como máximo 50 g. En otro aspecto, la invención se refiere a proteínas de guisante que tienen una fuerza de gel a pH 6 en el rango de 10 g a 100 g, preferentemente, en el rango de 10 g a 75 g, incluso más preferentemente, en el rango de 10 g a 50 g.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de proteína de guisante que comprende al menos el 60 % en peso de proteína basada en la materia seca total de la composición, en donde dicha composición de proteína de guisante tiene un índice de solubilidad de nitrógeno a pH 7,0 de como máximo el 15 %, tal como se mide en una composición acuosa que comprende el 3% en peso de dicha composición de proteína de guisante basada en el peso total de la composición acuosa, y preferentemente un ISN a pH 7,0 de como máximo el 11 %, preferentemente, como máximo, el 10 %, preferentemente, como máximo, el 9 %, preferentemente, como máximo, el 8 %, y una fuerza de gel a pH 6 de, como máximo, 100 g, preferentemente, como máximo, 75 g, incluso más preferentemente, como máximo, 50 g. En otro aspecto, la invención se refiere a proteínas de guisante que tienen una fuerza de gel a pH 6 en el rango de 10 g a 100 g, preferentemente, en el rango de 10 g a 75 g, incluso más preferentemente, en el rango de 10 g a 50 g.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a proteínas de guisante que tienen una o más, preferentemente todas las características A a H tal como se indican en la Tabla 1.

Tabla 1

Tabla 1		
A	solubilidad (% de ISN); pH 7,0	< 15; preferentemente, entre 1 y 10
B	fuerza de gel (g)	< 100; preferentemente, entre 10 y 100
C	densidad tras el asentamiento (kg/l)	> 0,5; preferentemente, entre 0,5 y 1,0
D	densidad aparente (kg/l)	> 0,5; preferentemente, entre 0,5 y 1,0
E	Fluidez (unidades Brabender) usando viscógrafo	< 1000; preferentemente, entre 200 y 1000
F	Humectabilidad (s)	< 60; preferentemente, entre 1 y 60
G	Viscosidad (cP), pH 5,8	< 200; preferentemente, entre 50 y 200
H	viscosidad (cP); pH 6,0	< 200; preferentemente, entre 50 y 200

[illegible]

El experto entenderá que cuando se refiere a "proteínas de guisante" en algunas realizaciones, de hecho se describe una composición, que predominantemente, pero no exclusivamente, comprende proteínas de guisante. Las impurezas residuales pueden estar presentes en tales composiciones. Dichas impurezas residuales pueden incluir, por ejemplo, minerales, azúcares, etc. En una realización preferida, el término proteínas de guisante se refiere preferentemente a una composición que comprende (basándose en la materia seca total de la composición) al menos el 60 % en peso de proteínas, preferentemente, al menos el 75 % en peso de proteínas, más preferentemente, al menos el 80 % en peso. En otra realización preferida, el término proteínas de guisante se refiere a un extracto de proteína de guisante o una composición de proteína de guisante que comprende (basándose en la materia seca total de la composición) del 70 % en peso al 98 % en peso de proteínas, preferentemente, del 75 % en peso al 98 % en peso de proteínas, más preferentemente, del 80 % en peso al 98 % en peso de proteínas, más preferentemente, del 85 % en peso al 98 % en peso, aún más preferentemente, del 88 % en peso al 98 % en peso.

También se describe en el presente documento una composición que comprende proteínas de guisante obtenidas por o que se pueden obtener por los métodos de acuerdo con la invención tal como se describe en el presente documento. En un ejemplo preferido, tal composición es una composición comestible. Tal como se usa en el presente documento, y como entenderá el experto en la materia, una composición "comestible" se refiere a una composición que es adecuada para consumo humano o animal. Preferentemente, dicha composición es un alimento o pienso, más preferentemente, un producto alimenticio de panadería, o un producto alimenticio de confitería. En una realización preferida, dicho producto alimenticio es una galleta, pan, pastel, gofre, dulce de leche, cereal extrudido o barra.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso del extracto de proteína de guisante como se describe en el presente documento, en particular, el extracto de proteína de guisante obtenido o que se puede obtener de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, en productos alimenticios o piensos. En una realización preferida, los productos alimenticios son productos alimenticios de panadería o productos alimenticios de confitería. El extracto de proteína de guisante tal como se describe en el presente documento puede, por ejemplo, reemplazar parcial o completamente otras proteínas en alimentos o productos alimenticios, tal como, por ejemplo, proteínas de origen animal, tales como las proteínas lácteas. Las aplicaciones particularmente adecuadas del extracto de proteína de guisante tal como se describe en el presente documento se pueden usar, por ejemplo, en procesos para preparar productos alimenticios de panadería o productos de confitería.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del extracto de proteína de guisante tal como se describe en el presente documento, en particular, el extracto de proteína de guisante obtenido o que se puede obtener de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento para aclarar o clarificar líquidos, como por ejemplo brebajes y bebidas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "aclarar" y "clarificar" tienen su significado habitual en la materia. Por medio de orientación adicional, y sin limitación, el término "aclarar" se refiere a un proceso por el cual, por ejemplo, los elementos insolubles (suspendidos) se eliminan de un líquido mediante la adición de un agente de aclarado. La adición de un agente de aclarado puede hacer que los elementos insolubles se agreguen, pero también que se formen ciertos elementos solubles de partículas más grandes (por ejemplo, proteínas), que se pueden retirar fácilmente, tal como por filtración o centrifugación. En una realización, el líquido que se puede aclarar o clarificar es una bebida, es decir, un líquido adecuado para consumo humano o animal. En una realización particularmente preferida, dicha bebida es una bebida fermentada, tal como una bebida alcohólica, preferentemente vino (que incluye, pero sin limitación, vino blanco, vino rosado, champán, Oporto, Jerez, etc.). También se contemplan los usos de las proteínas de guisante tal como se describe en el presente documento de acuerdo con la invención para aclarar bebidas fermentadas o bebidas distintas del vino.

Los aspectos y realizaciones de la invención están respaldados además por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Protocolos

A menos que se especifique otra cosa, en los ejemplos a continuación, todos los parámetros se miden como se define en esta sección. La medición de los parámetros tal como se define en esta sección también representa en realizaciones preferidas el método para medir dichos parámetros de acuerdo con la invención como se indica en los respectivos aspectos y realizaciones de la descripción detallada anterior.

A menos que se especifique otra cosa, en los ejemplos a continuación, todos los parámetros se miden como se define en esta sección. La medición de los parámetros tal como se define en esta sección también representa en realizaciones preferidas el método para medir dichos parámetros de acuerdo con la invención como se indica en los aspectos respectivos y las realizaciones de la descripción detallada anterior.

Medición de pH en guisantes secos o composición acuosa que comprende guisantes o guisantes molidos

El pH se midió con un medidor de pH WTW SERIES Inolab Termil 740. El aparato se calibró con soluciones tampón a pH 4,01 (Tampón técnico a pH 4,01 de WTW, Modelo STP4, N.º de pedido 108706) y pH 7 (Tampón técnico a pH 7,00 de WTW, Modelo STP7, N.º de pedido 108708).

Cuando se midió el pH en la composición acuosa, excluyendo los guisantes, se tomó una muestra de solución acuosa directamente del recipiente de fermentación. El pH de la muestra se midió una vez que el valor se estabilizó.

Cuando se midió el pH en guisantes, los guisantes se tomaron del recipiente de fermentación. Los guisantes se escurrieron en un colador y luego se colocaron sobre papel absorbente durante dos minutos para eliminar el exceso de zumo. Los guisantes se molieron durante un minuto con una licuadora (Magic Bullet, Homeland Housewares). Se suspendió 1 g de guisantes molidos en 9 g de agua desionizada (conductividad del agua <15 µS). La suspensión se molió nuevamente con la licuadora. Finalmente, se midió el pH de la suspensión (a temperatura ambiente) una vez que se estabilizó el valor.

Cuando se midió el pH en guisantes secos, los guisantes se molieron en seco durante un minuto con un molinillo (Kenwood). Se suspendieron 5 g de guisantes secos molidos en 95 g de agua desionizada (conductividad del agua <15 µS). La suspensión se homogeneizó luego en una placa de agitación durante 1 minuto. El pH de la suspensión se midió una vez que el valor se estabilizó.

Medición de pH en extracto de proteína en polvo

El pH se midió con un medidor de pH WTW pH/Cond 340i/SET. El aparato se calibró con soluciones tampón a pH 4,01 (Tampón técnico a pH 4,01 de WTW, Modelo STP4, N.º de pedido 108706) y pH 7 (Tampón técnico a pH 7,00 de WTW, Modelo STP7, N.º de pedido 108708). Se introdujeron 5,0 g de extracto de proteína en polvo en un vaso de precipitados de 100 ml y se prepararon hasta 50 g (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad 0,01 g, capacidad 3100 g) con agua desmineralizada a temperatura ambiente. La suspensión se agitó durante 5 minutos en una placa de agitación (Stuart US151) a intensidad 4. Se midió el pH de la suspensión (a temperatura ambiente) bajo agitación una vez que se estabilizó el valor.

Medición de pH en suspensión de proteínas

El pH se midió con un medidor de pH WTW pH/Cond 340i/SET. El aparato se calibró con soluciones tampón a pH 4,01 (Tampón técnico a pH 4,01 de WTW, Modelo STP4, N.º de pedido 108706) y pH 7 (Tampón técnico a pH 7,00 de WTW, Modelo STP7, N.º de pedido 108708). Se colocaron 50 ml de suspensión de proteína en un vaso de precipitados de 100 ml sin dilución adicional. Se midió el pH de la muestra (a temperatura ambiente) una vez que se estabilizó el valor.

Medición del pH de productos alimenticios

El medidor de pH (Knick Portavo 902 PH) se calibró con soluciones tampón a pH 4,01 (tampón técnico a pH 4,01 de WTW, modelo STP4, N.º de pedido 108706) y pH 7 (Tampón técnico a pH 7,00 de WTW, Modelo STP7, N.º de pedido 108708). El pH se midió introduciendo la sonda del medidor de pH (Knick Portavo 902 PH) directamente dentro del producto (producto alimenticio líquido, pasta, masa...) a temperatura ambiente. En caso de productos alimenticios sólidos, se realizó una dilución al 50 % en agua desmineralizada y se analizó la solución. Después de la estabilización, se anotó el valor de pH.

Enumeración de bacterias del ácido láctico

Las diluciones de la muestra se realizaron con EPT Dilucups 9 ml Led techno.

El medio utilizado fue agar MRS (según DE MAN, ROGOSA y SHARPE) de N.º de Cat. de Merck 1.10661.0500.

Los guisantes o la suspensión de guisantes se molieron con una licuadora, Magic Bullet, Homeland Housewares.

Cuando se analizó una muestra de la composición acuosa excluyendo guisantes, se tomó una muestra directamente del recipiente de fermentación. Se colocó en placa 1 ml de muestra. Si se necesitaba una dilución, se añadió 1 ml de muestra al recipiente de dilución dilucup y esta etapa se repitió hasta que se alcanzó la dilución correcta y luego se sembró 1 ml de muestra diluida. Las placas de Petri se incubaron 48 horas a 45 °C.

Cuando se analizó una muestra de guisantes, se tomaron guisantes enteros del recipiente de fermentación. Los guisantes se escurrieron en un colador y luego se colocaron sobre papel absorbente durante dos minutos para eliminar el exceso de zumo. Los guisantes se molieron durante un minuto. Los guisantes molidos se suspendieron (1 g de guisantes en 9 g de agua desionizada) en agua desionizada (conductividad <15 µS). La suspensión se molió luego con la licuadora. Se colocó en placa 1 ml de suspensión. Si se necesitaba dilución, se añadió 1 ml de la suspensión al recipiente de dilución dilucup y esta etapa se repitió hasta que se alcanzó la dilución correcta y luego se sembró 1 ml de muestra diluida. Las placas de Petri se incubaron 48 horas a 45 °C.

Determinación de materia seca

La materia seca total se determinó gravimétricamente como residuo restante después del secado. La humedad se evaporó de la muestra mediante secado en horno.

Se pesaron 5 g de muestra en un plato de aluminio seco previamente pesado (balanza de precisión Ohaus, capacidad 410 g, sensibilidad 0,001 g). La muestra se colocó en un horno a 103 °C hasta que el peso residual permaneció constante (al menos 24 h). La muestra se enfrió en un desecador durante 1 hora y luego se pesó inmediatamente. Los resultados se expresan en % (g de materia seca por 100 g de muestra).

$$\text{Materia seca (\%)} = (m_3 - m_1) / (m_2 - m_1) \times 100$$

m_1 = peso del plato de aluminio seco (en g)

m_2 = peso del plato de aluminio con la muestra antes del secado (en g)

m_3 = peso del plato de aluminio con la muestra después del secado (en g)

Determinación de materia seca de productos alimenticios

El contenido de materia seca de los productos alimenticios se determinó por duplicado después de la desecación de 5 g de muestra a 104 °C durante una noche.

Determinación de cenizas

5 El contenido de cenizas se determinó gravimétricamente como residuo restante después de calentar en un horno de mufla a alta temperatura. La humedad se evaporó de la muestra mediante secado en horno.

10 Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana seco previamente pesado (balanza de precisión Ohaus, capacidad 410 g, sensibilidad 0,001 g). El crisol se colocó en un horno de mufla a 550 °C durante 24 h. El crisol se colocó durante 1 h en un horno a 103 °C y luego en un desecador durante 1 h. Después de enfriar se pesó el crisol. Los resultados se expresan en % (g de cenizas por 100 g de muestra).

$$\text{Ceniza (\%)} = (m_3 - m_1)/(m_2 - m_1) \times 100$$

15 m_1 = peso del crisol (en g)

m_2 = peso del crisol con muestra (en g)

20 m_3 = peso del crisol con cenizas (en g)

Determinación del contenido de proteínas por el método Dumas

25 El aparato (Leco FP2000) se calibró con EDTA comercializado por Leco con la referencia 502092. Las cantidades de EDTA pesadas para la realización de la calibración variaron de 0,08 g a 0,50 g (0,08 g, 0,15 g, 0,25 g, 0,35 g, 0,40 g, 0,50 g). Se pesaron 0,3 g a 1 g de muestra en una balanza de precisión (Sartorius BP61S, capacidad 61 g, sensibilidad 0,1 mg) y se colocaron en un bote de cerámica. El bote de cerámica se colocó automáticamente en un horno a 1200 °C en el que la muestra se quemó en un tubo de combustión por pirólisis bajo flujo de oxígeno controlado. Los compuestos de nitrógeno se convierten en N₂ y NO_x, mientras que otros compuestos de descomposición volátiles se retienen a través de filtros adsorbentes y series de reactivos de purificación. Todos los compuestos de nitrógeno se reducen a N molecular, que se determina cuantitativamente por un detector de conductividad térmica. El contenido de nitrógeno se calculó después mediante un microprocesador.

35 Los resultados se expresan como un porcentaje de proteína (% N*6,25):
% de nitrógeno = g de nitrógeno por 100 g de muestra

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6,25$$

Determinación del contenido de nitrógeno en muestras de ISN por el método Dumas

40 El aparato (Leco FP2000) se calibró con una solución de glicina de 15 mg/ml (polvo de glicina comercializado por Merck con la referencia 1.04201.1000). Las cantidades de la solución de glicina de 15 mg/ml pesadas para la realización de la calibración variaron de 0,1 g a 1,8 g (0,1 g, 0,4 g, 0,7 g, 1,1 g, 1,4 g, 1,8 g). Se pesaron 1 g a 1,8 g de muestra en una balanza de precisión (Sartorius BP61S, capacidad 61 g, sensibilidad 0,1 mg) y se colocaron en un bote de cerámica cubierto por un inserto de níquel. El bote de cerámica se colocó automáticamente en un horno a 1200 °C en el que la muestra se quemó en un tubo de combustión por pirólisis bajo flujo de oxígeno controlado. Los compuestos de nitrógeno se convierten en N₂ y NO_x, mientras que otros compuestos de descomposición volátiles se retienen a través de filtros adsorbentes y series de reactivos de purificación. Todos los compuestos de nitrógeno se reducen a N molecular, que se determina cuantitativamente por un detector de conductividad térmica. El contenido de nitrógeno se calculó después mediante un microprocesador.

50 Los resultados se expresaron como un porcentaje de nitrógeno:
% de nitrógeno = g de nitrógeno por 100 g de muestra

55 Determinación del índice de solubilidad de nitrógeno (ISN)

Después de la dispersión de proteínas en agua desmineralizada, el índice de solubilidad de nitrógeno se determinó midiendo la proporción entre el porcentaje de nitrógeno en el sobrenadante después de la centrifugación y el porcentaje de nitrógeno en la suspensión de partida. El método se utilizó en un extracto de proteína en polvo con un contenido de materia seca del 90 al 99 % (en peso) y se realizó en el mes posterior al secado del extracto de proteína. La medición se realizó a temperatura ambiente.

