



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9914392-5 B1

(22) Data do Depósito: 30/09/1999

(45) Data de Concessão: 06/10/2015
(RPI 2335)



(54) Título: "MÉTODO PARA PREPARAR UM SUBSTITUINTE DE LEITE, FÓRMULA INFANTIL, MISTURA PARA BEBIDA, CREME LÍQUIDO PARA CAFÉ, SOBREMESA CONGELADA, BARRA ALIMENTÍCIA NUTRICIONAL, ANÁLOGO DE QUEIJO PROCESSADO, OU ANÁLOGO DE QUEIJO CAPAZ DE SER ESPALHADO".

(51) Int.Cl.: A23L 1/20; A23L 1/10; A23L 2/38; A23J 1/14

(30) Prioridade Unionista: 07/10/1998 US 09/167,810

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): NEAL A. BRINGE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA PREPARAR UM SUBSTITUINTE DE LEITE, FÓRMULA INFANTIL, MISTURA PARA BEBIDA, CREME LÍQUIDO PARA CAFÉ, SOBREMESA CONGELADA, BARRA ALIMENTÍCIA NUTRICIONAL, ANÁLOGO DE QUEIJO PROCESSADO, OU ANÁLOGO DE QUEIJO CAPAZ DE SER**
5 **ESPALHADO"**.

Referência Anterior

O presente pedido é uma continuação-em-parte do pedido Internacional número PCT/US98/06579, designação dos Estados Unidos, o qual
10 foi depositado no Escritório de Recebimento dos Estados Unidos em 3 de Abril de 1998 e reivindica prioridade do Pedido Provisório Nº. de Série 60/042.643, depositado em 4 de Abril de 1997.

Fundamentos da Invenção

A presente invenção refere-se a uma composição com elevado
15 teor de beta-conglicinina, análogos de carne, análogos de queijo, bebidas e alimentos para animais e a métodos de produção de uma composição com elevado teor de beta-conglicinina, análogos de carne, análogos de queijo, bebidas e alimentos para animais.

As publicações e outros materiais usados aqui para esclarecer o
20 antecedente da invenção ou proporcionar detalhes adicionais com relação à prática são incorporados por referência.

Glicinina e beta-conglicinina (BC) contam por aproximadamente 70% das proteínas em soja. Foi postulado que as propriedades funcionais dos ingredientes das proteínas de soja em sistemas de alimentos podem ser
25 melhoradas através da modificação da proporção dessas proteínas. Tentativas anteriores foram feitas para aumentar a proporção de glicinina para beta-conglicinina a fim de melhorar o rendimento e qualidade dos géis de soja tipo "tofu" e melhorar o teor de aminoácidos de enxofre para fins nutricionais (Kitamura, K., Trend Food Science & Technology 4: 64-67 (1993), Murphy,
30 P. e outros, Food Technology 51: 86-88, 110 (1997)).

As propriedades dietéticas são necessárias para substituir as perdas metabólicas de proteínas dos tecidos e órgãos, para formar e deposi-

tar proteínas em novos tecidos e reabastecer a perda tecidual como uma consequência de condições patológicas. Essas necessidades são reunidas pelos aminoácidos indispensáveis (essenciais) e aminoácidos dispensáveis que compreendem as proteínas dietéticas. De modo geral, nesse contexto, o

valor nutricional das proteínas dietéticas é definido como a capacidade de reunir os requisitos diários quanto aos aminoácidos essenciais (Steinke, F. e outros, *New Protein Foods in Human Health: Nutrition Prevention and Therapy*, CRC Press, 1992). As proteínas de alta qualidade contêm todos os aminoácidos essenciais em níveis maiores do que os níveis de referência e são altamente digeríveis, de modo que os aminoácidos estão disponíveis. Nesse contexto, as proteínas de clara de ovo e do leite são os padrões pelos quais as outras proteínas são avaliadas e proteínas vegetais são consideradas como tendo um valor nutricional inferior. Os aminoácidos essenciais cujas concentrações em uma proteína estão abaixo dos níveis de uma proteína de referência são denominados aminoácidos limite, por exemplo, a soma de cisteína e metionina é limitativa em sojas.

A glicinina contém 3 a 4 vezes mais cisteína e metionina por unidade de proteína do que a beta-conglicinina (Fukushima, D., *Food Rev, Int.* 7: 323-351, 1991). Assim, espera-se que um aumento no teor de glicinina e uma diminuição no teor de beta-conglicinina resulte em uma proteína com qualidade intensificada (Kitamura, K. *Trends Food Science & Technology* 4: 64-67, 1993; Kitamura, K., *JARQ* 29: 1-8, 1995). Isso é consistente com a descoberta de que o valor médio dos teores de aminoácidos contendo enxofre nas sementes de quatro linhas representativas as quais são baixas em beta-conglicinina, mas cerca de 20% a mais do que aquele de quatro variedades comuns (Ogawa, T. *Japan. J. Breed.* 39: 137-147, 1989). Uma correlação positiva também foi relatada entre a proporção de glicinina:beta-conglicinina (1,7-4,9) e a concentração de metionina ou cisteína da proteína total, entre sojas do tipo silvestre (Kwanyuen e outros, *JAOC* 74: 983-987, 1997). Não existem relatos de composição de aminoácido de sojas com elevado teor de beta-conglicinina (proporção de glicinina:beta-conglicinina de menos do que 0,25).

Além da capacidade das proteínas de reunir as necessidades diárias do corpo com relação aos aminoácidos essenciais, as proteínas dietéticas também podem contribuir com padrões de peptídeos e aminoácidos bioativos os quais podem reduzir os fatores de risco para doenças cardio-

vasculares, câncer e osteoporose. Esses fatores composicionais também deveriam ser considerados na avaliação da qualidade da proteína, especialmente em países tal como os Estados Unidos, onde as pessoas consomem em média uma grande quantidade de proteína dietética. Pesquisadores (Sugano e outros, PCT No. WO89/01495; Sugano, M.J. Nutr 120: 977-985, 1990; Sugano, M. & Kobak, K. Annu. NY Acad. Sci. 676: 215-222, 1993; Wang, M. J. Nutr Sci. Vitaminol. 41: 187-195, 1995) identificaram uma fração da proteína de soja resistente à pepsina (peso molecular de 5.000 - 10.000) que representa cerca de 15% da proteína em proteína de soja isolada. Os seres humanos alimentados com uma dieta com a fração resistente à pepsina a 24 g ou 48 g por dia tinham colesterol LDL diminuído e mais excreção fecal de esteróides ácidos e neutros do que aqueles alimentados com dietas com proteína de soja isolada ou caseína. As proteínas de soja as quais contribuem para essa fração resistente à pepsina não foram identificadas. A beta-conglicinina purificada é mais resistente à pepsina do que a glicinina purificada (Astwood, J. & Funchs, R. In Monographs in Allergy, Sixth International Symposium on Immunological and Clinical Problems of Food Allergy, Ortolani, C. e Wuthrich, B. editores, Basel, Karger, 1996), de modo que, logicamente, a beta-conglicinina pode ser um contribuidor primário para a fração bioativa. Essa possibilidade não foi demonstrada ainda em um estudo de alimentação ou com proteína feita de sojas tendo composições alteradas de proteína.

As subunidades alfa e alfa-prima de beta-conglicinina interagiram especificamente com os componentes membramáticos de células do fígado em seres humanos e animais em experimentos de cultura tecidual (Lovati, M.R. e outros, J. Nutr. 126: 2831-2842). As subunidades de Beta-conglicinina foram incorporadas pelas células do fígado, degradadas e causaram um aumento na ligação máxima de LDL aos receptores de alta afinidade. É proposto que tal mecanismo possa ser responsável pelas propriedades redutores de colesterol de isolados de proteínas de soja. Contudo, não está claro se quantidades significativas de proteínas dietéticas de soja podem extraídas do fígado *in vivo*. Lavarti e outros (J. Nutr. 122: 1971-1978, 1992) relataram em um estudo no qual ratos hipercolesterolêmicos foram

alimentados com glicinina ou beta-conglicinina durante duas semanas. Ambos os grupos mostraram uma redução de 1/3 no colesterol total no soro. Não existem estudos os quais determinam os efeitos de isolados de proteína de soja de sementes de soja com composições modificadas de proteína de soja sobre as propriedades de diminuição de colesterol de isolados de proteína de soja em modelos em animais ou seres humanos.

Foi deduzido de estudos com macacos Rhesus usando-se álcool extraído (o qual remove as isoflavonas) e não álcool extraído de isolados de proteína de soja, que as isoflavonas de soja são componentes primários de isolados de proteínas de soja responsáveis pelos efeitos de diminuição de colesterol (Anthony, M.S., J. Nutr. 126: 43-50, 1996). Contudo, a sujeição das proteínas de soja à extração de etanol não possui qualquer efeito sobre seus efeitos de diminuição de colesterol em outros estudos usando hamsters (Balmir e outros, J. Nutr. 126: 3046-3053, 1996) ou ratos (Topping e outros, Nutr. Res. 22: 513-520, 1980). Os processos de extração de álcool pode extrair algumas proteínas e pode desnaturar e agregar as estruturas únicas das proteínas de soja, provavelmente afetando o modo como elas atuam no trato GI. Por exemplo, Sugano e outros (J. Nutr. 120: 977-985, 1990) observaram que a extração de metanol eliminou completamente a capacidade de peptídeos de proteína de soja de elevado peso molecular de se ligar e excretar esteróides. A alimentação isolada de isoflavonas de soja (genisteína e daidzeína) não teve efeito favorável sobre os lipídios ou lipoproteínas no soro em seres humanos (Colquhoun e outros, Atherosclerosis, 109: 75, 1994; Nestel, P.J., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 3392-3398, 1997).

A confusão acerca dos papéis relativos de vários constituintes de isolados de proteína de soja nos efeitos observados de diminuição de colesterol é difícil de solucionar através do uso de tecnologias de processamento para criar amostras com composição alterada. Uma abordagem aperfeiçoada é modificar especificamente os componentes de interesse nas sementes de soja.

Um indicador chave que surge para o risco de doença cardíaca são os elevados níveis de homocisteína no soro. A metionina dietética é um

precursor para a homocisteína, de modo que um alto consumo de metionina pode aumentar potencialmente o risco dos consumidores de doença cardíaca, especialmente se eles também consomem baixos níveis de ácido fólico e vitamina B6 (McCully, K.S., *The Homocysteine Revolution*, Keats Publishing, Inc., New Canaan, Connecticut, 1997). Outra via que diminui a citotoxicidade endotelial da homocisteína é a reação entre óxido nítrico (NO) e a homocisteína *in vivo* a fim de formar a S-nitroso-homocisteína não tóxica. Essa via pode ser intensificada através do aumento dos níveis dietéticos de arginina devido ao fato de a arginina ser convertida pela sintase de óxido nítrico em NO. Portanto, uma proteína dietética ideal para manutenção de níveis saudáveis de homocisteína deveria ter um elevado teor de arginina e baixo teor de metionina (e cisteína), conforme é encontrado na beta-conglicinina. Contudo, o uso de um isolado de proteína de soja rico em beta-conglicinina projetado para essa finalidade não foi antes divulgado.