65 Se introdujeron 9,0 g de muestra en un vaso de precipitados de 400 ml y se hicieron hasta 300 g (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad 0,01 g, capacidad 3100 g) con agua desmineralizada a temperatura ambiente. La suspensión se homogeneizó con una cuchara y luego se agitó durante 5 minutos en una placa de agitación (Stuart US151) a intensidad 4. Se recogieron 10 ml de la suspensión de partida y se analizó el contenido de nitrógeno en un analizador

de proteínas Leco FP 2000. La suspensión se dividió en dos vasos de precipitados de 150 ml, el pH se elevó en uno y disminuyó en el otro. El pH de la suspensión se ajustó a pH 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7 y 8 con HCl 1N o NaOH 1N (pH-metro WTW pH/Cond 340i/SET). Para cada ajuste de pH, el valor del pH se registró una vez estabilizado y se recogieron 10 ml de la suspensión en un tubo de centrifuga de 10 ml. Las alícuotas de la suspensión a diferente pH se centrifugaron 15 min a 6000 rpm (centrífuga ALC 4239 R). Los diferentes sobrenadantes se recogieron y analizaron para determinar el contenido de nitrógeno en un analizador de proteínas Leco FP 2000. Para cada pH probado, se calculó el índice de solubilidad de nitrógeno de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de índice de solubilidad de nitrógeno} = \% \text{ de nitrógeno en el sobrenadante} / \% \text{ de nitrógeno en la solución de partida} \times 100$$

Determinación del pH isoeléctrico de la fracción que comprende proteína

Se introdujeron 300 g de fracción que comprende proteína que tiene un contenido de proteína del 1 % en peso basándose en el peso total de la fracción que comprende proteína en un vaso de precipitados de 400 ml a temperatura ambiente. La suspensión se agitó durante 5 minutos en una placa de agitación (Stuart US151) a intensidad 4. Se recogieron 10 ml de la suspensión de partida y se analizó el contenido de nitrógeno en un analizador de proteínas Leco FP 2000. La suspensión se dividió en dos vasos de precipitados de 150 ml, el pH se elevó en uno y disminuyó en el otro. El pH de la suspensión se ajustó a pH 3,5, 3,75, 4,0, 4,25, 4,5, 4,75, 5,0, 5,25, 5,5, 5,75, 6,0, 6,25, 6,5, 6,75 y 7,0 con HCl 1N o NaOH 1N (pH-metro WTW pH/Cond 340i/SET). Para cada ajuste de pH, el valor del pH se registró una vez estabilizado y se recogieron 10 ml de la suspensión en un tubo de centrifuga de 10 ml. Las alícuotas de la suspensión a diferente pH se centrifugaron 15 min a 6000 rpm (centrífuga ALC 4239 R). Los diferentes sobrenadantes se recogieron y analizaron para determinar el contenido de nitrógeno en un analizador de proteínas Leco FP 2000. Para cada pH probado, se calculó el índice de solubilidad de nitrógeno de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de índice de solubilidad de nitrógeno} = \% \text{ de nitrógeno en el sobrenadante} / \% \text{ de nitrógeno en la solución de partida} \times 100$$

El pH isoeléctrico se determinó como el pH al cual el índice de solubilidad de nitrógeno fue el más bajo.

Determinación de azúcar

La muestra se preparó con una centrífuga eppendorf Centrifuge 5417R y con dispositivos centrífugos NANOSEP 100k OMEGA.

Los guisantes o la suspensión de guisantes se molieron con una licuadora, Magic Bullet, Homeland Housewares.

Cuando se analizó una muestra de la composición acuosa excluyendo guisantes, se tomó una muestra directamente del recipiente de fermentación. La muestra se diluyó 20 veces (1 g de zumo de guisante en 19 g de agua desionizada) con agua desionizada (conductividad <15 µS). Se colocaron 0,5 ml de esta dilución en un eppendorf de filtración y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. El filtrado se usó luego para el análisis de azúcar.

Cuando se preparó una muestra de guisantes, se tomaron guisantes enteros del recipiente de fermentación. Los guisantes se escurrieron en un colador y luego se colocaron sobre papel absorbente durante dos minutos para eliminar el exceso de zumo. Los guisantes se molieron durante un minuto. Los guisantes molidos se suspendieron (1 g de guisantes en 9 g de agua desionizada) en agua desionizada (conductividad <15 µS). La suspensión se molió luego con la licuadora.

La suspensión se diluyó 8 veces (1 g de suspensión de guisante en 8 g de agua desionizada) con agua desionizada (conductividad <15 µS). Se colocaron 0,5 ml de esta dilución en un eppendorf de filtración y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. El filtrado se usó luego para el análisis de azúcar.

Para el análisis del azúcar se ha utilizado un sistema cromatográfico Dionex ICS 5000 de Thermo scientific con el programa informático chromeleon 6.80 SR11 Build 3161. La separación se realizó mediante un Carbowax PA100 de 4 mm * 250 mm (+ protector) a 40 °C. La elución se realizó con NaOH 40 mM a un caudal de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl. La detección de pulso cuádruple se utilizó para la detección de PAD. La calibración se realizó con soluciones estándar apropiadas que varían para cada uno de los siguientes azúcares:

La concentración de la solución estándar de azúcares (Est1, 2, 3 y 4) (mg/l) se proporciona en la tabla a continuación.

	Est1	Est2	Est3	Est4
Glucosa	15,3	45,8	5,2	30,5
Fructosa	3,3	7,4	1,1	5,5
Sacarosa	99,9	200,5	50,1	150,0
Rafinosa	15,3	45,1	5,0	30,6
Estaquiosa	75,0	159,7	40,0	119,7
Verbascosa	57,0	118,6	37,9	85,0

Medición de acidez

- 5 La acidez se midió con un medidor de pH SERIE WTW Inolab Termil 740. El aparato se calibró con soluciones tampón a pH 4,01 (Tampón técnico a pH 4,01 de WTW, Modelo STP4, N.º de pedido 108706) y a pH 7 (Tampón técnico a pH 7,00 de WTW, Modelo STP7, N.º de pedido 108708).

Los guisantes o la suspensión de guisantes se molieron con una licuadora, Magic Bullet, Homeland Housewares.

- 10 Cuando se midió la acidez del "zum de guisante", se tomó una muestra (A) directamente del recipiente de fermentación. Se pesó la muestra (A). Se añadió lentamente 1 mol/l de solución de hidróxido de sodio (C) (nº 1.09137.1000 TitriPURR; Densidad = d = 1,04 kg/l) hasta que el pH de la muestra se estabilizó a pH 7 durante al menos dos minutos. Luego se calculó la masa de hidróxido de sodio (B).

$$15 \quad \text{Acidez (mEq/kg)} = (B \cdot (C/d)/A) \cdot 1000$$

- 20 Cuando se midió la acidez de los guisantes, se tomaron guisantes enteros del recipiente de fermentación. Los guisantes se escurrieron en un colador y luego se colocaron sobre papel absorbente durante dos minutos para eliminar el exceso de zumo. Los guisantes se molieron durante un minuto. Los guisantes molidos se suspendieron (1 g de guisantes en 9 g de agua desionizada) en agua desionizada (conductividad <15 µS). La suspensión se molió luego con la licuadora. Se obtuvo una suspensión de guisantes.

- 25 Se pesó una cantidad exacta de la suspensión de guisantes (A'). Se añadió lentamente 1 mol/l de solución de hidróxido de sodio (C) (nº 1.09137.1000 TitriPURR; Densidad = d = 1,04 kg/l) hasta que el pH de la suspensión se estabilizó a pH 7 durante al menos dos minutos. Luego se calculó la masa de hidróxido de sodio (B').

$$\text{Acidez (mEq/kg)} = (B' \cdot (C7d)/(A710)) \cdot 1000$$

30 Determinación de la viscosidad con el viscosímetro Brookfield DVII

- La determinación de la viscosidad de una suspensión de proteína con un viscosímetro Brookfield DVII es la medida de su resistencia al flujo impuesta por la rotación de una sonda cilíndrica. Esta resistencia provoca el giro de un resorte fijado al sensor de un sistema de accionamiento. El valor de la viscosidad, expresado en centiPoise (cP), es proporcional al porcentaje de torsión indicado por el viscosímetro y a un factor multiplicativo que depende de la sonda utilizada y de su velocidad de rotación. El método se utilizó en un extracto de proteína en polvo con un contenido de materia seca del 90 al 99 % (en peso) y se realizó en el mes posterior al secado del extracto de proteína. La medición se realizó a temperatura ambiente.

- 40 Se preparó una suspensión del 13,5 % de proteínas (en peso). Se pesaron 75 g de muestra (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad 0,01 g, capacidad 3100 g) en un vaso de precipitados de 250 ml y se pesó la cantidad necesaria de agua desmineralizada en un vaso de precipitados de plástico de 1 l, ambos a temperatura ambiente. El polvo se suspendió en agua con agitación mecánica (IKA, EURO-ST.P CV) a 700 rpm durante 5 minutos con el uso de un disolvente de 80 cm de diámetro (comercializado por Roth con la referencia A322.1). El pH de la suspensión se midió bajo agitación (pH-metro WTW pH/Cond 340i/SET). La agitación se detuvo durante 3 minutos y la viscosidad de la suspensión se midió en tres ubicaciones diferentes con un viscosímetro Brookfield DVII+Pro a una velocidad de 50 rpm. La sonda utilizada para la medida se eligió entre SO1 y SO7, de modo que el porcentaje de torsión estaba entre el 20 % y el 80 %.
- 45 El valor de viscosidad se registró después de 4 segundos de rotación de la sonda. La suspensión se colocó nuevamente bajo agitación mecánica durante 5 minutos a 700 rpm durante las cuales el pH se ajustó a 6,4 con HCl 3N. La agitación se detuvo durante 3 minutos y la viscosidad de la suspensión se midió de la misma manera que anteriormente. De manera similar, la viscosidad de la suspensión se midió a pH 6,2, 6,0 y 5,8 después de 5 minutos de agitación a 700 rpm y 3 minutos de reposo.

- 50 Cuando el pH inicial de la suspensión al 13,5 % de proteínas era igual o inferior a 5,8, el pH se elevó a pH 7,5 con NaOH 3N, en lugar de reducirse con HCl 3N.

55

Determinación de densidad aparente y densidad tras el asentamiento

La densidad aparente de un polvo es la proporción de la masa de una muestra de polvo sin compactar y su volumen, incluida la contribución del volumen vacío interparticulado. La densidad tras el asentamiento se obtuvo compactando mecánicamente un cilindro graduado que contiene la muestra de polvo. La densidad aparente y la densidad tras el asentamiento se expresan en gramos por mililitro (g/ml). El método se usó en extracto de proteína en polvo y la medición se realizó a temperatura ambiente.

Se pesaron 60 g de polvo en un cilindro graduado de 250 ml (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad de 0,01 g, capacidad de 3100 g). Se midió el volumen de polvo antes de agitar. La densidad aparente se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Densidad aparente} = m / V1$$

m = masa de extracto de proteína en polvo (expresado en g)

V1 = Volumen de polvo sin asentamiento (expresado en ml)

Se pesaron 60 g de polvo en un cilindro graduado de 250 ml (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad de 0,01 g, capacidad de 3100 g). El cilindro graduado se colocó en el centro de un aparato de sedimentación (Retsch) y se agitó durante 12 minutos a intensidad 60. Se midió el volumen de polvo después de agitar. La densidad tras el asentamiento se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Densidad tras el asentamiento} = m / V2$$

m = masa de extracto de proteína en polvo (expresado en g)

V2 = Volumen de polvo asentado (expresado en ml)

Determinación de la fuerza del gel

La fuerza del gel se determinó por la resistencia máxima de un gel a una compresión aplicada por una sonda dirigida por un analizador de textura. La formación de un gel de proteína consistió en hacer una suspensión de proteína que se sometió a tratamiento térmico seguido de enfriamiento. La concentración del gel se expresó en g o N. El método se usó en un extracto de proteína en polvo con un contenido de materia seca del 90 al 99 % (en peso) y se realizó en el mes posterior al secado del extracto de proteína. La medición se realizó a temperatura ambiente.

Se preparó una suspensión del 13,5 % de proteínas (en peso). Se pesaron 75 g de muestra (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad 0,01 g, capacidad 3100 g) en un vaso de precipitados de 250 ml y se pesó la cantidad necesaria de agua desmineralizada en un vaso de precipitados de plástico de 1 l, ambos a temperatura ambiente. El polvo se suspendió en agua con agitación mecánica (IKA, EURO-ST.P CV) a 700 rpm durante 10 minutos exactamente con el uso de un disolvente de 80 cm de diámetro (comercializado por Roth con la referencia A322.1). Por otra parte, el pH de la suspensión se ajustó a 6,0 con HCl 3N o NaOH 3N de acuerdo con el pH inicial de la suspensión (pH-metro WTW pH/Cond 340i/SET). La suspensión se vertió en dos frascos de vidrio de 220 ml que se colocaron en un baño de agua a 80 °C durante 1 h. Los frascos de vidrio se enfriaron durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente y luego se colocaron durante 16 horas en una habitación fría a 4 °C. Los frascos de vidrio se colocaron a temperatura ambiente durante 15 minutos para llevarlos a temperatura ambiente. La fuerza del gel se midió en un analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems, Ltd) con una celda de carga de compresión de 5 kg y una sonda cónica (P45C Cone 45° Perspex). La fuerza del gel fue la fuerza máxima registrada al final de la penetración, expresada en g.

Configuración de TA-XT2i:

- Medir la fuerza en la compresión - mantener hasta el momento
- Velocidad previa a la prueba: 2 mm/s
- Velocidad de prueba: 1 mm/s
- Velocidad posterior a la prueba: 1 mm/s
- Distancia de penetración: 35 mm
- Tipo de disparador: Auto - 3 g
- Tiempo 10 s

Medición de fluidez en polvo

El comportamiento reológico de un polvo se caracteriza por la medición de la resistencia al flujo. La fluidez se midió con un microviscoamilógrafo (MVA) Brabender. Se pesaron 20 g de muestra (balanza Ohaus ARC120, de sensibilidad 0,01 g, de capacidad 3100 g) en el recipiente de medición del aparato. La medida se ejecutó durante 5 minutos a 20

°C usando un baño de agua de enfriamiento. La velocidad de rotación del recipiente se ajustó a 75 rpm y el intervalo de medición a 70 cmg. El aparato midió la fuerza requerida para mantener la velocidad de rotación del recipiente a 75 rpm. Los resultados corresponden al promedio de las mediciones registradas durante el último minuto de la prueba y se expresan en la unidad Brabender (UB). Cuanto menor sea el resultado, más alto será el polvo que fluye libremente.

Determinación de humectabilidad

La humectabilidad se define como el tiempo en segundos requerido para que todas las partículas de un polvo se humedezcan cuando se colocan en la superficie del agua. Una muestra de polvo se considera humedecida cuando se ha hundido debajo de la superficie del agua o tiene una apariencia húmeda. Se pesó 1 g de muestra de polvo en un vaso de vidrio. Se introdujeron 100 ml de agua desmineralizada a temperatura ambiente en un vaso de precipitados de 250 ml (altura 9 cm, diámetro 7 cm). La porción de prueba se vertió del vaso de vidrio a la superficie del agua. El tiempo se registró desde el comienzo de la transferencia del polvo hasta que todas las partículas se humedecieron. Los resultados se expresan en segundos.

Medición de color

Las coordenadas $L^*a^*b^*$ se midieron a 20 °C utilizando un medidor de cromo CR5 (Konica Minolta TA Sensing, Europa). L^* denota ligereza en una escala de 0-100 de negro a blanco; a^* , (+) rojo o (-) verde; y b^* , (+) amarillo o (-) azul.

Aparato:

- Cromámetro CR5 (Konica Minolta TA Sensing Europe).
- Placa de Petri CR-A502

Procedimiento: Preparación de la muestra

- la placa de Petri se llenó con la muestra para analizar en una superficie uniforme.

Método

- la placa de Petri se colocó en el aparato en el lugar específicamente reservado y comenzó el análisis de los Resultados

- los valores $L^*a^*b^*$ se dan por el cromámetro (promedio de 3 mediciones).

Actividad del agua

La actividad del agua es una medida del estado energético del agua en un sistema. Se define como la presión del vapor de agua en una sustancia dividido entre la del agua pura a la misma temperatura; por lo tanto, el agua destilada pura tiene una actividad de agua de exactamente uno. La determinación de la actividad del agua (a_w , por sus siglas en inglés) se realizó utilizando Rotronic Hygroskop DT, Krautli.

Se llenó una celda con la muestra a caracterizar y se colocó en la cámara de medición (Rotronic Hygroskop DT, Krautli). Después de la estabilización, se registró el valor de la actividad del agua.

Análisis sensorial para proteínas en solución

La evaluación sensorial se realizó por un panel capacitado de 5 miembros. La capacitación de los panelistas se basó en el reconocimiento de 6 características (dulzura, amargura, sabor metálico, salinidad, acidez, umami y astringencia). Se realizó un análisis descriptivo basado en dispersiones del 4 %. Después de la discusión para llegar a un consenso, se seleccionaron los términos descriptivos que fueron más importantes para caracterizar la apariencia, la textura y el sabor de las soluciones.

Análisis sensorial para productos horneados

La evaluación sensorial se realizó por un panel capacitado de 5 miembros. La capacitación de los panelistas se basó en el reconocimiento de 6 características (dulzura, amargura, sabor metálico, salinidad, acidez, umami y astringencia). Se realizó un análisis descriptivo de los productos terminados. Después de la discusión para llegar a un consenso, se seleccionaron los términos descriptivos que fueron más importantes para caracterizar la apariencia, la textura y el sabor de los productos.

Capacidad de expansión en el horno:

La capacidad de expansión de las galletas se determinó midiendo la longitud y el ancho de 20 galletas con un calibre.

El valor promedio se determinó y expresó en mm.

Dureza de las galletas:

- 5 La dureza de las galletas se define como la fuerza requerida para romper una galleta con un cuchillo. La dureza de la galleta se evaluó mediante el analizador de textura Ta-XT2i.

Aparato:

- 10 - Analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems, Ltd)
 - Celda de carga de compresión, 25 kg
 - Juego de cuchillas con cuchillo (HDP/BSK)

Procedimiento:

- 15 - Colocar el límite superior de la cruceta de modo que la cuchilla Warner Bratzler esté 1 mm por encima de la superficie de la muestra
 - Configuración de TA-XT2i:
- 20 ◦ Medir la fuerza en la compresión - volver al inicio
 ◦ Velocidad previa a la prueba: 3 mm/s
 ◦ Velocidad de prueba: 2 mm/s
 ◦ Velocidad posterior a la prueba: 10 mm/s
 ◦ Distancia de penetración: 5 mm
- 25 ◦ Tipo de disparador: Auto - 3 g
- Comienza la prueba de penetración. Los resultados fueron registrados por el analizador de textura y se representaron en un gráfico.

30 Resultados

La dureza de la galleta fue la fuerza máxima registrada durante la prueba (expresada como "fuerza máxima"). Los resultados de la prueba se obtuvieron de 20 muestras y se calculó el valor promedio.

35 Crujiente de galleta:

El crujiente de la galleta se define como el número de picos registrados durante la compresión de una galleta por un pistón. La textura crujiente de la galleta se evaluó mediante el analizador de textura Ta-XT2i tal como se describe a continuación.

40

Aparato:

- Analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems, Ltd)
 - Celda de carga de compresión, 25 kg
 45 - Pistón T1 (9 cm de longitud - 0,5 cm de diámetro)

Procedimiento:

- Colocar el límite superior de la cruceta de modo que el pistón esté 1 mm por encima de la superficie de la muestra
 50 - Configuración de TA-XT2i:
- 55 ◦ Medir la fuerza en la compresión – volver al inicio
 ◦ Velocidad previa a la prueba: 2 mm/s
 ◦ Velocidad de prueba: 0,1 mm/s
 ◦ Velocidad posterior a la prueba: 5 mm/s
 ◦ Distancia de penetración: 4 mm
 ◦ Tipo de disparador: Auto – 3 g
- Comienza la prueba de penetración. Los resultados fueron registrados por Texture Analyzer y representados en un gráfico
- 60

Resultados

- 65 El crujiente de la galleta fue el número de picos registrados durante la prueba (expresado como "crujiente"). Los resultados de la prueba se obtuvieron de 20 muestras y se calcula el valor promedio.

Índice de levadura para masa fermentada

Esta prueba evalúa la capacidad de una masa de pan a desarrollar durante la fermentación:

- 5 Después de amasar, se sacó la masa de la amasadora y se dejó reposar durante 10 minutos. Se tomaron 7 panes pequeños (30 g cada uno) y se redondearon en pequeñas bolas (con las manos). Después de darles forma, se colocaron en vasos graduados. Se observó altura inicial (V_i). El vidrio graduado se colocó en un gabinete de fermentación a 32 °C/100 % de humedad relativa durante 35 minutos. Al final de la prueba, se retiraron los vasos del gabinete y se observó la altura final después de la prueba (V_f).

- 10 - El índice de fermentación (LI, por sus siglas en inglés) fue la diferencia en volumen entre el comienzo y el final de la prueba:

$$LI = (V_f - V_i) \times 3,14 \times r^2$$

- 15 (donde r es el radio del vaso graduado)

Dureza de miga de pan

- 20 La dureza de la miga de pan se realizó en un analizador de textura (TA XT2i, Stable Micro Systems, Reino Unido). Se comprimieron dos lonchas de 12,5 mm de espesor con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 36 mm de diámetro, penetración de hasta el 50 % (distancia = 6 mm) de su altura original a una velocidad de cruceta de 1 mm/s de velocidad.

Aparato:

- 25 - Analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems, Ltd)
 - Celda de carga de compresión, 5 kg
 - Sonda P36R diámetro radio aluminio AACC

30 Procedimiento:

- Colocar el límite superior de la cruceta de modo que la sonda esté 1 mm por encima de la superficie de la muestra
 - Configuración de TA-XT2i:
- 35 ◦ Medir la fuerza en la compresión - volver al inicio
 ◦ Velocidad previa a la prueba: 1 mm/s + velocidad de prueba: 1,7 mm/s
 ◦ Velocidad posterior a la prueba: 10 mm/s
 ◦ Distancia de penetración: 6 mm
 ◦ Tipo de disparador: Auto - 5 g
- 40 - Comienza la prueba de penetración. Los resultados se registraron por el analizador de textura y se representaron en un gráfico.

Resultados

- 45 - La dureza de la miga de pan se definió como la fuerza después de 2,21 s (expresada como "dureza de la miga de pan" en g)
- Los resultados de la prueba se obtuvieron de 20 muestras y se calculó el valor promedio.

50

Volumen de pan

El volumen de pan se determinó por el método de desplazamiento de colza (Estándar AACC 10-05) en cinco repeticiones. Se calculó el volumen específico promedio (volumen/peso).

55

Dureza de las barras

La dureza de las barras se definió como la fuerza máxima registrada durante la compresión de las barras por un pistón. La dureza de las barras se evaluó mediante el analizador de texturas Ta-XT2i tal como se describe a continuación.

60

Aparato:

- Analizador de textura TA-XT2i (Stable Micro Systems, Ltd)
 - Celda de carga de compresión, 5 kg
 65 - Pistón de 52 mm de longitud - 5,7 mm de diámetro)

Procedimiento:

- Colocar el límite superior de la cruceta de modo que el pistón esté 1 mm por encima de la superficie de la muestra
- Configuración de TA-XT2i:

5 Medir la fuerza en la compresión - Regresar al inicio
 Velocidad previa a la prueba: 2 mm/s
 Velocidad de la prueba: 0,5 mm/s
 Velocidad posterior a la prueba: 5 mm/s
 10 Distancia de penetración: 10 mm
 Tipo de disparador: Auto - 3 g

- Comienza la prueba de penetración. Los resultados fueron registrados por Texture Analyzer y representados en un gráfico

Resultados

- La dureza de las barras fue la fuerza máxima registrada durante la prueba (expresada como "dureza de las barras")
- Los resultados de la prueba se obtuvieron de 12 muestras y se calculó el valor promedio.

Ejemplo 1: Método para extraer proteínas de guisante de acuerdo con una realización de la presente invención

Este ejemplo se realizó siguiendo el protocolo como se representa esquemáticamente en la Figura 1.

Etapa 1-Preparación de los concentrados de proteína de guisante:

Los guisantes cosechados en seco, en el presente documento referidos como "guisantes secos" (que tienen un contenido de materia seca (basado en el peso) de aproximadamente el 87,7 %) se tamizaron y se destonaron pasando a través de un destonador. Posteriormente, los guisantes fueron desvainados en un desvainador.

Los guisantes fueron luego sometidos a fermentación con bacterias del ácido láctico (con *Lactobacillus fermentum*). Hasta aquí, los guisantes se remojaron en agua potable de manera discontinua. El agua potable fue tratada con agua de pozo para ser segura para el consumo humano de acuerdo con la directiva europea 98/83/CE. En lotes posteriores, parte del medio de fermentación (fase acuosa excluyendo guisantes) de un lote anterior se usó como un inóculo para efectuar la fermentación posterior. Los guisantes se sometieron a fermentación en presencia de 10^8 ufc de bacterias del ácido láctico por ml de composición acuosa que comprende guisantes. 400 kg de guisantes por m^3 del volumen total de composición acuosa que comprende guisantes se colocaron en un recipiente. La fermentación se realizó anaeróbicamente en un recipiente cerrado sin desgasificar a una temperatura de 40 °C, hasta que se alcanzó un pH en los guisantes de 4,2. Durante la fermentación, la fase acuosa en el recipiente de fermentación se recirculó a aproximadamente 20 m^3 /hora. Los guisantes se fermentaron durante una duración de aproximadamente 540 min. Al final de la fermentación, los guisantes habían absorbido agua en una cantidad de aproximadamente su masa inicial antes de la fermentación y tenían un contenido de materia seca de aproximadamente el 45 % (basado en el peso).

Después de la fermentación, los guisantes se retiraron del medio de fermentación. Luego, los guisantes se colocaron en un tambor rotativo perforado y se lavaron para eliminar el medio de fermentación restante. Después del lavado, los guisantes fueron sometidos a molienda húmeda. Durante la molienda, se añadió agua potable adicional de modo que la composición final tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (en peso). Durante la etapa de molienda, se ajustó el pH a aproximadamente 8,0 mediante la adición de hidróxido de sodio.

Después de la molienda, la pasta de guisantes molida se sometió a decantación centrífuga. El sobrenadante que contenía proteínas e impurezas solubles (también denominado en el presente documento composición acuosa que comprende proteínas de guisante) tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 4 % (en peso).

La composición acuosa que comprende proteínas de guisante se sometió posteriormente a tratamiento térmico a 75 °C durante 15 segundos en un intercambiador de calor de placa.

Posteriormente, las proteínas de guisante se concentraron por precipitación isoelectrica. Para esto, el pH de la composición acuosa que comprende proteínas de guisante se ajustó a 4,7 con ácido sulfúrico. La separación de las proteínas precipitadas/agregadas se realizó por decantación centrífuga. El concentrado de proteínas de guisante resultante se obtuvo como una suspensión acuosa que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (basado en el peso). Se añadió agua potable hasta alcanzar un contenido de materia seca del 13 % (basado en el peso).

Etapa 2-Preparación de extractos de proteína de guisante de los concentrados de la etapa 1:

A continuación, el pH de la suspensión acuosa se ajustó a pH 5,3 con hidróxido de sodio. La suspensión se sometió luego a tratamiento térmico calentándola a aproximadamente 90 °C por medio de un intercambiador de calor de placas y manteniendo la suspensión acuosa a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante 7 min.

- 5 Por último, la suspensión acuosa se secó por pulverización. La temperatura de entrada del secador por pulverización fue de aproximadamente 190 °C y la temperatura de salida fue de aproximadamente 72 °C.

Ejemplo 2: El efecto de la acidificación y el tratamiento térmico sobre las propiedades de los extractos de proteína de guisante

10 Etapa 1-Preparación de los concentrados de proteína de guisante:

Guisantes cosechados en seco, en el presente documento referido como "guisantes secos" (que tienen un contenido de materia seca (basado en el peso) de aproximadamente el 87 %) se tamizaron y se destonaron por paso a través de un destonador. Posteriormente, los guisantes fueron desvainados en un desvainador.

Los guisantes fueron luego sometidos a fermentación con bacterias del ácido láctico (con *Lactobacillus fermentum*). Hasta aquí, los guisantes se remojaron en agua potable de manera discontinua. En lotes posteriores, parte del medio de fermentación (fase acuosa excluyendo guisantes) de un lote anterior se usó como un inóculo para efectuar la fermentación posterior. Los guisantes se sometieron a fermentación en presencia de 10⁸ ufc de bacterias del ácido láctico por ml de composición acuosa que comprende guisantes. 400 kg de guisantes por m³ del volumen total de composición acuosa que comprende guisantes se colocaron en un recipiente. La fermentación se realizó anaeróticamente en un recipiente cerrado sin desgasificar a una temperatura de 40 °C, hasta que se alcanzó un pH en los guisantes de 4,6. Durante la fermentación, la fase acuosa en el recipiente de fermentación se recirculó a aproximadamente 20 m³/hora. Los guisantes se fermentaron durante una duración de aproximadamente 480 min. Al final de la fermentación, los guisantes habían absorbido agua en una cantidad de aproximadamente su masa inicial antes de la fermentación y tenían un contenido de materia seca de aproximadamente el 47 % (basado en el peso).

Después de la fermentación, los guisantes se retiraron del medio de fermentación. Luego, los guisantes se colocaron en un tambor rotativo perforado y se lavaron para eliminar el medio de fermentación restante. Después del lavado, los guisantes fueron sometidos a molienda húmeda. Durante la molienda, se añadió agua potable adicional de modo que la composición final tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 27 % (en peso). Durante la etapa de molienda, se ajustó el pH a aproximadamente 8 mediante la adición de hidróxido de sodio.

Después de la molienda, la pasta de guisantes molida se sometió a decantación centrífuga. El sobrenadante que contenía proteínas e impurezas solubles (también denominado en el presente documento composición acuosa que comprende proteínas de guisante) tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 4,5 % (en peso).

La composición acuosa que comprende proteínas de guisante se sometió posteriormente a tratamiento térmico a 75 °C durante 15 segundos en un intercambiador de calor de placa.

Posteriormente, las proteínas de guisante se concentraron por precipitación isoelectrica. Para esto, el pH de la composición acuosa que comprende proteínas de guisante se ajustó a 4,7 con ácido sulfúrico. La separación de las proteínas precipitadas/agregadas se realizó por decantación centrífuga. El concentrado de proteínas de guisante resultante se obtuvo como una suspensión acuosa que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (basado en el peso).

Etapa 2-Preparación de extractos de proteína de guisante a partir de los concentrados de la etapa 1. Se prepararon diferentes extractos de proteína de guisante a partir del concentrado de proteínas de guisante descrito anteriormente.

El extracto (A) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de la suspensión acuosa obtenida en la etapa 1 a aproximadamente el 15 % (en peso) después de la adición de agua; seguido por el ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 7,5; y después de calentar a una temperatura de aproximadamente 98 °C, la temperatura se mantuvo a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 6,5 minutos; y luego la suspensión se secó por pulverización para obtener un polvo que tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 95 % (en peso).

El extracto (B) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de una suspensión acuosa preparada tal como se describe en la etapa 1 a aproximadamente el 12,5 % (en peso); y secar por pulverización dicha suspensión acuosa sin ajuste del pH (el pH permaneció en 4,7) y sin tratamiento térmico posterior.

El extracto (C) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de una suspensión acuosa preparada tal como se describe en la etapa 1 a aproximadamente el 12,5 % (en peso); seguido de un tratamiento térmico de la suspensión a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante aproximadamente 7 minutos sin ajustar el pH (el pH permaneció en 4,5), y luego secando por pulverización la suspensión acuosa para obtener polvo con un contenido de materia seca de aproximadamente el 95 % (en peso).

El extracto (D) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de una suspensión acuosa preparada como se describe en la etapa 1 a aproximadamente el 12,5 % (en peso) después de la adición de agua; seguido por el ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 5,4; y tratamiento térmico posterior a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante aproximadamente 7 minutos, y luego secando por pulverización la suspensión para obtener un polvo que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 95 % (en peso).

Se midieron la fuerza del gel, la densidad tras el asentamiento y la densidad aparente, la fluidez y la humectabilidad de los extractos de proteínas (A) a (D). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

La fuerza del gel a pH 6 se representa en la Figura 2.

Tabla 2

Extracto	pH	Fuerza del gel (pH6)	Densidad tras el asentamiento	Densidad aparente	Fluidez	Humectabilidad
Unidades	-	(g)	(kg/l)	(kg/l)	(Unidad Brabender)	(seg)
A	7,7	330	0,4	0,3	2000	>600
B	4,7	125	0,8	0,6	377	19
C	4,7	<50	0,6		250	20
D	5,6	<50	0,7		650	-

El índice de solubilidad de nitrógeno (ISN) de cada extracto en función del pH se da en la Tabla 3 y se muestra en la Figura 3.

Tabla 3

Producto	Índice de solubilidad de nitrógeno (%)					
	pH 3,5	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7	pH 8
A	10	3	6	40	45	50
B	8,4	3,5	4,1	15,7	18,2	21,2
C	2	1	2	5	7	8
D	2,9	1,6	2,8	7,4	9,0	12,7

La viscosidad medida para cada extracto a diferente pH se da en la Tabla 4 y el perfil de viscosidad se muestra en la Figura 4.

Tabla 4

Producto	Viscosidad (cP)					
	pH 7,5	pH 6,4	pH 6,2	pH 6	pH 5,8	pH 4
A	4800	8400	12800	20200	23300	600
B	20	63	69	78	108	523
C	27	69	89	98	133	-
D	46	56	64	68	80	-

Ejemplo 3: Caracterización de un extracto según una realización de la invención

Etapla 1-Preparación de los concentrados de proteína de guisante:

Guisantes cosechados en seco, en el presente documento referido como "guisantes secos" (que tienen un contenido de materia seca (basado en el peso) de aproximadamente el 87 %) se tamizaron y se destonaron por paso a través de un destonador. Posteriormente, los guisantes fueron desvainados en un desvainador.

Los guisantes fueron luego sometidos a fermentación con bacterias del ácido láctico (con *Lactobacillus fermentum*). Hasta aquí, los guisantes se remojaron en agua potable de manera discontinua. En lotes posteriores, parte del medio

de fermentación (fase acuosa excluyendo guisantes) de un lote anterior se usó como un inóculo para efectuar la fermentación posterior. Los guisantes se sometieron a fermentación en presencia de 10^8 ufc de bacterias del ácido láctico por ml de composición acuosa que comprende guisantes. 400 kg de guisantes por m^3 del volumen total de composición acuosa que comprende guisantes se colocaron en un recipiente. La fermentación se realizó anaeróticamente en un recipiente cerrado sin desgasificar a una temperatura de aproximadamente 40 °C, hasta que se alcanzó un pH en los guisantes de 4,7. Durante la fermentación, la fase acuosa en el recipiente de fermentación se recirculó a aproximadamente 20 m^3 /hora. Los guisantes se fermentaron durante una duración de aproximadamente 430 min. Al final de la fermentación, los guisantes habían absorbido agua en una cantidad de aproximadamente su masa inicial antes de la fermentación y tenían un contenido de materia seca de aproximadamente el 47 % (basado en el peso).