Novos ingredientes proteínicos devem contribuir positivamente para o gosto, textura e aparência de alimentos a fim de obter aceitação. Esses atributos de qualidade são determinados pela estrutura das proteínas e como elas se alteram na presença de outros componentes alimentícios (por exemplo, íons de cálcio, outras proteínas) e condições de processamento (por exemplo, temperatura, pH). O aumento no teor de glicinina nas sementes de soja é usualmente proposto para melhora da funcionalidade dos ingredientes de proteína de soja no alimento. Tentativas anteriores para melhorar o rendimento e qualidade dos géis de semente de soja do tipo "tofu" têm sido aumentar determinadas glicininas ou a proporção de glicinina para beta-conglicinina (Wang, C-C. e Chang, S.J., *Agric. Food Chem.* 43: 3029-3034, 1995; Yagasaki, K. e outros, *Breeding Sci.* 46: 11-15, 1996; Murphy, P. e outros, *Food Technology* 51: 86-88, 110, 1997). Existe pouca informação sobre as propriedades da glicinina e beta-conglicinina em outros sistemas modelo de alimentos, especialmente sob condições típicas de outros sistemas de alimentos (por exemplo, baixo pH, elevado teor de sal, gordura, formação de gel em temperaturas abaixo de 72°C). As propriedades de espumação da glicinina são superiores às daquelas da beta-conglicinina em um pH

- de 7,0 e nenhum sal (Yu, M.A., J. Agric. Food Chem. 39: 1563-1567, 1991). Formas de glicinina parcialmente hidrolizadas foram géis induzidos por calor os quais são mais similares à leite coalhado do que a beta-conglicinina parcialmente hidrolizada em um pH neutro (Kamata e outros, Nippon Shokuhin
- 5 Kogyo Gakkaishi 36: 557-562, 1989). A glicinina forma géis na temperatura de ebulição com maior módulo elástico do que o isolado de proteína de soja (Van Kleef, Biopolymers 25: 31-59, 1986). Algumas comparações foram feitas entre a glicinina e beta-conglicinina em um pH de 7,5-8,0 (Shimada, K. e Matsushita, S., Agric. Biol. Chem. 44: 637-641, 1980; Utsumi, S. e Kinsella,
- 10 J. Food Sci. 50: 1278-1282, 1985; Nakamura e outros, Agric. Biol. Chem. 50: 2429-2435, 1986). Embora tenha sido observado que a beta-conglicinina tenha propriedades superiores de emulsificação comparado à glicinina, ela não possui melhores propriedades de emulsificação comparado aos controles de isolado de proteína de soja completos (Aoki e outros, J. Food Sci.
- 15 45: 534-546, 1980; Yao e outros JAOCS 67: 974-979, 1990). As propriedades de congelamento-descongelamento de isolados de proteína de soja ricos em beta-conglicinina e glicinina não foram relatadas, embora o problema da instabilidade ao congelamento-descongelamento da proteína de soja seja conhecido (Abtahi, S. e Aminlari, M., J. Agric. Food Chem. 45: 4768-4772, 1997).
- 20 O germplasma de soja, o qual carece de glicinina, variedades sublinhas B2W(2), B2G(2) e B2G(1) foi recebido do Dr. Norihiko Kaizuma, Presidente da Tohoku University, Morioka, Japão (7/10/96). A mutação dessas linhas de soja foi induzida através do uso de irradiação gama (Odanaka, H. e N. Kaizuma, Japan J. Breed 39 (Supl.) 430-431, 1989; Kaizuma e outros,
- 25 Jpn J. Breed 40 (Suplemento 1) 504-505, 1990). Todas essas linhas carecem das subunidades do grupo I, consistindo em $A_{1a}B_2$, $A_{1b}B_{1b}$ e $A_{2B}1_a$. Foi mostrado que a síntese dos polipeptídeos que faltam é controlada por um alelo único recessivo. Nenhum efeito prejudicial sobre os aspectos fisiológicos, tais como desenvolvimento e germinação da semente, foram observados.
- 30 As propriedades de isolados com elevado teor de beta-conglicinina em um pH de 7 foram discutidas em Nagano, T., J. Agric. Food Chem. 44: 3484-3488. As propriedades de formação de gel a 85°C e as propriedades

de espumação de frações de beta-conglicinina enzimaticamente hidrolizadas foram discutidas em Lehnhardt, W.F. e Orthoefer, F.T., Patente Europeia No. 0072617, 1982. O conceito de alteração das proteínas armazenadas em sementes por meio de métodos transgênicos foi feito por Kinney, A.
5 e outros, Publicação Internacional WO 97/47731, contudo, somente tentativas na eliminação das beta-conglicininas foram feitas e demonstradas.