Después de la fermentación, los guisantes se retiraron del medio de fermentación. Luego, los guisantes se colocaron en un tambor rotativo perforado y se lavaron para eliminar el medio de fermentación restante. Después del lavado, los guisantes fueron sometidos a molienda húmeda. Durante la molienda, se añadió agua potable adicional de modo que la composición final tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (en peso). Durante la etapa de molienda, se ajustó el pH a aproximadamente 8 mediante la adición de hidróxido de sodio.

Después de la molienda, la pasta de guisantes molida se sometió a decantación centrífuga. El sobrenadante que contenía proteínas e impurezas solubles (también denominado en el presente documento composición acuosa que comprende proteínas de guisante) tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 4 % (en peso).

La composición acuosa que comprende proteínas de guisante se sometió posteriormente a tratamiento térmico a 75 °C durante 15 segundos en un intercambiador de calor de placa.

Posteriormente, las proteínas de guisante se concentraron por precipitación isoelectrica. Para esto, el pH de la composición acuosa que comprende proteínas de guisante se ajustó a 4,8 con ácido sulfúrico. La separación de las proteínas precipitadas/agregadas se realizó por decantación centrífuga. el concentrado de proteínas de guisante resultante se obtuvo como una suspensión acuosa que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (basado en el peso).

Etapa 2-Preparación de extractos de proteína de guisante.

El extracto (E) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de la suspensión acuosa obtenida en la etapa 1 a aproximadamente el 16 % (en peso) después de la adición de agua; seguido de un ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 7,4; y tratamiento térmico posterior a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante aproximadamente 7 minutos; luego secando por pulverización la suspensión para obtener un polvo que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 95 % (en peso).

Extraer el concentrado de proteína de guisante (F) preparado de acuerdo con la invención tal como se describe en el ejemplo 1.

El extracto (G) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de la suspensión acuosa obtenida en la etapa 1 a aproximadamente el 16 % (en peso) después de la adición de agua; seguido por el ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 6,1; y tratamiento térmico posterior de la suspensión a una temperatura de aproximadamente 98 °C durante aproximadamente 7 minutos; y luego mediante secado por pulverización de la suspensión para obtener un polvo que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 95 % (en peso).

Para cada extracto se midieron las propiedades de humectabilidad, fluidez, densidad tras el asentamiento y densidad aparente.

Los resultados se dan en la Tabla 5.

Tabla 5

	humectabilidad (seg)	propiedades de fluidez (unidad Brabender)	densidad tras el asentamiento (g/ml)	densidad aparente (g/ml)
Extracto E	> 1200	2013	0,4	0,3
Extracto F	22		0,8	0,5
Extracto G	575	2215	0,4	0,3

Se evaluó el color de los extractos de proteína de guisante E, F y G. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

	Color de los polvos		
	L*	a*	b*
Extracto E	86,0	3,5	21,9
Extracto F	83,7	4,6	22,1
Extracto G	85,5	2,3	21,9

Se midieron el pH y la resistencia del gel a pH 6 de cada extracto. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

	pH natural	Fuerza del gel a pH 6 (g)
Extracto E	7,8	330
Extracto F	5,4	< 50
Extracto G	6,3	220

5

El índice de solubilidad de nitrógeno (ISN) de cada extracto en función del pH se da en la Tabla 8 y se muestra en la Figura 5.

Tabla 8

Producto	Índice de solubilidad de nitrógeno (%)					
	pH 3,5	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7	pH 8
E	7,0	4,2	6,0	34,9	39,8	44,5
F	2,0	1,0	1,0	2,0	3,0	6,0
G	10,3	3,0	9,2	18,5	24,0	37,2

10

La viscosidad medida para cada extracto a diferente pH se da en la Tabla 9.

Tabla 9

Producto	Viscosidad (cP)					
	pH 7,5	pH 6,4	pH 6,2	pH 6	pH 5,8	pH 4
E	5779	8260	9313	13227	16240	905
F	38	52	54	59	65	129
G	1592	1769	1040	1491	3893	461

15 La característica sensorial de cada extracto se determinó después de la dispersión en agua corriente al 4 % en peso y los resultados se dan en la Tabla 10.

Tabla 10

	Observaciones
Extracto E	Ligero olor de guisantes, color amarillo, ligeramente espumoso, ligeramente amargo y astringente.
Extracto F	Muy ligero olor a guisantes, muy arenoso, líquido, amargo, sabor bastante suave (ataque no demasiado fuerte), no muy vegetal
Extracto G	Olor a guisante, arenoso, ligeramente astringente, ligeramente amargo y ácido

20 **Ejemplo 4: Uso de proteínas de guisante según la invención en la clarificación de vinos**

La clarificación del vino se realiza para disminuir la turbidez y mejorar el brillo y el sabor.

Se añade una solución de proteína cargada positivamente ($\text{pH} < \text{pHi}$) al vino (pH 2,8 a 4,0). En presencia de partículas de vino cargadas negativamente, las cargas eléctricas se neutralizan y los coloides hidrofílicos estables se vuelven inestables, lo que da como resultado su precipitación.

- 5 Los agentes de clarificación comúnmente utilizados en la presentación de vinos son gelatina, albúmina de huevo, caseína o proteínas vegetales. También se usan a menudo adyuvantes de clarificación tales como sílice (dióxido de silicio) o taninos.

- 10 Se evaluaron diferentes tipos de proteínas de guisante a dos concentraciones diferentes (5 g/hl y 10 g/hl) en soluciones alcohólicas de 12°, a pH 3,2, 4 °C, en presencia de taninos o SiO_2 . La absorbancia de las soluciones se midió después del reposo (de 1 h a 96 h).

- 15 El proceso fue el siguiente: en un vaso de precipitados de 2 litros, se añadieron 1750 g de agua (= 1750 ml). Se llenó un matraz volumétrico con 250 ml de etanol de 96°. El etanol se añadió al agua y se mezcló completamente. El pH de la solución resultante se ajustó a 3,2 con HCl 1 M (se anotó el peso). Los taninos o dióxido de silicio se añadieron a la solución, y se mezclaron a fondo. La solución se cubrió y se dejó reposar durante 1 h. Se añadieron las proteínas de guisante y eso constituyó el tiempo de inicio de incubación ($t=0$ h). La solución se almacenó a 4 °C.

- 20 Muestreo: se realizó de la siguiente manera; Se llenó una jeringa de plástico con 30 ml de la solución, tomada en el centro del vaso de precipitados sin agitar la solución, se llenó una celda para medir la absorbancia con la solución. La absorbancia a 420 nm se registró utilizando un espectrómetro. La solución se filtró luego usando un filtro Whatman de 0,45 μm . La absorbancia del filtrado se midió a 420 nm.

- 25 La turbidez se midió utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Turbidez} = \text{absorbancia antes de la filtración} - \text{absorbancia después de la filtración}$$

1. Concentraciones de proteínas de 5 y 10 g/hl con taninos como adyuvantes

- 30 Se prepararon varias soluciones. Los taninos se usaron a una concentración de 0,3 ml/l.

- 35 El Blanco T (también denominado Control T) fue el control negativo con taninos (sin ningún agente de clarificación). Los taninos fueron una solución lista para usar: Solución ST del Institut Oenologique de Champagne que consiste en una solución de ácido tánico (número de CAS: 1401-55-4) y sulfato de cobre.

Perle T fue el control positivo con taninos (también conocido como Perle), y además contenía como agente de clarificación 0,115 g/hl de Colle Perle (gelatina hidrolizada del Institut Oenologique de Champagne).

- 40 Los extractos E y F preparados en el Ejemplo 3 se usaron como proteínas de guisante.

La solución A comprendía la solución Blanco T y la proteína de guisante del extracto E.

La solución B comprendía la solución Blanco T y la proteína de guisante del extracto F.

- 45 La turbidez de las soluciones después de diferentes tiempos de incubación a 4 °C se midió como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 7. La turbidez de las soluciones después de 96 h de incubación se muestra en la Figura 6.

Tabla 11

(horas)			5 g de proteína de guisante/hl		10 g de proteína de guisante/hl	
	Blanco T	Perle T	A	B	A	B
1	0,014	0,124	0,603	0,106	0,790	0,203
3	0,013	0,138	0,472	0,105	0,672	0,159
24	0,012	0,071	0,192	0,074	0,318	0,099
48	0,017	0,030	0,121	0,072	0,170	0,075
72	0,016	0,015	0,057	0,057	0,092	0,086
96			0,057	0,047	0,076	0,044

- 50

2. Concentración de proteínas de 5 g/hl con SiO_2 como adyuvante

SiO_2 se usó a 0,6 ml/l.

El Blanco S (también conocido como Control S) fue el control negativo con SiO_2 (sin agentes de clarificación)

El Perle S fue el control positivo con SiO₂ y que contiene 0,115 g/hl de Colle Perle (gelatina hidrolizada proporcionada por el Institut Oenologique de Champagne)

Los extractos E y F preparados en el Ejemplo 3 se usaron como proteínas de guisante.

La solución A1 comprendía la solución Blanco S y la proteína de guisante del extracto E.

La solución B1 comprendía la solución Blanco S y la proteína de guisante del extracto F. La turbidez de las soluciones después de un tiempo de incubación diferente a 4 °C se midió como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 12 y en la Figura 9. La turbidez de las soluciones después de 96 h de incubación se muestra en la Figura 8.

Tabla 12

(horas)	5 g de proteína de guisante/hl			
	Blanco S	Perle S	A1	B1
1	0,001	0,532	0,816	0,080
3	0,002	0,205	0,746	0,046
24	0,001	0,031	0,179	0,030
48	0,002	0,021	0,050	0,015
72	0,003	0,014	0,038	0,015
96			0,025	0,012

3. Efecto de adyuvantes a una concentración de proteína de 5 g/hl

La Tabla 13 y la Figura 10 muestran el efecto de los diferentes adyuvantes probados en 1 y 2 después de 96 h de incubación a 4 °C, en comparación con las soluciones que contenían solo las proteínas y sin adyuvantes (ninguno).

Ninguno: proteínas de guisante a 5 g/hl en soluciones alcohólicas de 12°, a pH 3,2, 4 °C preparadas de la siguiente manera: en un vaso de precipitados de 2 litros, se añadieron 1750 g de agua (= 1750 ml). Se llenó un matraz volumétrico con 250 ml de etanol de 96°. El etanol se añadió al agua y se mezcló completamente. El pH de la solución resultante se ajustó a 3,2 con HCl 1 M (se observó el peso). Se añadieron las proteínas de guisante. La solución se almacenó a 4 °C

Tabla 13

Adyuvante	5 g de proteína de guisante/hl	
	Solución que contiene extracto E	Solución que contiene extracto F
Taninos	0,057	0,047
SiO ₂	0,025	0,012
Ninguno	0,126	0,005

4. Comparación con otras proteínas de guisante (sin adyuvantes)

La solución A2 comprendía una solución alcohólica de 12° y proteína de guisante del extracto E.

La solución B2 comprendía una solución alcohólica de 12° y proteína de guisante del extracto F.

La solución C1 a F1 comprendía una solución alcohólica de 12° y proteínas de guisantes comerciales.

Los diferentes extractos se representan en la Tabla 14. La turbidez de las soluciones se midió después de diferentes tiempos de incubación. El efecto sobre la turbidez se indica en la Tabla 15 y la Figura 11.

Tabla 14

Código	Producto	Lote
A2	Extracto E	
B2	Extracto F de acuerdo con la invención	
C1	Nutripea AD	08/41.07.05
D1	Nutralys F85M	W272C
E1	Nutralys F85F	W179E
F1	Nutralys S85F	W037f

Tabla 15

	5 g de proteína de guisante/hl					
(h)	A	B	C	D	E	F
1	0,299	0,042	0,148	0,091	0,128	0,162
3	0,253	0,036	0,127	0,080	0,125	0,148
24	0,195	0,013	0,084	0,083	0,109	0,130
48	0,174	0,008	0,067	0,079	0,110	0,119
72	0,160	0,007	0,059	0,075	0,103	0,113
96	0,148	0,005	0,061	0,074	0,103	0,119

5 Ejemplo 5: Productos alimenticios que comprenden proteínas de guisante según la invención

Se evaluó la inclusión de proteínas de guisantes en diversos productos alimenticios.

1. Galletas

Se prepararon masas para galletas. El extracto E (no según la invención) y el extracto F (según la invención) tal como se preparó en el Ejemplo 3 se usaron como proteínas de guisante. Se realizaron pruebas para evaluar el pH de la masa de galletas preparada con el Extracto E, y/o para modificar el pH de la masa preparada con el Extracto F y diferentes agentes correctores de la acidez y agentes elevadores.

1a) La masa se preparó tal como se muestra en la Tabla 16

Tabla 16

Ingredientes	Trial1	Trial2
Grasa vegetal (palma)	6,49	6,49
Azúcar glas (5 % de almidón)	10,38	10,38
Jarabe de glucosa 38 DE	1,48	1,48
Sal	0,26	0,26
Jarabe de sorbitol	1,11	1,11
Mezclar durante 2 minutos en la primera marcha (106 rpm)		
Agua	30,63	30,63
Bicarbonato de amonio	0,20	0,20
Bicarbonato de sodio	0,20	0,20
Añadir agua en dos etapas y mezclar durante 2 x 1 minutos a 106 rpm		
Harina de trigo	37,12	37,12
Pirofosfato de sodio	0,13	0,13
Extracto E	12,00	
Extracto F		12,00
Mezclar durante 1 minuto a 106 rpm y durante 15 segundos a 196 rpm		
Peso(g)	100,00	100,00

Un análisis de la masa se da en la Tabla 17.

Tabla 17

	Ensayo 1	Ensayo 2
masa de pH	7,3	6,42
Proceso de observaciones	La pasta de textura de masa era lo suficientemente suave, la laminación era suficiente	La textura de la masa era más suave, la laminación fue más difícil
A _w de las galletas (%) (actividad de agua después de 1 día)	15,5	17,6

5

1b) La masa se preparó como se muestra en la Tabla 18.

10 Se preparó una masa (Tabla 18) en la que se redujo la cantidad de agua añadida en la masa preparada con extracto F, se descubrió una reducción óptima del agua del 3 % y se obtuvo una masa con excelente textura y capacidad de laminación. Para la masa preparada con extracto E, se descubrió que no era posible reducir el contenido de agua ya que la masa se vuelve demasiado dura.

Tabla 18

Ingredientes	Ensayo 3	Trial4
Grasa vegetal (palma)	6,49	6,49
Azúcar glas (5 % de almidón)	10,38	10,38
Jarabe de glucosa 38 DE	1,48	1,48
Sal	0,26	0,26
Jarabe de sorbitol	1,11	1,11
Sabor a mantequilla	0,05	0,05
Mezclar 2 minutos a 1ª marcha		
Agua	30,63	27,63
Bicarbonato de amonio	0,20	0,20
Bicarbonato de sodio	0,20	0,20
Añadir agua en dos etapas y mezclar 2 x 1 minuto a 106 rpm		
Harina de trigo	37,07	40,07
Pirofosfato de sodio	0,13	0,13
Extracto E	12,00	
Extracto F		12,00
Mezclar 1 minuto a 1ª marcha (106 rpm) y 15 segundos a 2ª marcha (196 rpm)		
Peso(g)	100,00	100,00

Un análisis de la masa se da en la Tabla 19

Tabla 19

análisis de la masa	Ensayo 3	Ensayo 4
pH de la masa	7,3	6,3
dureza de la masa	160	171

5

Las galletas se prepararon con la masa de los ensayos 3 y 4. Se cocieron en un horno Eloma Backmaster a 150 °C durante 20 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente antes de envasarse. En la Tabla 20 se muestra un análisis de galletas preparadas con las respectivas masas del ensayo 3 (galleta A) y el ensayo 4 (galleta B).

10

Tabla 20

Análisis de las galletas		Galleta A	Galleta B
Expansión en el horno	Longitud (mm)	57,5	57,4
	Anchura (mm)	54,2	53,0
Actividad del agua	Después de 1 día	26,2	18,0
	Después de 30 días	32,6	25,7
	Después de 60 días	31,3	34,8
	Después de 90 días	39,7	37,0
Materia seca (%)	Después de 1 día	95,7	96,9
	Después de 30 días	94,9	96,0
	Después de 60 días	95,8	95,5
	Después de 90 días	95,3	95,0
Dureza (g)	Después de 1 día	4114	3281
	Después de 30 días	4950	3017
	Después de 60 días	3756	2837
	Después de 90 días	4000	3056
Crujiente	Después de 1 día	12,1	18,5
	Después de 30 días	13,8	16,2
	Después de 60 días	12,6	12,4
	Después de 90 días	13,6	10,6
Análisis sensorial	Después de 7 días	Textura dura, ligeramente vegetal	Menos dura, crujiente, agradable dulzura, ligeramente vegetal

2. Pan enriquecido con proteínas

- 5 Los panes se prepararon usando un extracto de proteína de guisante G como se preparó en el Ejemplo 3, o un extracto de proteína de guisante F. Las recetas de pan se proporcionan en la Tabla 21. Además de masas idénticas preparadas con las proteínas de guisante de acuerdo con la invención (extracto F) y las proteínas de guisante que no están de acuerdo con la invención (G), se hicieron varias adaptaciones (reducción del contenido de agua en un 5 % para F con o sin ajuste de pH de la masa; así como la disminución del contenido de agua para G).