Os rendimentos da proteína e outros constituintes de soja também precisam ser considerados no planejamento de uma variedade comercialmente viável. Foram encontradas correlações positivas entre o teor total
10 de proteína de soja e a proporção de glicinina:beta-conglicinina, de modo que as sojas que são mais ricas em glicinina tinham um maior teor de proteína (Shui-Ho Cheng, 1984 Tese de Ph.D, Univ. Of IL).

Sumário da Invenção

A presente invenção se refere a uma composição com elevado
15 teor de beta conglicinina a qual possui propriedades físicas (por exemplo, estabilidade e gelificação) e fisiológicas (por exemplo, diminuição de colesterol e triglicerídeos) comparado aos ingredientes comerciais de proteína de soja e a métodos para fabricação da composição com elevado teor de beta-conglicinina. A presente invenção ainda se refere a métodos aperfeiçoados
20 de processamento de alimentos e à fabricação de produtos alimentícios. A presente invenção também inclui métodos para uso da composição com elevado teor de beta-conglicinina como diferentes produtos alimentícios.

Em geral, a presente invenção compreende uma composição de mais do que 40% da proteína como beta-conglicinina (BC) e menos do que
25 10% da proteína como glicinina (composição com elevado teor de BC). A composição com elevado teor de BC isolada através de um processo de precipitação de ácido de sojas com elevado teor de BC desenvolvidas em Illinois, tinha uma soma de cisteína e metionina no isolado da mais do que 25 mg/g de proteína, indo de encontro aos requisitos da FAO.WHO durante
30 2-5 anos. Contudo, a beta-conglicinina em elevado teor feita de sojas com elevado teor de BC desenvolvidas em Porto Rico tinha um elevado teor de arginina (75 mg/g de proteína) e um baixo teor de metionina (menos do que

11 mg/g de proteína).

Um método para fabricação da composição com elevado teor de BC da presente invenção compreende a remoção das cascas de sementes de soja e condicionamento das sementes para formação de flocos. As sementes condicionadas são transformadas em flocos e o óleo é extraído. Os flocos de semente de soja são, então, de preferência, triturados e um solvente é adicionado para levar o pH para uma faixa de cerca de 7,0 a cerca de 10 a fim de dissolver a proteína. Um extrato é produzido através de remoção da fibra por meio de centrifugação e o extrato é neutralizado. Os açúcares e outros solutos de baixo peso molecular são removidos através de acidificação próxima em um pH de 4,6 ou através de ultrafiltração. O extrato ou é tratado por calor antes da remoção (hb) dos solutos de baixo peso molecular ou após remoção (ha) a fim de fazer diferentes tipos de produtos com elevado teor de BC. O produto neutralizado resultante é uma pasta fluida a qual é seca. É ainda concebido que as propriedades benéficas resultantes da nova composição de proteína de sojas com elevado teor de BC também são úteis em aplicações com a soja toda (por exemplo, biscoitos "snacks", sementes cozidas, temperos) e em uma farinha de soja desnatada e com gordura e concentrado de proteína de soja (por exemplo, texturizado) feito para aplicações em padaria, leite (após hidrólise dos componentes fibrosos usando-se celulasas) e em carne. A presente invenção também inclui métodos para uso das composições com elevado teor de beta-conglicinina como diferentes produtos alimentícios.

Descrição Detalhada da Invenção

A fim de proporcionar uma compreensão dos vários termos usados na especificação e reivindicações, as seguintes definições são fornecidas:

Beta-conglicinina: Conforme usado aqui, o termo beta-conglicinina se refere a um trímero com uma massa de peso molecular de 150-200 kDa. As três subunidades principais da beta-conglicinina são alfa-primo (72 kDa), alfa (68 kDa) e beta (52 kDa). As subunidades alfa-primo e alfa contêm duas metades carboidrato covalentemente ligadas e a subunidade beta contém uma. Uma revisão da estrutura e propriedades da beta-conglicinina e outra

proteína principal de armazenamento, a glicinina, é fornecida por Utsumi e outros (em Food Proteins and Their Applications, Damodaran, S. e Paraf, A. Editores, Marcel Dekker, Inc., NY, 1997).

Glicininas do grupo 1: Conforme usado aqui, o termo glicininas do grupo 1 se refere às subunidades de glicinina classificadas como $A_{1a}B_1$, A_2B_1 e $A_{1b}B_2$. As glicininas do grupo 2 são $A_5A_4B_3$ e A_3B_4 (Nielsen, N.C. e outros, Plant Cell 1: 313, 1989). "A" se refere a subunidades ácidas e "B" se refere a subunidades básicas. Os teores dos resíduos de cisteína e metionina são maiores nas subunidades do grupo 1 do que nas subunidades do grupo 2.

Sojas com elevado teor de beta-conglicinina: Conforme usado aqui, sojas com elevado teor de beta-conglicinina (sojas com elevado teor de BC) se refere a sementes de soja tendo mais do que 40% da proteína como beta-conglicinina e menos do que 10% da proteína como glicinina, usando-se os métodos analíticos definidos no Exemplo 1.

Isolado de proteína de soja (SPI): Conforme usado aqui, isolado de proteína de soja é um pó pulverizado a seco feito de sojas contendo não menos do que 90% de proteína ($N \times 6,25$) em uma base isenta de umidade.

Composição de proteína de soja: Conforme usado aqui, o termo composição de proteína de soja se refere a ingredientes alimentícios para seres humanos ou animais os quais contêm proteínas de soja. Exemplos incluem farinha de soja, farinha de soja desnatada, leite de soja pulverizado a seco, "tofu", "tofu" pulverizado a seco, concentrado de proteína de soja, concentrado texturizado de proteína de soja e proteína de soja e isolado de proteína de soja hidrolizado.