Tabla 21

	Extracto G	Extracto F	F - 5 % de agua	Extracto F - 5 % de agua + ajuste de pH			Extracto G - 2 % de agua
Ingredientes	Trial1	Trial2	Trial3	Trial4	Trial5	Trial6	Trial7
Agua	53,46	53,46	48,46	48,46	48,46	48,46	51,46
Levadura deshidratada	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
La levadura se disolvió en agua en una amasadora en espiral							
Harina de trigo	18,33	18,33	23,33	23,03	23,03	23,03	20,33
Gluten de trigo	15,28	15,28	15,28	15,28	15,28	15,28	15,28
Emulsionante para pan	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Enzima de panadería	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Propionato de calcio	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Extracto G	11,00						11,00
Extracto F		11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	
Citrato trisódico				0,30			
Citrato tripotásico					0,30		
Fosfato trisódico						0,30	
Amasar durante 7 minutos a 1ª marcha							
Sal	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Amasar durante 7 minutos a 2ª marcha							
Peso(g)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

- 10 La mezcladora utilizada fue una amasadora en espiral (tipo Vema QR24). Después de amasar, se sacó la masa de la amasadora y se dejó reposar durante 10 minutos. La masa se dividió en rollos de masa de 500 g, que se hicieron en la primera ronda y luego se alargaron con las manos. El pan se colocó en latas metálicas previamente engrasadas y se almacenó durante 1 hora y 15 minutos en un armario de fermentación controlada (t° 32 °C).
- 15 Horno: el pan se coció a 200 °C durante 60 minutos en un horno de cubierta (Salva Modular). 20 minutos antes del final de la cocción, se abrió la extracción de vapor. Luego se enfrió el pan a temperatura ambiente y se envasó en un embalaje apropiado.
- 20 La masa se preparó de acuerdo con las recetas anteriores de la tabla 21 y se evaluó como se indica en la tabla 22.

Tabla 22

	Extracto G	Extracto F	Extracto F - 5 % de agua	Extracto F - 5 % de agua + ajuste de pH			Extraer G - 2 % de agua
Análisis	Trial1	Trial2	Trial3	Trial4	Trial5	Trial6	Trial7
pH de la masa	5,99	5,43	5,41	5,49	5,52	5,95	5,96
Viabilidad de hacer pan	OK	difícil	OK	OK	OK	OK	OK

Se observó que la masa preparada con extracto de proteínas de guisante F, cuando se redujo el contenido de agua, la masa era menos pegajosa, tenía una buena elasticidad y era más fácil trabajar con ella. Para la masa preparada con extracto G, no fue posible reducir el contenido de agua en más del 2 %, la masa se vuelve demasiado dura de lo contrario.

- 5 Se midió el índice de fermentación de la masa. La Tabla 23 y la Figura 12 muestran el índice de fermentación para las respectivas masas.

Tabla 23

	Extracto G	Extracto F	Extraer F- 5 % de agua	Extracto F- 5 % de agua + ajuste de pH			Extraer G- 2 % de agua
Análisis	Trial1	Trial2	Trial3	Trial4	Trial5	Trial6	Trial7
Índice de fermentación (35 min)	6,75	-	9,70	8,31	8,66	10,04	7,10
Índice de fermentación (1h15)	26,50	-	29,61	24,25	26,67	28,40	26,15

- 10 Se evaluó la calidad del pan preparado. Los resultados se muestran en la Tabla 24. Las mediciones del volumen del pan y la dureza de la miga de pan se muestran en las Figuras 13 y 14, respectivamente.

Tabla 24

	Extracto G	Extracto F	Extracto F - 5 % de agua	Extracto F- 5 % de agua + ajuste de pH			Extracto G - 2 % de agua
Análisis	Trial1	Trial2	Trial3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Trial7
Volumen de pan (ml)	1259		1692	1684	1744	1793	1502
Actividad del agua (%) Día 1	97,4		97,5	96,8	97,0	96,6	96,0
Actividad del agua (%) Día 7	97,7		96,7	95,6	95,7	93,3	95,8
Delta Aw (D7-D1)	0,3	nd	-0,8	-1,2	-1,3	-3,3	-0,2
Materia seca (%) Día 1	51,8		56,9	57,2	58,0	57,4	51,9
Materia seca (%) Día 7	54,5		61,8	61,9	62,1	66,2	58,7
Materia seca Delta (D7-D1)	2,7	nd	4,9	4,7	4,1	8,8	6,8
Dureza de la miga de pan (g) Día 1	873		545	532	406	439	525
Dureza de la miga de pan (g) Día 7	1430		913	830	741	696	847

- 15 3. Barras de dulce de leche
- Las barras de dulce de leche se prepararon usando el extracto E y F tal como se preparó en el Ejemplo 3. Las recetas de la barra de dulce de leche se muestran en la Tabla 25.

20

Tabla 25

Ingredientes	A	B	B + ajuste de pH con fosfato de sodio
Jarabe de azúcar invertido	17,22	17,22	16,42
Extracto E	15,00	-	-
Extracto F	-	15,00	15,00
Proteínas de la leche - Nutrilac DR-7015V	12,00	12,00	12,00
Jarabe de oligofructosa - Fibrulosa L85	11,10	11,10	11,10
Jarabe de glucosa 38 DE	10,00	10,00	10,00
Caseinato de calcio - Protilight	5,00	5,00	5,00
Jarabe de sorbitol	3,00	3,00	3,00
Arándanos secos	3,00	3,00	3,00
Aceite de girasol	2,20	2,20	2,20
Glicerina	2,00	2,00	2,00
Grasas vegetales hidrogenadas	2,00	2,00	2,00
Citrato de calcio	1,6611	1,6611	1,6611
Maltodextrinas 18 DE	1,072	1,072	1,072
Fosfato de sodio	-	-	0,80
Citrato de magnesio	0,4672	0,4672	0,4672
Sal	0,15	0,15	0,15
Lecitina de soja	0,10	0,10	0,10
Aroma de frambuesa - Frambuesa 54428 A7	0,03	0,03	0,03
Chocolate negro (recubrimiento)	14,00	14,00	14,00
Total (g)	100	100	100

El proceso para preparar las barras fue el siguiente

- 5 - Derretir la grasa a 45 °C en un baño de agua
- Mezclar los jarabes y agregar la grasa
- Mezclar los polvos en un Hobart
- 10 - Añadir los jarabes y agitar durante unos minutos hasta obtener una pasta homogénea
- la masa se colocó en una bolsa de plástico y se extendió, dejándola reposar toda la noche
- 15 - Cortar las barras y cubrirlas con chocolate

Se ha observado que la mezcla (B) que contiene el extracto F según la invención tarda menos tiempo en homogeneizarse que la mezcla (A), aproximadamente unos 2 minutos menos.

- 20 El pH, la Aw (actividad del agua) y la dureza de las respectivas barras de dulce de leche con el tiempo (meses) se midieron y los resultados se ilustran respectivamente en las Tablas 26, 27 y 28. La dureza de la barra de dulce de leche también se midió y los resultados se muestran en la Figura 15.

Tabla 26

pH	A	B	B + ajuste del pH
T0	6,19	5,83	6,26
Mes 1 (M1)	6,11	nd	nd
Mes 2 (M2)	nd	5,79	nd
Mes 3 (M3)	6,34	5,89	6,13
Mes 6 (M6)	6,27	5,52	6,05
Mes 12 (M12)	nd	nd	nd

Tabla 27

Aw	A	B	B + ajuste del pH
T0	0,654	0,686	0,635
M1	0,656	0,678	0,673
M2	0,655	0,673	0,635
M3	0,660	0,677	0,653
M6	0,647	0,659	0,634
M12	nd	0,666	nd

Tabla 28

Dureza	A	B	B + ajuste del pH
T0	1106	290	883
M1	1610	724	908
M2	1853	849	1132
M3	1929	865	1133
M6	2228	873	1427
M12	3284	1664	2532

5

El análisis sensorial de las respectivas barras de dulce de leche se ilustra en la Tabla 29.

Tabla 29

tiempo	A	B	B + ajuste del pH
T0	Buen sabor de frutos rojos; dura	Buen sabor de frutos rojos, blanda, arenosa	Buen sabor de frutos rojos, blanda, arenosa
M1	dura +	dura; arenosa	dura; arenosa
M2	dura ++	dura; arenosa	dura; arenosa
M3	dura ++	dura; arenosa	más blanda que A, ligeramente arenosa
M6	muy dura y seca	nd	más blanda que A, masticables, ligeramente arenosa
M12	dura +++	dura; arenosa	

10

Ejemplo 6: Caracterización de un extracto de acuerdo con una realización de la invención (sin etapa de fermentación)

Etapa 1-Preparación de los concentrados de proteína de guisante:

15

Guisantes cosechados en seco, en el presente documento referido como "guisantes secos" (que tienen un contenido de materia seca (basado en el peso) de aproximadamente el 87 %) se tamizaron y se destonaron por paso a través de un destonador. Posteriormente, los guisantes fueron desvainados en un desvainador.

- 5 Los guisantes se molieron en seco para obtener una harina de guisantes. Se añadió agua potable a la harina de guisantes de modo que la composición final tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (en peso). Posteriormente, se ajustó el pH a aproximadamente 8 mediante la adición de hidróxido de sodio.

- 10 Después del ajuste de pH, la pasta de guisantes se sometió a decantación centrífuga. El sobrenadante que contenía proteínas e impurezas solubles (también denominado en el presente documento composición acuosa que comprende proteínas de guisante) tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 4 % (en peso).

- 15 La composición acuosa que comprende proteínas de guisante se sometió posteriormente a tratamiento térmico a 75 °C durante 15 segundos en un intercambiador de calor de placa.

- 20 Posteriormente, las proteínas de guisante se concentraron por precipitación isoelectrica. Para esto, el pH de la composición acuosa que comprende proteínas de guisante se ajustó a 4,8 con ácido sulfúrico. La separación de las proteínas precipitadas/agregadas se realizó por decantación centrífuga. El concentrado de proteínas de guisante resultante se obtuvo como una suspensión acuosa que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (basado en el peso).

Etapla 2-Preparación de extractos de proteína de guisante de los concentrados de la etapa 1:

- 25 El extracto (H) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de la suspensión acuosa obtenida en la etapa 1 a aproximadamente 18 % (en peso) después de la adición de agua; seguido de un ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 5,4; y tratamiento térmico posterior a una temperatura de aproximadamente 85 °C durante aproximadamente 7 minutos; luego secando por pulverización la suspensión para obtener un polvo que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 95 % (en peso).

- 30 El extracto (I) se obtuvo ajustando el contenido de materia seca de la suspensión acuosa obtenida en la etapa 1 de aproximadamente el 17 % (en peso) después de la adición de agua; seguido de un ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 5,4; y el tratamiento térmico posterior se realizó por inyección directa de vapor a una temperatura de aproximadamente 140 °C durante aproximadamente 4 segundos; y luego secando por pulverización la suspensión a 90 °C para obtener un polvo que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente el 96 % (en peso).

Se midieron la fuerza del gel, la densidad tras el asentamiento y la densidad aparente, la fluidez y la humectabilidad de los extractos de proteínas (H) e (I). Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30

Extracto	pH	Fuerza del gel (pH6)	Densidad tras el asentamiento	Densidad aparente	Fluidez	Humectabilidad
Unidades	-	(g)	(g/ml)	(g/ml)	(Unidad Brabender)	(seg)
H	5,6	<50	0,6	0,5	643	6
I	5,6	<50	0,6	0,5	732	4

El índice de solubilidad de nitrógeno (ISN) de ambos extractos en función del pH se muestra en la Tabla 31 y se muestra en la Figura 16.

Tabla 31

Producto	Índice de solubilidad de nitrógeno (%)					
	pH 3,5	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7	pH 8
H	6,8	2,5	1,2	3,6	7,2	8,0
I	4,9	1,7	2,3	3,8	4,0	5,1

La viscosidad medida para ambos extractos a pH diferente se da en la Tabla 32.

Tabla 32

Producto	Viscosidad (cP)					
	pH 7,5	pH 6,4	pH 6,2	pH 6	pH 5,8	pH 4
H	28	20	16	16	16	14
I	355	192	153	158	93	73

Ejemplo 7: Estudios comparativos de guisantes fermentados con diferentes cepas de Lactobacillus (Lactobacillus fermentum LMG 6902, Lactobacillus fermentum LMG 18026, Lactobacillus Crispatus LMG 12005 o Lactobacillus Acidophilus LMG 8151)

Los guisantes cosechados en seco, en el presente documento referidos como "guisantes secos" (que tienen un contenido de materia seca (basado en el peso total de guisantes secos) de aproximadamente el 87 %) se tamizaron y se destonaron pasando a través de un destonador. Posteriormente, los guisantes fueron desvainados en un desvainador.

Los guisantes fueron luego sometidos a fermentación con bacterias del ácido láctico (Lactobacillus fermentum LMG 6902, Lactobacillus fermentum LMG 18026, Lactobacillus Crispatus LMG 12005 o Lactobacillus Acidophilus LMG 8151). Se empaparon 2000 g de guisantes en 3663 g de agua desmineralizada esterilizada a una temperatura de 40 °C, en un recipiente. El medio de fermentación que comprende las cepas bacterianas mencionadas se añadió al mismo tiempo. El recipiente estaba en un baño termostatzado y se añadió una bomba, para recircular la fase acuosa a aproximadamente 250 ml/min.

Para Lactobacillus fermentum LMG 6902 y Lactobacillus fermentum LMG 18026 (ambos se obtuvieron de BCCM/IMG Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (UGent) Bélgica), el medio de fermentación se preparó como se describe en el procedimiento proporcionado por el BCCM (F109C Revival de cultivos liofilizados; medio recomendado 66). Luego se añadieron al recipiente 37 ml del medio de fermentación.

Para Lactobacillus crispatus LMG 12005 (50 Bn) y Lactobacillus Acidophilus LMG 8151 (100 Bn) (ambos se obtuvieron de THT s.a. Gembloux, Bélgica), el medio de fermentación se preparó poniendo 37 g de copos de Lactobacillus directamente en el recipiente.

Los guisantes fueron sometidos a fermentación en presencia de aproximadamente 10^8 ufc de bacterias del ácido láctico por ml de composición acuosa que comprende guisantes. La fermentación se realizó en un recipiente cerrado sin desgasificación a una temperatura de aproximadamente 40 °C.

Las figuras 17-20 ilustran respectivamente la evolución del contenido de azúcar, pH, acidez y concentración de bacterias del ácido láctico en función del tiempo de fermentación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer proteínas de guisante, que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una composición acuosa que comprende proteínas de guisante;
 (b) aislar dichas proteínas de guisante de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante;
 (c) obtener dichas proteínas de guisante aisladas como una suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8; y
 10 (d) someter dicha suspensión acuosa que tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8 a una temperatura en el rango de 75 °C a 210 °C;
 en donde la etapa (b) comprende ajustar el pH de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5;
 en donde la etapa (d) comprende someter dichas proteínas de guisante precipitadas a un tratamiento térmico a una temperatura en el rango de 115 °C a 210 °C durante un tiempo en el rango de 15 s a 0,01 s; a una temperatura en el rango de 95 °C a 115 °C durante un tiempo en el rango de 5 min a 15 s; a una temperatura en el rango de 75 °C a 95 °C durante un tiempo en el rango de 15 min a 5 min; a una temperatura en el rango de 75 °C a 110 °C durante un tiempo en el rango de 10 min a 2 min; a una temperatura en el rango de 80 °C a 100 °C durante un tiempo en el rango de 8 min a 5 min; o a una temperatura en el rango de 130 °C a 150 °C durante un tiempo en el rango de 8 s a 1 s.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde aislar proteínas de guisante de dicha composición acuosa de la etapa (b), comprende concentrar dichas proteínas de guisante.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la etapa (b) comprende al menos una etapa de precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa (b) comprende la precipitación isoeléctrica.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa (c) comprende ajustar o mantener el pH de la suspensión acuosa a un valor en el rango de 4,0 a 5,8, preferentemente, en el rango de 4,5 a 5,5.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante en la etapa (a) tiene un pH de al menos 6, preferentemente, en el rango de 6,0 a 9,0, preferentemente, en el rango de 6,5 a 8,5.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde antes de la etapa (a) una composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en presencia de bacterias del ácido láctico.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha fermentación se realiza en presencia de uno o más *Lactobacillus* sp.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde antes o durante la etapa (b) dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante, o dichas proteínas de guisante se someten a un tratamiento térmico, preferentemente pasteurización; dicha fracción que comprende proteína se somete a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo, al menos 40 °C, por ejemplo, al menos 50 °C, por ejemplo, dicha fracción que comprende proteína se somete a una temperatura en el rango de 30 °C a 90 °C, más preferentemente, en el rango de 50 °C a 80 °C, incluso más preferentemente, en el rango de 55 °C a 75 °C.