Isolado de proteína de soja com elevado teor de beta-conglicinina: Conforme usado aqui, isolado de proteína de soja com elevado teor de beta-conglicinina (BC-SPI) se refere a um pó seco-pulverização o qual é feito de sementes de soja com elevado teor de BC. A quantidade de BC no BC-SPI é maior do que 40% da proteína no isolado e a quantidade de glicinina no BC-SPI é de menos do que 10% da proteína no isolado usando-se os métodos no Exemplo 1.

Composição com elevado teor de beta-conglicinina. Conforme usado aqui, o termo composição com elevado teor de beta-conglicinina ou composição com elevado teor de BC se refere a ingredientes alimentícios nos quais a beta-conglicinina é mais do que 40% da proteína de soja e a glicinina é menos do que 10% da proteína de soja no ingrediente. Exemplos de ingredientes alimentícios para seres humanos ou animais incluem farinha de soja, farinha de soja desnatada, leite de soja pulverizado a seco, "tofu", "tofu" pulverizado a seco, concentrado de proteína de soja, concentrado texturizado de proteína de soja e proteína de soja e isolado de proteína de soja hidrolizado.

Isolado de proteína de soja com baixo teor de beta-conglicinina: Conforme usado aqui, isolado de proteína de soja com baixo teor de beta-conglicinina (baixo-BC-SPI) se refere a um pó seco-pulverização o qual foi feito de sojas carecendo das subunidades alfa-primo e alfa de beta-conglicinina. A subunidade beta da beta-conglicinina está presente no SPI (12% da proteína total).

BC-SPI-ácido-hb: Conforme usado aqui, BC-SPI-ácido-hb se refere a SPI com elevado teor de beta-conglicinina o qual é isolado através de um processo de precipitação de ácido, o qual recebeu um tratamento por calor antes da etapa de precipitação de ácido.

BC-SPI-ácido-ha: Conforme usado aqui, BC-SPI-ácido-ha se refere a SPI com elevado teor de beta-conglicinina o qual é isolado através de um processo de precipitação de ácido, o qual recebeu um tratamento por calor após a etapa de precipitação de ácido.

BC-SPI-UF-hb: Conforme usado aqui, BC-SPI-UF-hb se refere a SPI com elevado teor de beta-conglicinina o qual é isolado através de um processo de ultrafiltração e diafiltração, o qual recebeu um tratamento por calor antes do processo de ultrafiltração.

Cntrl-SPI: Conforme usado aqui, isolado de proteína de soja de controle (cntrl) se refere a um SPI o qual foi feito de uma mistura de sojas (Prospect, HP43 e Harovinton). Cntrl-SPI-ácido-ha se refere ao SPI feito dessas sojas que foi isolado por meio de um processo de precipitação de

ácido, o qual recebeu tratamento por calor após a etapa de precipitação de ácido. Cntrl-SPI-ácido-hb se refere ao SPI feito dessas sojas que foi isolado por meio de um processo de precipitação de ácido, o qual recebeu tratamento por calor antes da etapa de precipitação de ácido.

5 72C ou 90C: Conforme usado aqui, quando as abreviações acima são seguidas por "72C" (por exemplo, BC-SPI-ácido-hb, 72C), o tratamento por calor durante a fabricação do ingrediente foi a 72°C durante 15 segundos. Quando as abreviações acima são seguidas por "90C", o tratamento por calor durante a fabricação do ingrediente foi a 90°C durante 20 segundos.

10 Valor L de Hunter: Conforme usado aqui, o termo "Valor L de Hunter" é a medida da brancura por um colorímetro de Hunter para laboratório.

Valor B de Hunter: Conforme usado aqui, o termo "Valor B de Hunter" é a medida da amarelidão por um colorímetro de Hunter para laboratório.

15 Índice de Solubilidade em Nitrogênio (NSI): Conforme usado aqui, o termo "Índice de Solubilidade em Nitrogênio (NSI)" é a medida da solubilidade da proteína usando-se o Método Ba11-65 da Official and Tentative Methods of the AOCS, 1989, 4ª Edição.

Parcialmente hidrolizado: Conforme usado aqui, o termo "parcialmente hidrolizado" significa que as proteínas da soja foram clivadas em polipeptídeos menores, mas não predominantemente em aminoácidos ou peptídeos com um peso molecular de menos do que 1.000.

Carnes emulsificadas: Conforme usado aqui, o termo "Carnes emulsificadas" significa produtos onde a gordura é dispersa em gotículas e estabilizada por uma rede de proteína tendo uma textura mais macia, tal como salsichas "frankfurters" (cachorro-quente) e bolonha.

25 Barra Nutricional de Alimentos: Conforme usado aqui, o termo "Barra Nutricional de Alimentos" significa uma barra de alimentos projetada para promover a saúde.

30 Sensação na boca: Conforme usado aqui, o termo "sensação na boca" significa como a substância é sentida na boca humana.

Com'l SPI: Conforme usado aqui, SPI comercial (Com'l SPI) se

refere a SPIs os quais podem ser adquirido de fabricantes de SPIs. Conforme usado aqui, Com'l SPI A, B, C, D e G são Supro 760, Supro 974, Supro 670, Supro 500E e Supro 710, respectivamente, da Protein Technologies International, St. Louis, MO. Esses isolados são produzidos para diferentes aplicações. O Supro 760 é recomendado pelas notas de especificação do fabricante para bebidas pasteurizadas, destiladas ou processadas UHT e sobremesas congeladas, patês e iogurte. O Supro 940 é recomendado pelas propriedades de emulsificação e aeração como um substituto da proteína de ovo. O Supro 670 é um isolado de proteína de soja parcialmente hidrolizado recomendado para uso em misturas de bebidas secas, imitação de queijo e barras de alimentos. O Supro 500E é recomendado para aplicações com carnes e o Supro 710 é um isolado de proteína de soja hidrolizado recomendado para cremes líquidos para café requerendo estabilidade ao congelamento/descongelamento, sobremesas congeladas, patês, iogurtes e imitações de queijo. Conforme usado aqui, Com'l SPI E e F são ProFam 974 e Ardex DHV, respectivamente, da Archer Daniel Midland, Decatur, IL. O ProFam 974 é recomendado para substituintes de leite, carnes processadas, carnes emulsificadas e carnes do tipo salsicha.

BBI: Conforme usado aqui, o termo Inibidor da Protease de Bowman Birk (BBI) se refere a uma família de proteínas relacionadas encontradas em muitas sementes de plantas tendo um peso molecular de 7.000 a 8.000, a qual inibe a tripsina e quimotripsina. O menor inibidor (70-80 aminoácidos com 7 ligações de dissulfeto) é altamente estável ao calor; por exemplo, nenhuma grande alteração conformacional foi induzida pelo calor a 80°C durante 1 hora em um pH de 6,5 (Wu, Y.V. e Sessa, D.J., J. Agric. Food Chem. 42: 2136-2138, 1994).

KTI: Conforme usado aqui, o termo Inibidor de Tripsina de Kuintz (KTI) se refere a uma proteína a qual consiste de uma cadeia única de polipeptídeo de 181 aminoácidos e que possui um peso molecular de 21.500. Ela contém dois resíduos de metionina e um quarto de cisteína (Laskowski e Kato, Annual Review of Biochemistry 49: 593-626, 1980).

A presente invenção revela benefícios fisiológicos, bem como de

funcionalidade alimentícia, da composição com elevado teor de BC. A composição com elevado teor de BC da presente invenção possui mais do que os níveis esperados de aminoácidos essenciais. A composição com elevado teor de BC da presente invenção possui propriedades aperfeiçoadas para processamento e produtos alimentícios.

Avaliação do Valor das Proteínas em Alimentos Contendo Gordura

Produtos alimentícios contendo gordura tais como salsichas "frankfurters", queijo processado, molhos para salada, condimentos e bebidas nutricionais dependem de emulsificadores para ajudar a formar gotículas muito pequenas de gordura durante os processos de homogeneização e, então, estabilizar as gotículas contra coalescência (fusão das gotículas) e formação de nata (flutuação para cima) durante armazenamento. As proteínas as quais são emulsificadores especialmente bons possuem estruturas altamente flexíveis as quais permitem elevada afinidade e adsorção das proteínas nas interfaces óleo-água, seguido pela capacidade de formar películas mecanicamente fortes e viscoelásticas e altamente hidratadas sobre as superfícies das gotículas via interações proteína-proteína. Em alguns produtos, a agregação controlada das gotículas de gordura estabilizadas por proteína, seguido por aquecimento ou hidrólise enzimática das proteínas, é importante para formação de estruturas gelatinosas as quais mantêm água e proporcionam textura aos alimentos. As proteínas animais tais como caseínas no leite, lipoproteínas em gema de ovo, miosinas na carne e proteínas de albumina na clara de ovo são bons agentes de emulsificação os quais possuem propriedades de estabilização e formação de gel (Bringe, N., em "Food Proteins and Lipids", Damodaran, S. editor, Plenum Press, NY, páginas 161-181, 1997). A oportunidade da presente invenção é substituir as proteínas animais por ingredientes proteínicos de soja mais econômicos e saudáveis.

O potencial de novas fontes de proteína para substituir proteínas animais como emulsificadores em alimentos pode ser determinado através de medição do diâmetro das gotículas de gordura estabilizadas por proteína as quais são formadas sob condições que quebram as partículas

de gordura em pequenas gotículas. Um bom emulsificador de proteína absorve as novas superfícies óleo-água rapidamente e estabiliza as gotículas contra coalescência, resultando em emulsões tendo os menores diâmetros médios de partícula. Proteínas com baixa emulsificação não cobrem todas as novas superfícies óleo-água e possuem estruturas deficientemente hidratadas as quais não repelem (impedem a agregação com) outras gotículas cobertas por proteínas. Os emulsificadores inferiores de proteína causam a formação de partículas maiores via a agregação gotícula-gotícula e as partículas maiores surgem no espaço com o tempo, levando a uma camada de soro no fundo das suspensões. Os agregados de partículas maiores também são detectados na boca como texturas gredosas ou arenosas. Partículas pequenas não são detectadas na boca como partículas individuais e criam uma textura uniforme ou cremosa (Bringe, N. E Clark, D. Em "Science for the Food Industry of the 21st Century", Yalpani, M. Editor, ATL Press, páginas 51-68, 1993). As medições do diâmetro médio de gotículas oleosas cobertas por proteína são uma medida sensível da estabilidade das proteínas à agregação proteína-proteína sob várias condições e também é relevante para as propriedades de estabilidade ou agregação das proteínas na ausência de gordura. A fim de determinar o potencial dos novos ingredientes proteináceos para substituir outros ingredientes, pode-se preparar emulsões com os ingredientes sob várias condições relevantes para diferentes alimentos e determinar os tamanhos das gotículas formadas e a quantidade de soro criada após armazenamento (Bringe, N. e outros, J. Food Sci. 61: 1-6, 1996). As diferenças relativas nos diâmetros médios de partícula de emulsões estabilizadas por proteínas usadas no presente estudo não se alteraram significativamente durante mais de 10 dias de armazenamento.