10. Extracto de proteína de guisante obtenible por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Composición de proteína de guisante, que comprende al menos el 60 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de la composición, en donde dicha composición de proteína de guisante tiene un índice de solubilidad de nitrógeno a pH 7,0 de como máximo el 15 %, tal como se mide en una composición acuosa que comprende el 3 % en peso de dicha composición de proteína de guisante basándose en el peso total de la composición acuosa.

12. Composición de proteína de guisante según la reivindicación 11, en donde dicha composición tiene un pH en el rango de 4,0 a 5,8, tal como se mide a temperatura ambiente en 10 g de composición de proteína de guisante suspendida en 90 g de agua.

13. Uso del extracto de proteína de guisante según la reivindicación 10 o la composición de proteína de guisante según la reivindicación 11 o 12 en productos alimenticios o de pienso, preferentemente, en productos alimenticios de panadería y de confitería, o para aclarar líquidos.

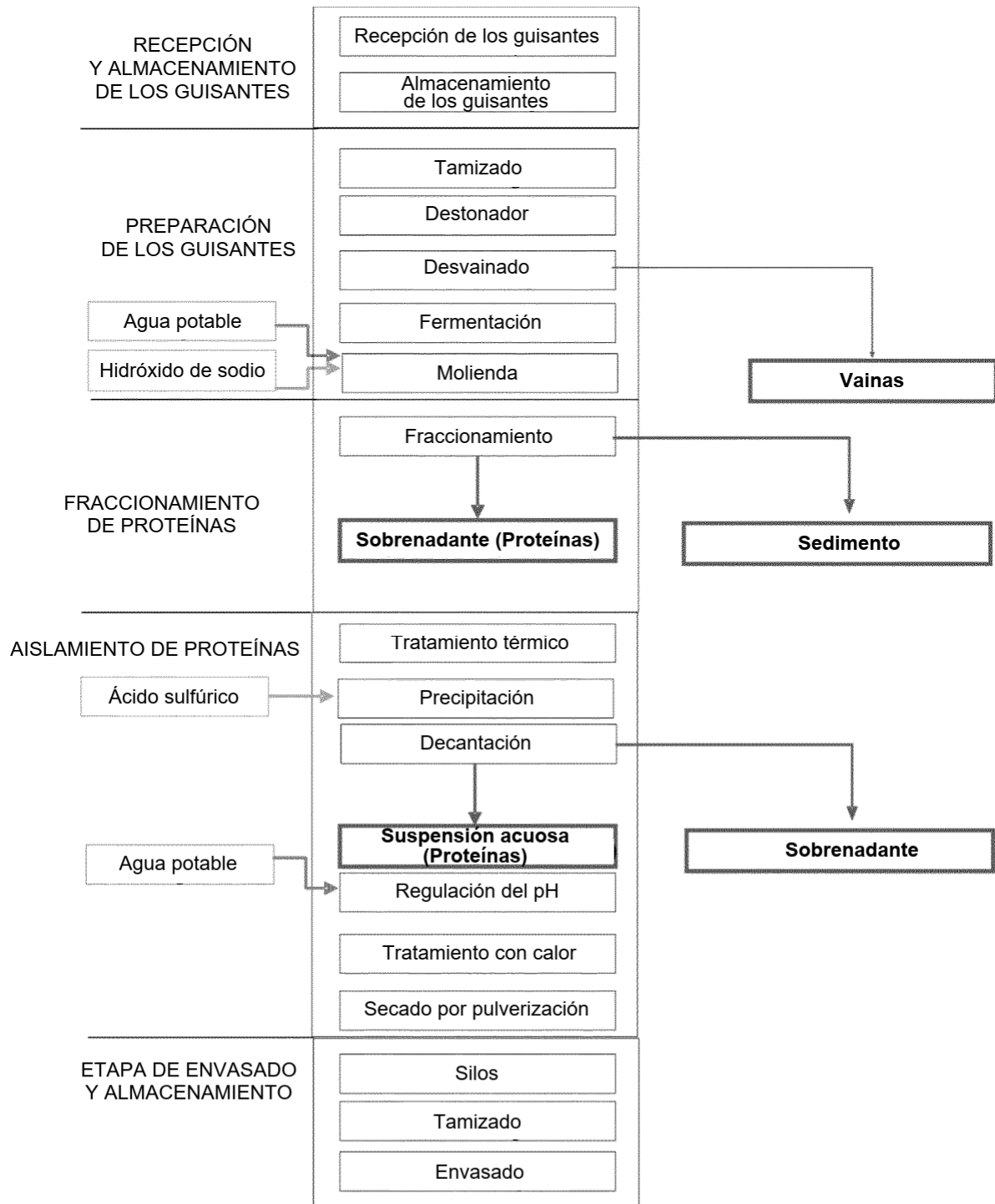


FIG. 1

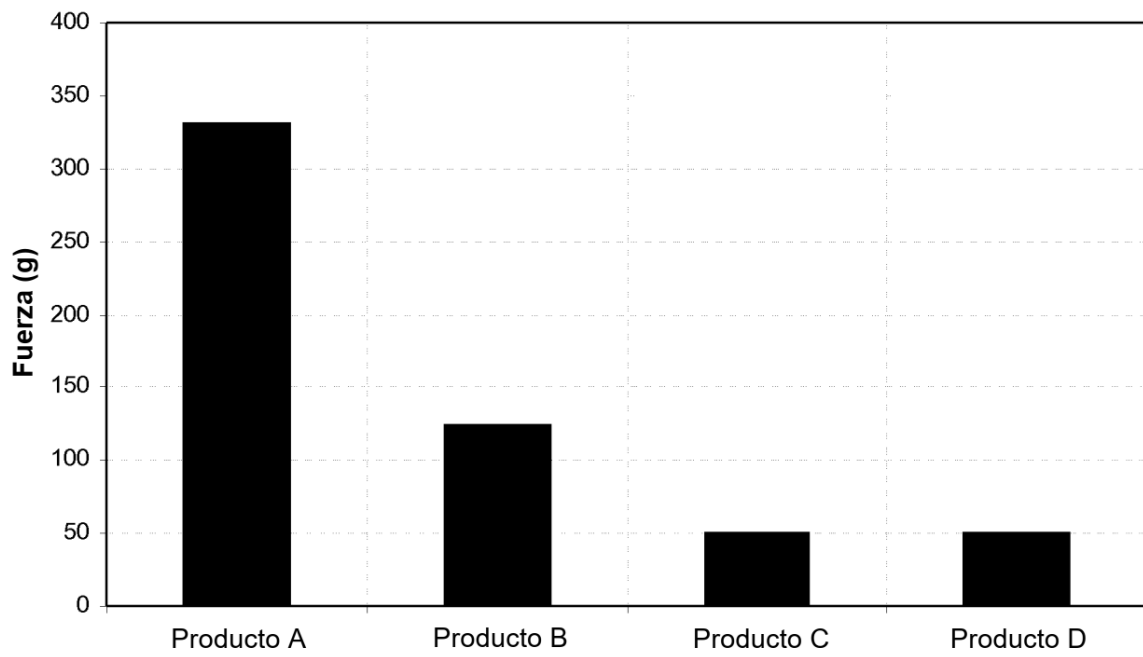


FIG. 2

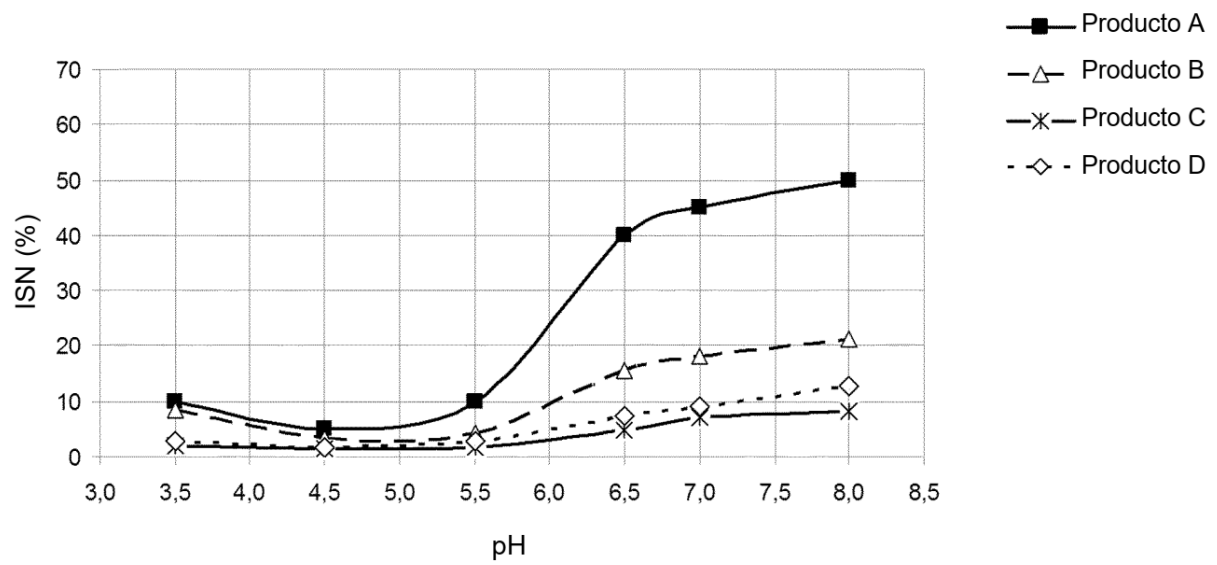


FIG. 3

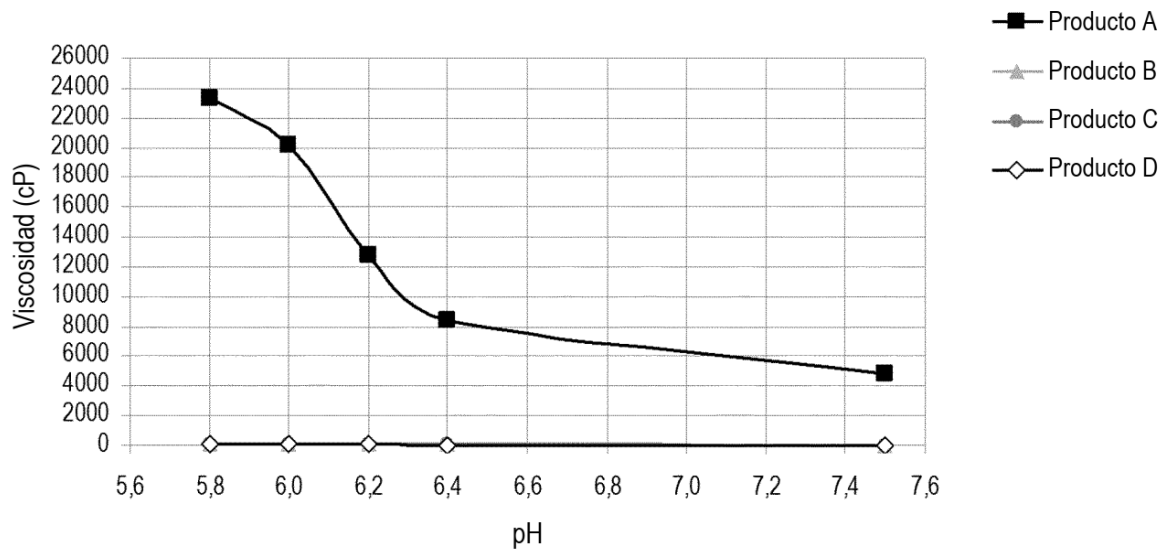


FIG. 4

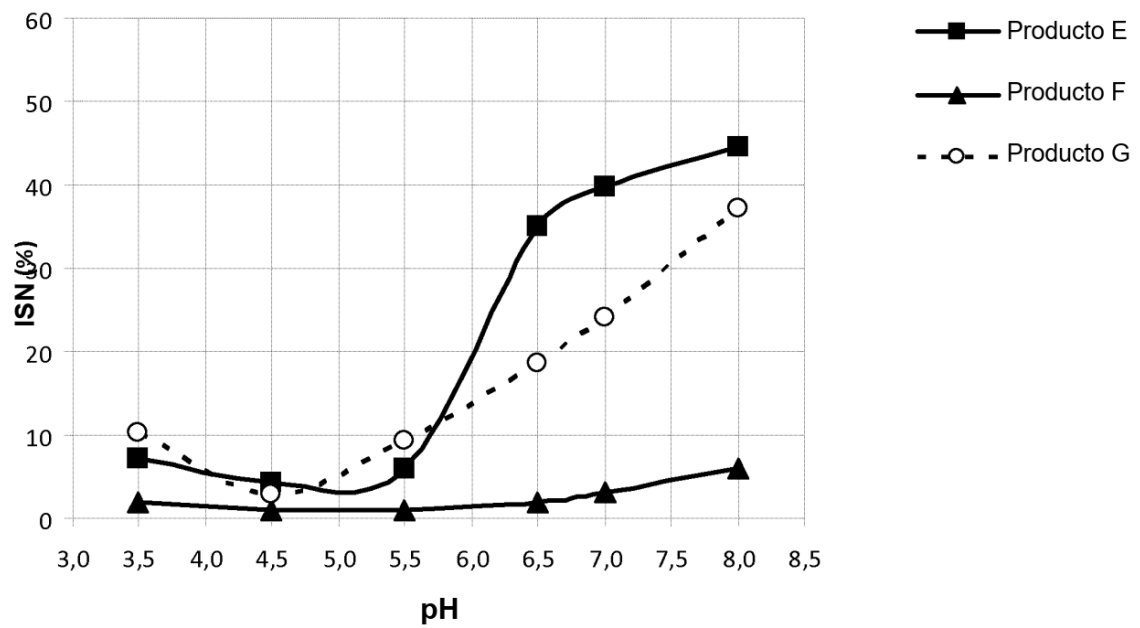


FIG. 5

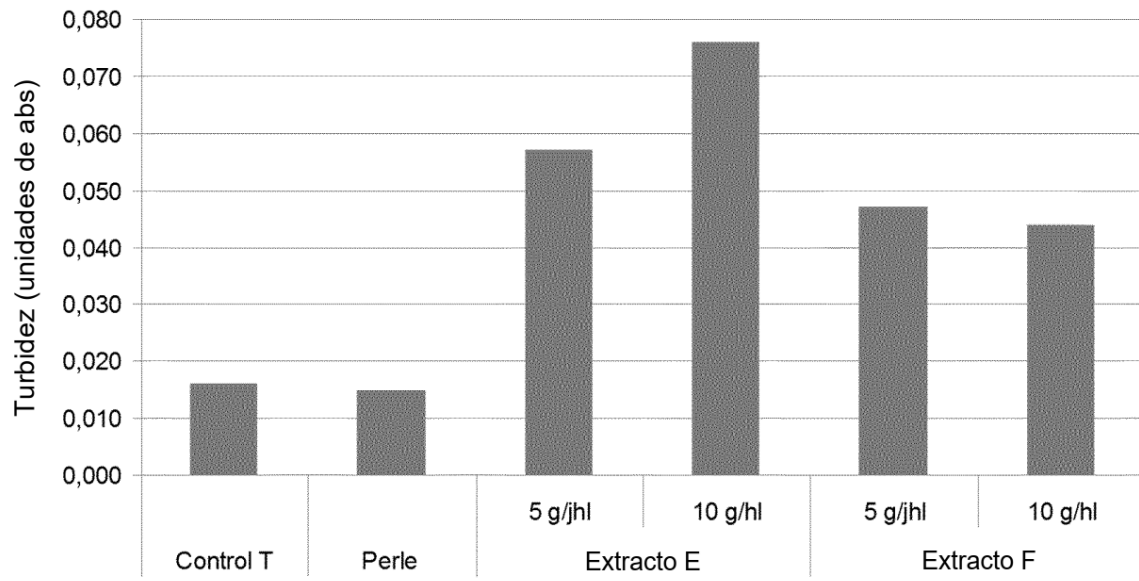


FIG. 6

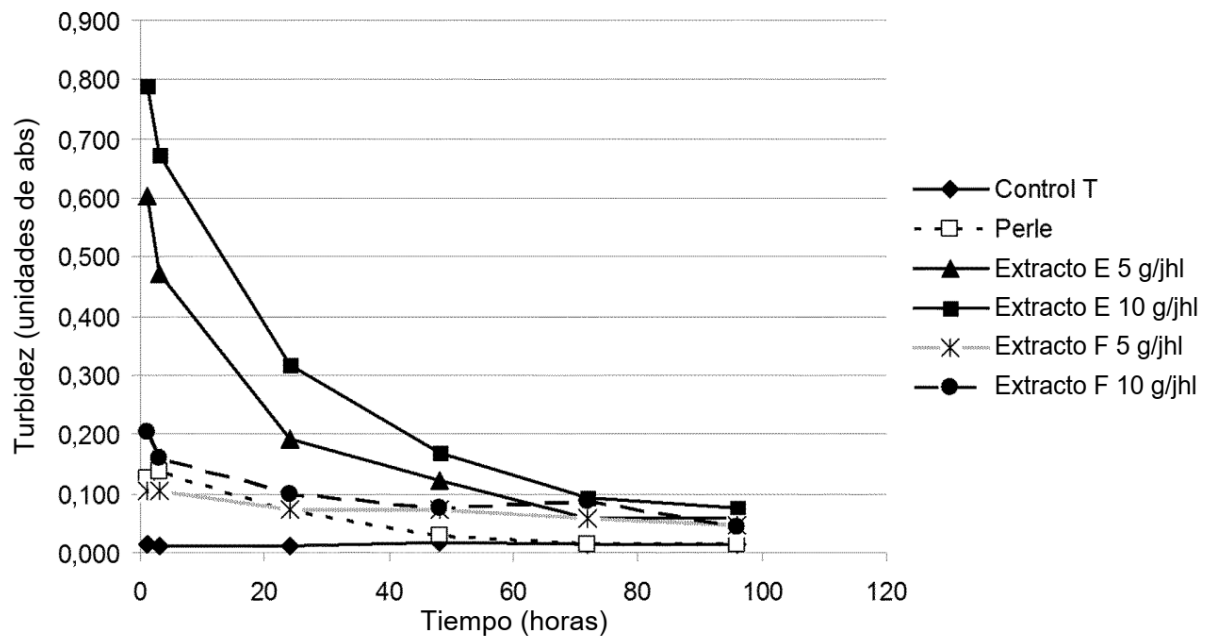


FIG. 7

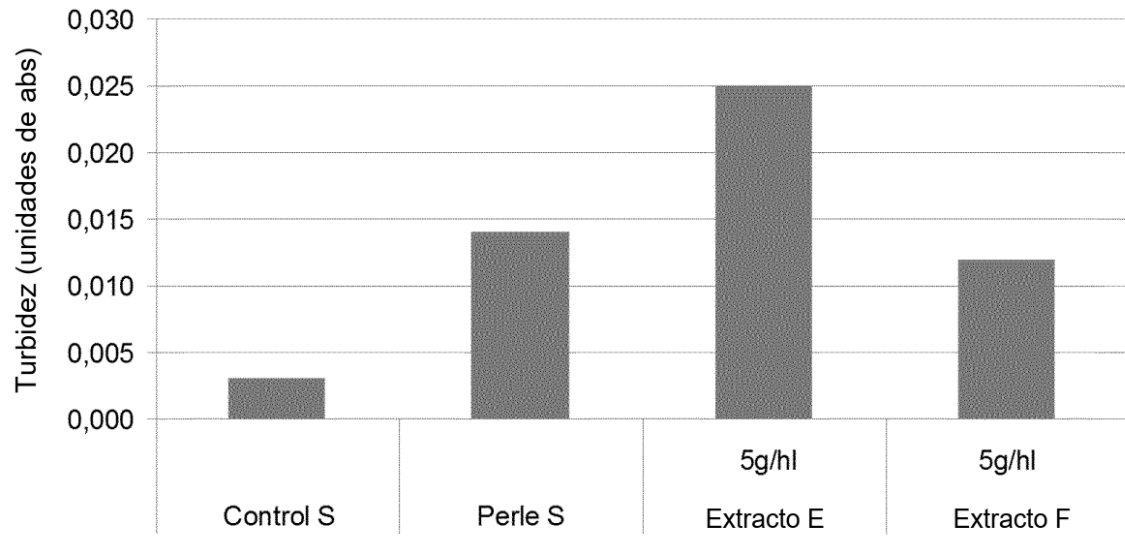