Propriedades Funcionais Benéficas da Beta-Conglicinina (Bc) Purificada

Antes que as sojas com elevado teor de BC estivessem disponíveis para testagem, as propriedades da BC purificada foram comparadas à glicina e isolados comerciais em modelos de emulsões de alimentos. Na presente invenção, descobriu-se que a BC formou partículas menores de

emulsão do que os ingredientes de controle e proteína de soja comercial quando as emulsões foram preparadas na presença de sódio iônico (ou potássio) ou cálcio iônico em níveis similares àqueles encontrados em alimentos tais como bebidas nutricionais (veja Exemplo 2). As boas propriedades de emulsificação da BC são importantes para manutenção das emulsões de bebida a partir de separação (creme).

Outros aspectos da invenção incluem as descobertas de que a BC tem um desempenho melhor do que os ingredientes de controle e de proteína de soja comerciais quando as emulsões estabilizadas por proteína foram tratadas por calor ou quando as emulsões foram congeladas e descongeladas conforme descrito no Exemplo 2. Essa propriedade é valiosa em aplicações tal como sobremesas congeladas e cremes líquidos congelados para café onde texturas uniformes homogêneas e a aparência dos produtos dependem da estabilidade das proteínas contra agregação de proteína induzida por congelamento-descongelamento.

Outra concretização da invenção é que as propriedades de formação de viscosidade ou gel induzidas pelo calor das emulsões estabilizadas de BC eram ótimas em um pH próximo de 5,6 e significativamente maior do que os ingredientes de controle e outros de proteína de soja na presença de sal, conforme descrito no Exemplo 2, Tabela 3. O preparo de géis de alimentos a partir de emulsões estabilizadas de BC em uma faixa de pH de 5,4 a 5,8 e baixas concentrações de sal (0,2-0,6% de NaCl ou KCl) pode agora ser concebido e projetado sob a presente invenção. A propriedade de gelificação está na região de pH de carnes emulsificadas onde os ingredientes proteínicos são usados como agentes de gelificação. Produtos vegetarianos semelhantes à carne não estão limitados às formulações com elevado teor de sal e são relevantes para as propriedades de gelificação descobertas da beta-conglicinina sob condições com baixo teor de sal.

Composição de Proteína de Soja

A presente invenção se refere a uma composição com elevado teor de beta-conglicinina, análogos de carne, análogos de queijo, bebidas e alimentos para animais. A escolha da composição de proteína de soja em

particular é, em parte, determinada pelo uso final pretendido e se os outros componentes da soja são desejados (por exemplo, fibra, isoflavonas, oligosacarídeos, pigmentos, enzimas). Por exemplo, o uso comum da farinha de proteína de soja é em produtos de padaria, leite de soja pulverizado a seco e "tofu" pulverizado a seco em barras alimentícias orgânicas e queijos, concentrados texturizados de proteína de soja em produtos de carne e isolados de proteína de soja em bebidas e produtos de queijo. O estado da proteína na composição também é alterado para as várias aplicações. Por exemplo, a proteína desnaturada de soja é desejada para fabricação de algumas carnes emulsificadas, a proteína altamente solúvel é desejada para bebidas e a proteína parcialmente hidrolizada é desejada para queijo. Procedimentos, materiais e métodos adequados relacionados ao preparo da composição de proteína e uso em aplicações alimentícias podem ser encontrados em Liu, KeShun, Soybeans - Chemistry, Technology and Utilization, Chapman & Hall, NY (1997); Erickson, D.R. editor, Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, AOCS Press, Champaign, IL e United Soybean Board, St. Louis, MO (1995); Applewhite, T.H. (editor), Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (1989); Soy Protein Products - Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization, Soy Protein Council, Washington D.C. (1987); Hua, Y.F. e outros, J.A.O.C.S. 73: 1067-1070 (1996); descritos aqui.

Os métodos a seguir divulgados se referem ao uso de isolados de proteína de soja, contudo, aqueles versados na técnica saberão como utilizar outros tipos de composição de proteína de soja (conforme definido nas Definições) na produção dos produtos alimentícios descritos aqui.

BC-SPI

Para tomar vantagem das propriedades da BC nas aplicações acima, um meio econômico de preparo das composições as quais são ricas em BC e carecem de glicinina foi desenvolvido na presente invenção. O uso de sojas com elevado teor de BC as quais contêm menos do que 10% de glicinina e mais do que 40% de BC (Exemplo 4, Tabela 7), possibilita o pre-

paro de BC-SPI sem as ineficiências da remoção de glicininas durante processamento. Os BC-SPIs da presente invenção continham 50-62% de BC comparado a 26-29% em SPI comercial. (Exemplo 4, Tabela 6). Também, o BC-SPI da presente invenção continha aproximadamente 3-6% de glicinina, comparado a 40-45% no SPI comercial (Exemplo 4, Tabela 6).