FIG. 8

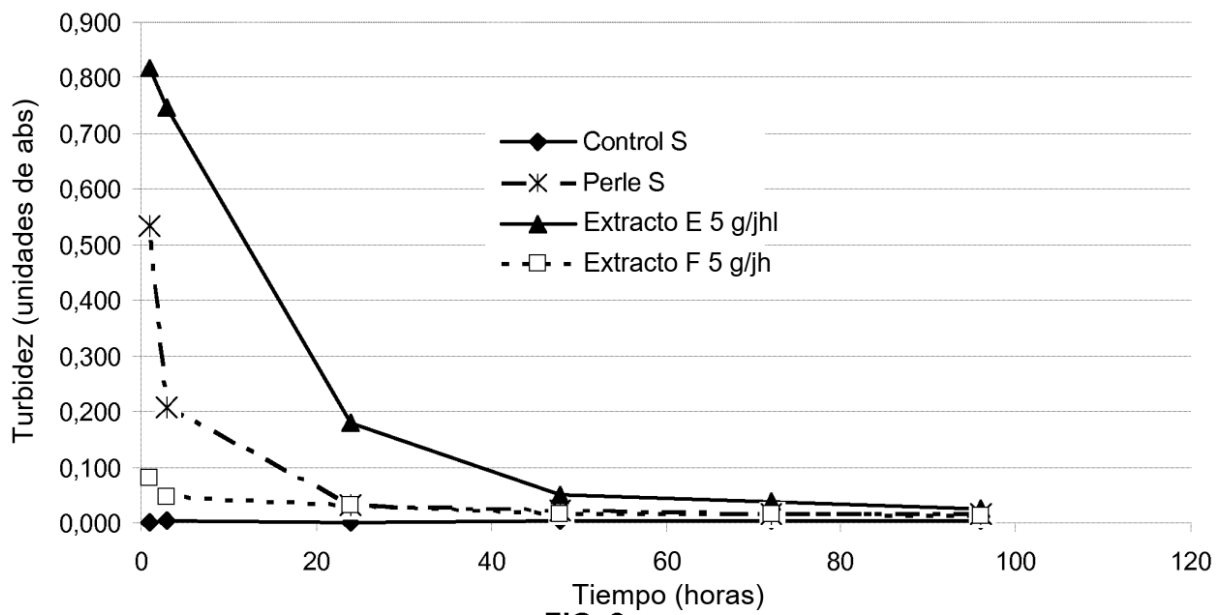


FIG. 9

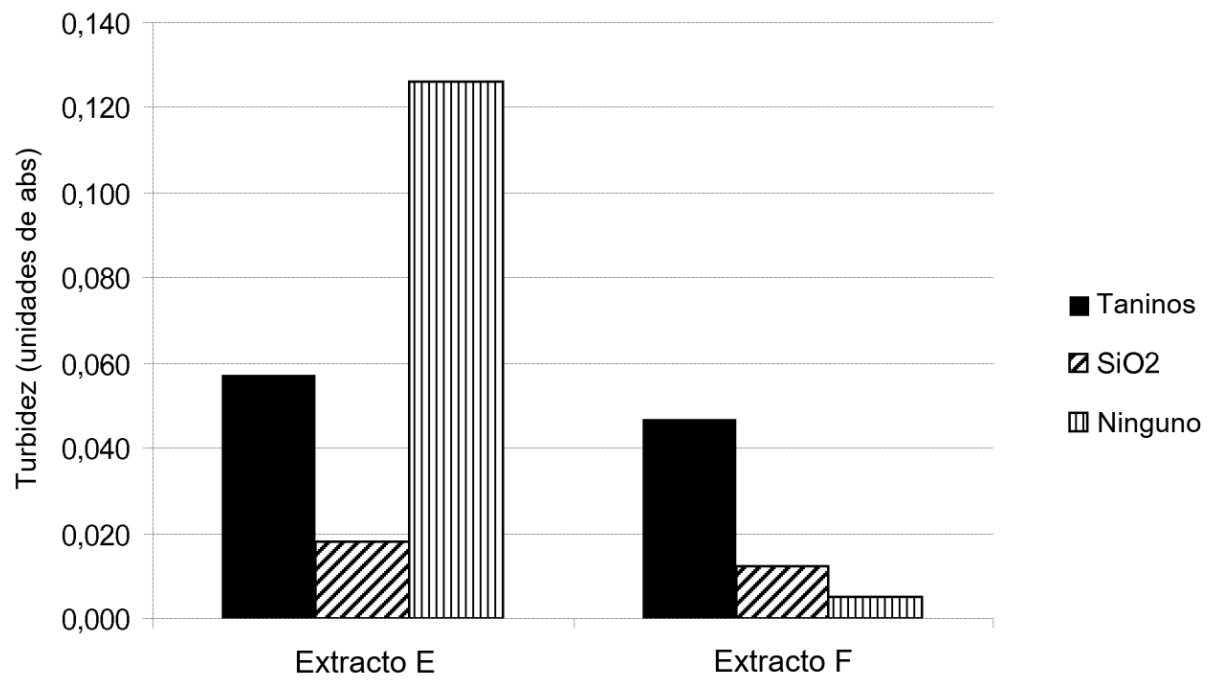


FIG. 10

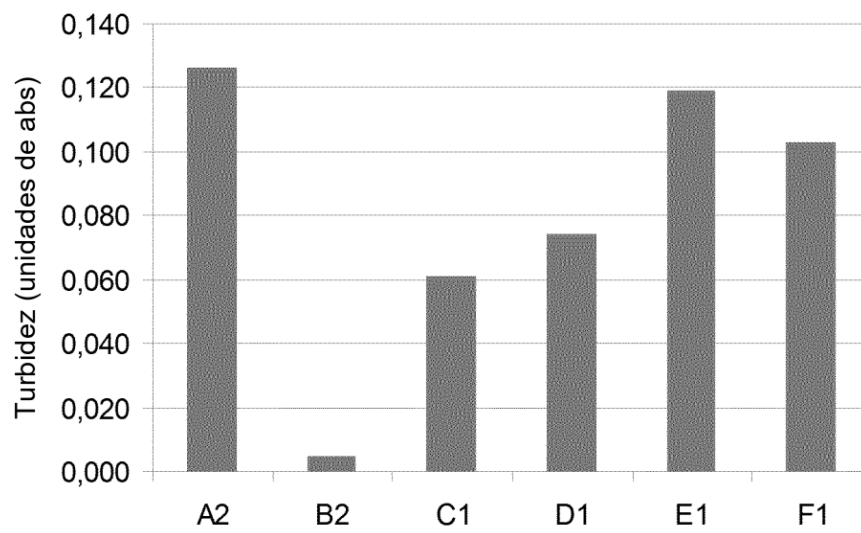


FIG. 11

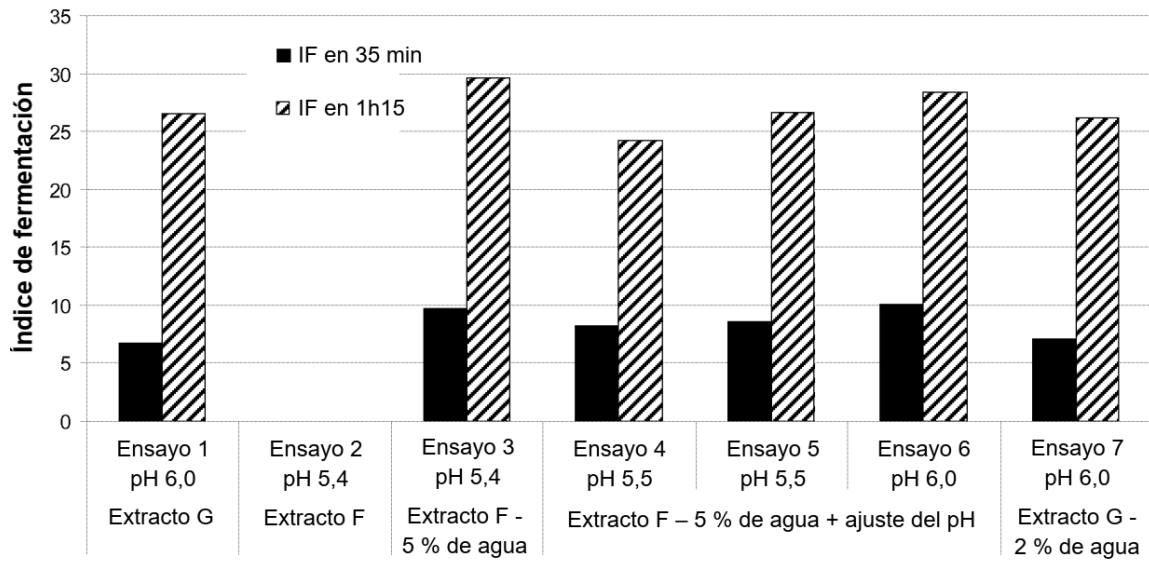


FIG. 12

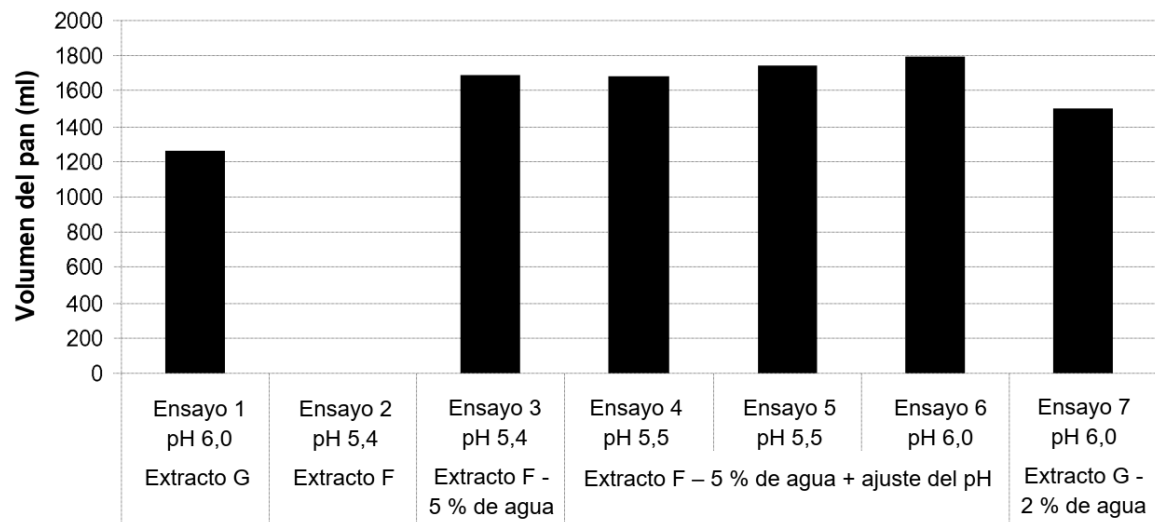


FIG. 13

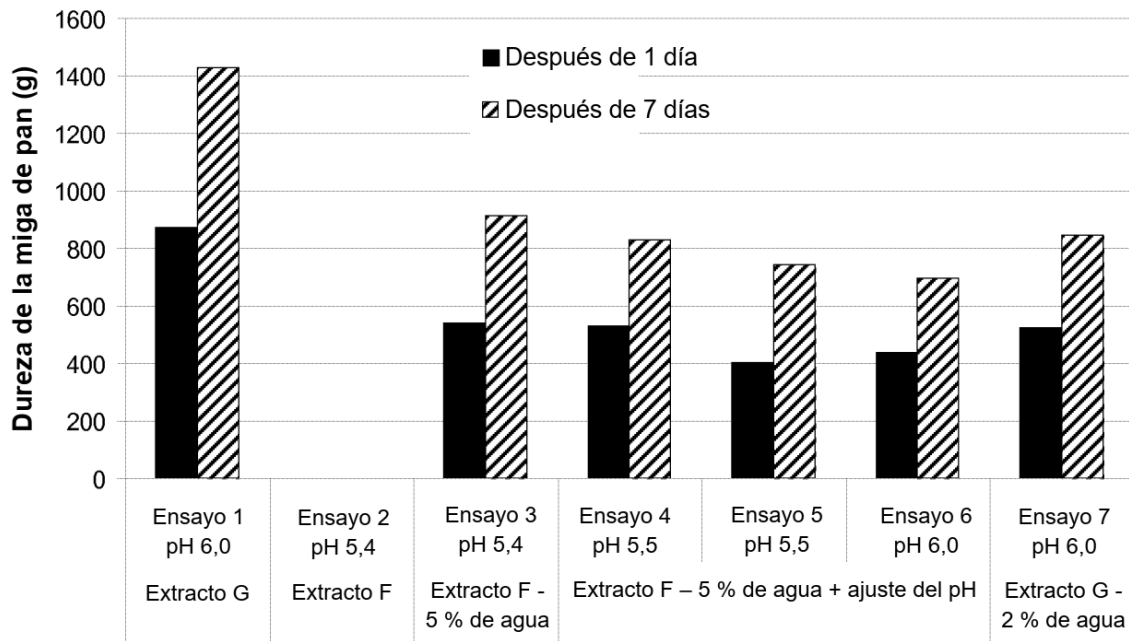


FIG. 14

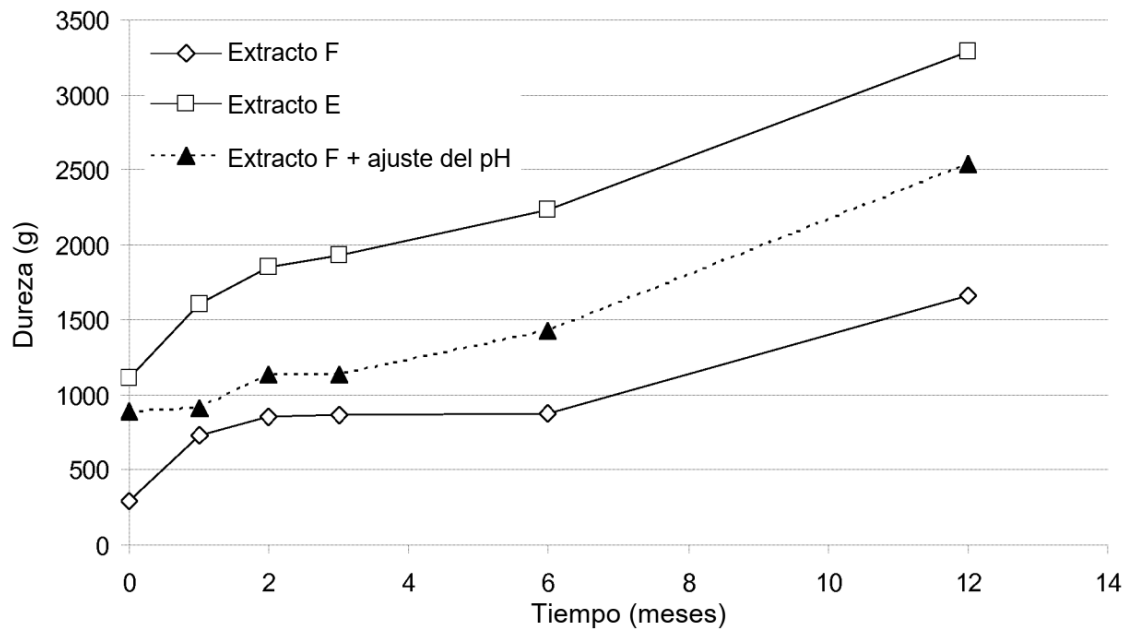


FIG. 15

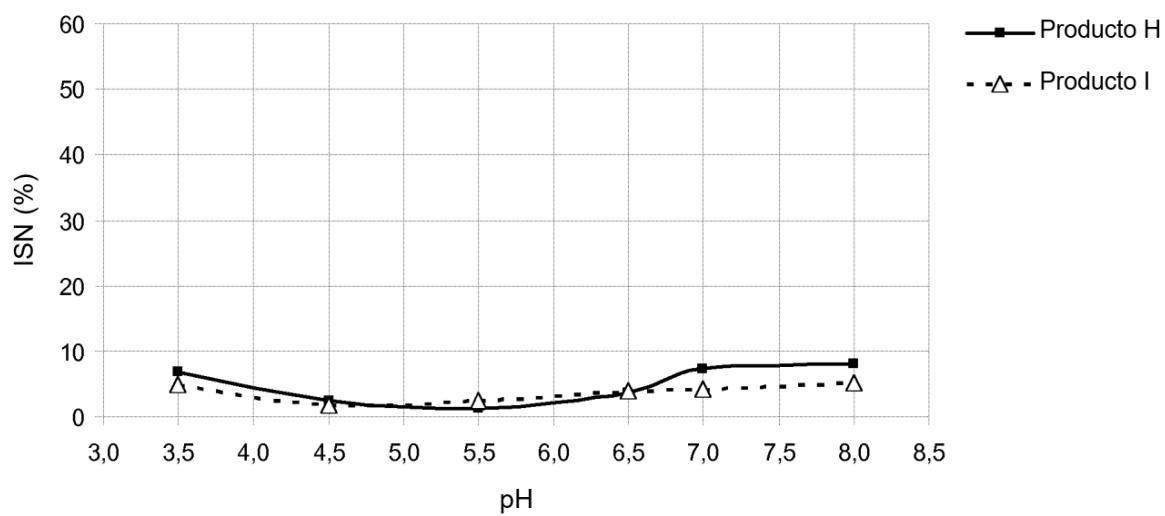


FIG. 16

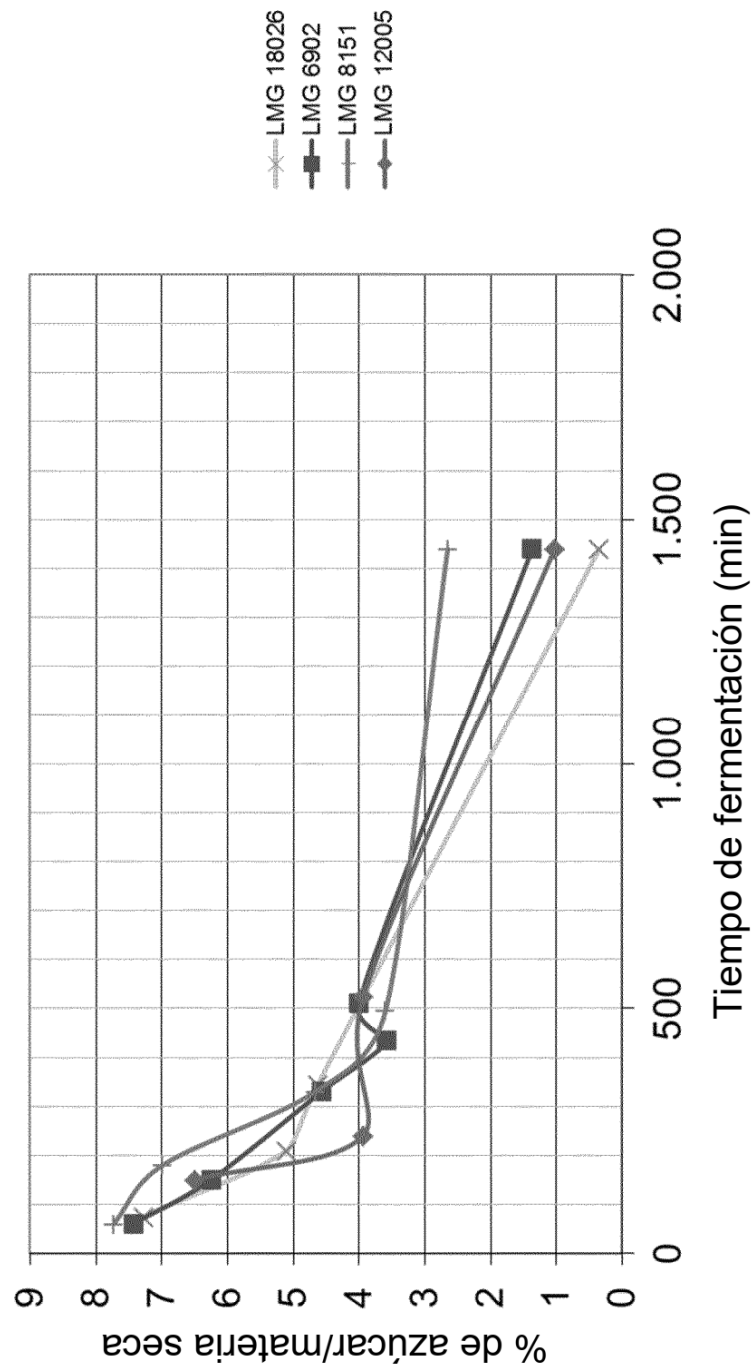
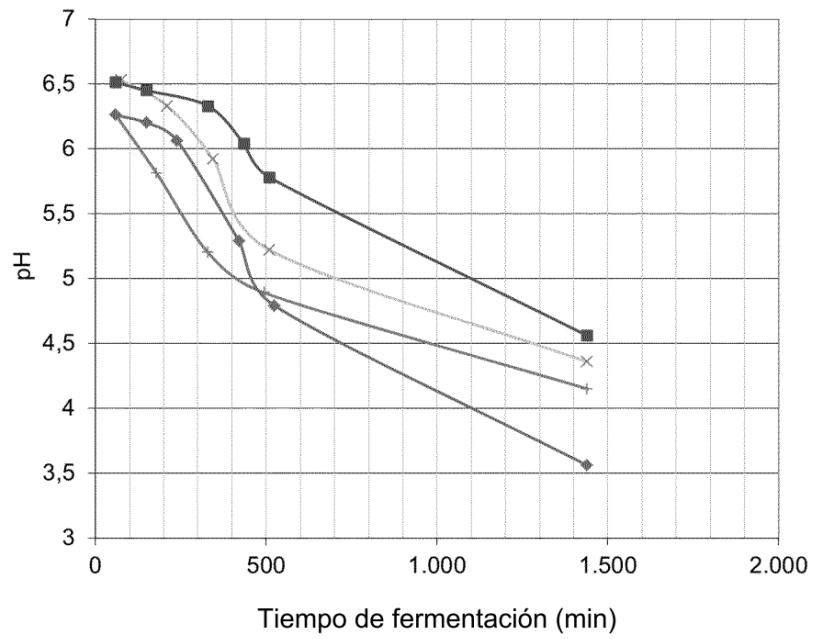


FIG. 17

A



B

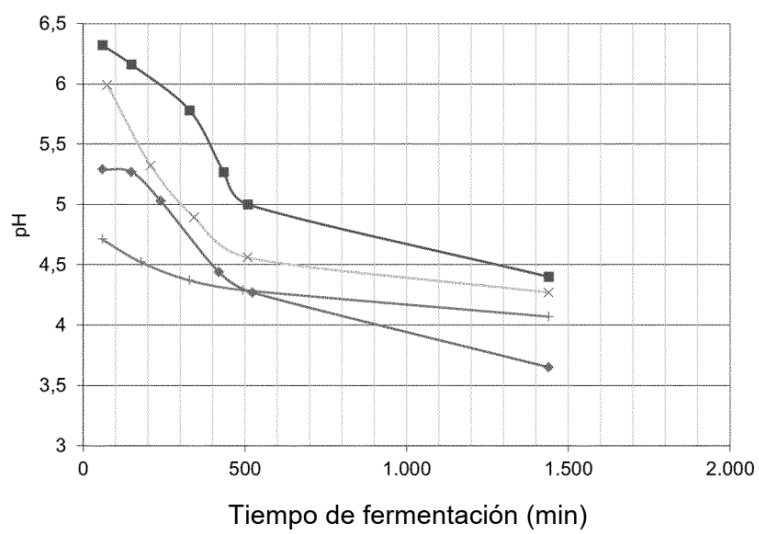
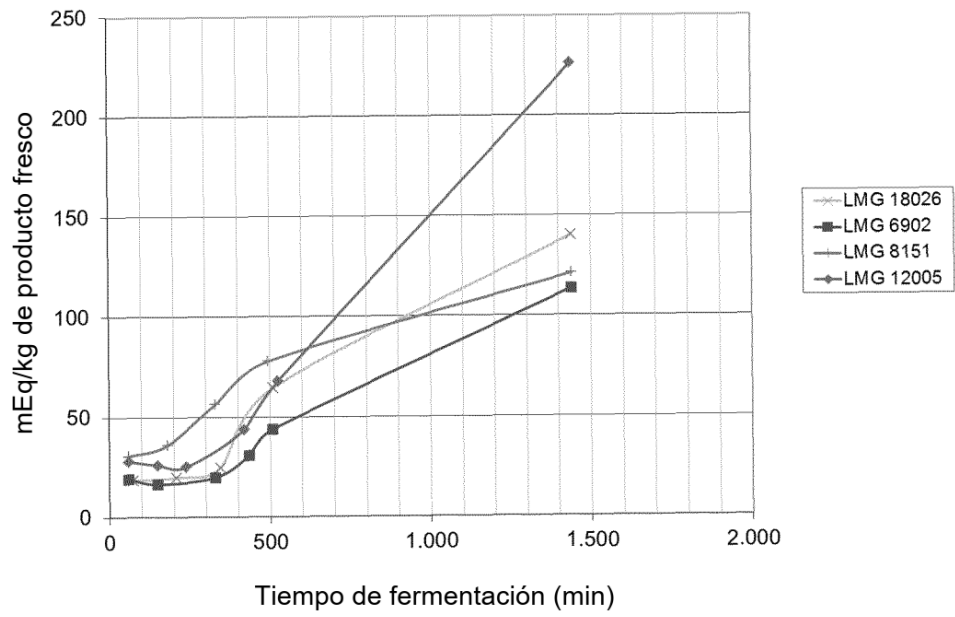


FIG. 18

A



B

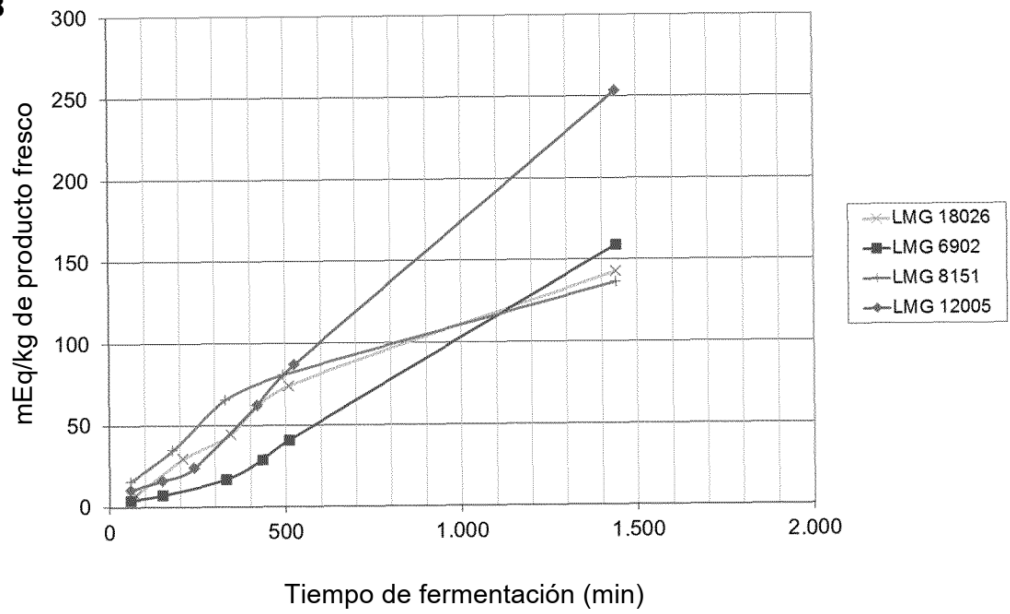


FIG. 19

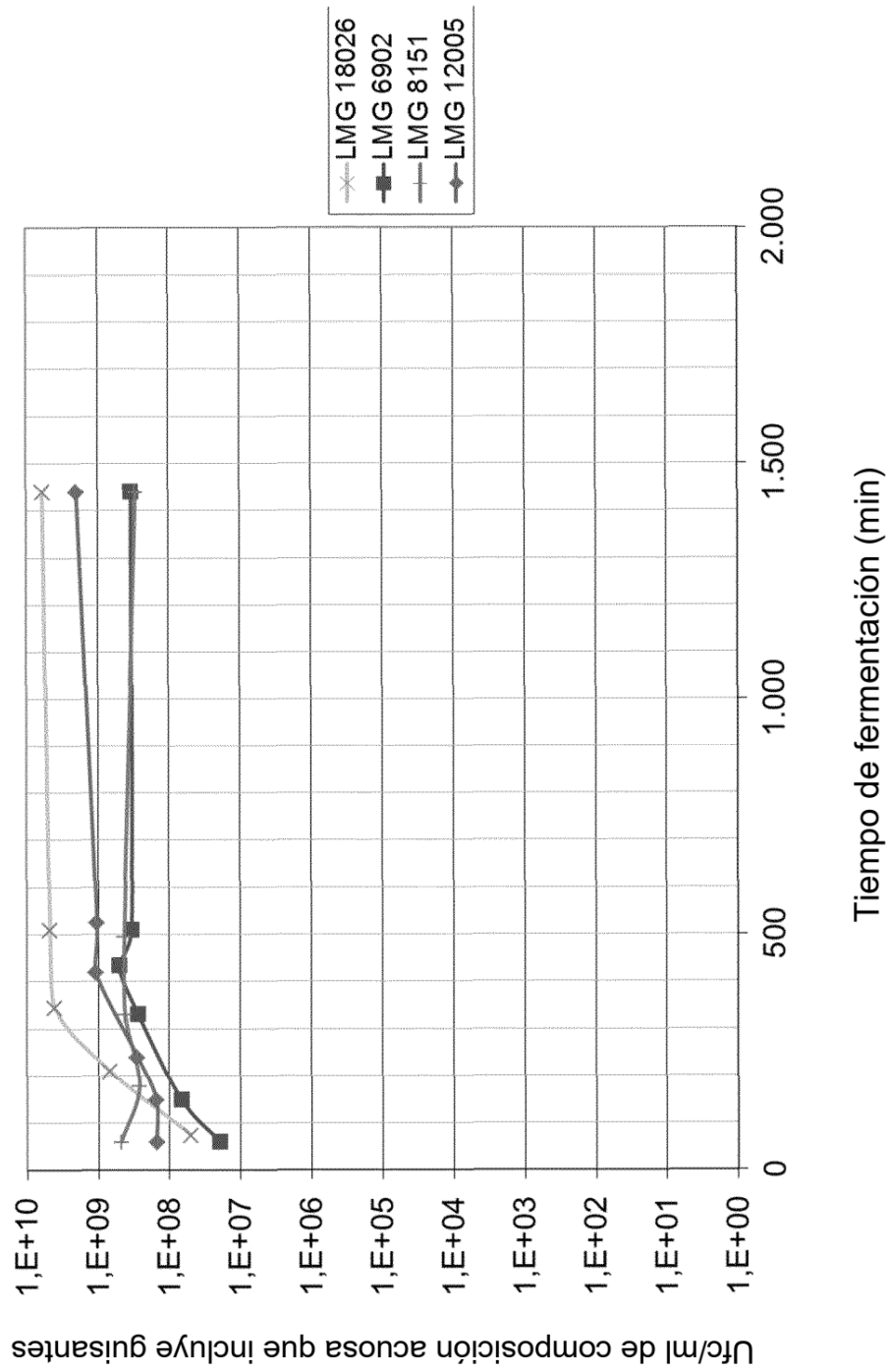


FIG. 20