Sementes de soja com elevado teor de BC foram processadas em BC-SPI através do uso de precipitação de ácido e uma combinação de métodos de ultrafiltração e diafiltração (Lawhon, J., Patente U.S. Nº. 4.420.425, 1983; Koseoglu, S. e Lusas, E., em "Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs, Applewhite editor, Amer. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, páginas 528-547, 1989), conforme descrito no Exemplo 3. Sementes com baixo teor de BC (nenhuma subunidade alfa ou alfa-primo; subunidade beta de BC era 12% da proteína total) também foram processadas em isolado de proteína de soja para comparação em estudos de alimentação com hamsters.

Solubilidade e cor do BC-SPI

As proteínas são solúveis em água quando a repulsão eletrostática e/ou hidratação entre as proteínas é maior do que a força de acionamento para interações hidrofóbicas (Kinsella e outros, em Development in Dairy Chemistry - 4, Fox, P.F. (editor), Elsevier Applied Science, Londres, páginas 55-95, 1989). As moléculas de proteína se agregam para formar partículas coloidais e macrocoloidais quando muitos grupos hidrofóbicos são expostos à água, fazendo com que a água se torne mais estruturada (ligada por hidrogênio) em torno desses grupos e perde a entropia. A força de acionamento primária para a agregação de monômeros de proteína é o aumento na entropia da água, o qual ocorre como regiões predominantemente hidrofóbicas das superfícies de proteína associadas e pares de grupos iônicos dentro desses locais de interação (Bringe, N.A. & Kinsella, J.E., em Development in Food Proteins, Vol. 5, Hudson, B.J.F. (editor), Elsevier Applied Science Publishers LTD, Barking, Inglaterra, páginas 159-194, 1987). Quando proteínas globulares tais como proteínas de soja são aquecidas (70-95°C), as proteínas se expandem crescentemente, expondo mais

aminoácidos hidrofóbicos. Essa desnaturação resulta em quantidades maiores de agregação (Hayakawa, S. & Nakai, S., J. Food Sci. 50: 486-491, 1985). As proteínas também podem ser desnaturadas por outros tratamentos tais como elevada pressão e álcool. A extensão da desnaturação e agregação para um determinado tratamento depende de condições (por exemplo, pH) as quais afetam a estrutura (por exemplo, carga negativa líquida e hidratação) das proteínas. As medidas do tamanho de partícula e solubilidade de proteínas desnaturadas e agregadas variam. Entretanto, a solubilidade de proteínas desnaturadas e agregadas varia. Por exemplo, pode-se resolubilizar parcialmente proteínas desnaturadas e agregadas criadas durante a fabricação do concentrado de proteína de soja através do uso de calor e ação mecânica a fim de transformar as moléculas de proteína fortemente ligadas em agregados que interagem intimamente (Hua, Y.F. e outros, JAOCS 73: 1067-1070).

Composições de proteína branca e altamente solúvel são valiosas para aplicações de mistura de bebidas secas onde mistura em baixo cisalhamento é usada para dispersar o pó (ao invés de homogeneizadores industriais) e onde a cor branca das bebidas lácteas é desejada.

Em uma concretização da invenção, a solubilidade, distribuição de tamanho de partícula e cor do BC-SPI-UF-hb e BC-SPI-ácido-ha eram substancialmente melhores do que BC-SPI-ácido-hb e isolados comerciais (Exemplo 4). Somente o BC-SPI-UF-hb tinha um valor de brancura (L) maior do que 86,5 e um valor de amarelidão (b) de menos do que 10. Somente o BC-SPI-ácido-ha tinha menos do que 10% do volume de partícula maior do que 10 microns após dispersão em água durante 10 minutos.

As porções inferiores de agregados grandes (> 10 microns) nos BC-SPIs reduzem, de modo objetivo, a sensação arenosa na boca em aplicações alimentícias. A elevada solubilidade dos BC-SPIs também se refere às boas propriedades funcionais discutidas abaixo (por exemplo, propriedades de emulsificação, estabilização contra reações de agregação proteína-proteína durante congelamento e descongelamento).

Estabilidade do Bc-SPI em um pH próximo de 6,7, modelo em bebida

Caseinato de sódio é de valor em bebidas devido à sua capacidade de formar e estabilizar pequenas gotículas de gordura e sua resistência às reações de agregação proteína-proteína na presença de cálcio, baixo pH (por exemplo, 5,5-6,5), congelamento e elevadas temperaturas (> 75°C). A presença de capa-caseína em ingredientes de caseína os quais tinham uma região hidratada e negativamente carregada em sua estrutura é amplamente responsável pela estabilidade das caseínas (Bringe, N.A. e Kinsella, J.E., 1991, J. Dairy Res. 58: 195-209). Também é possível que umas poucas proteínas de soja sejam amplamente responsáveis pelas propriedades de emulsificação e estabilidade dos ingredientes da proteína de soja. A carga negativa líquida da beta-conglicina é muito menor do que aquela da glicina, conforme medido pelo pH isoelétrico evidente dos dois complexos de proteína (4,8 e 6,4, respectivamente) (Thanh, V.H. e Shibasaki, K., J. Agric. Food Chem. 24: 1117, 1976; Brooks, J.R. e Morr, C.V., JAOCS 62: 1347, 1985). Portanto, as beta-conglicinas possuem o potencial para imitar as propriedades do caseinato de sódio, especialmente as subunidades alfa da beta-conglicina as quais possuem o menor pH isoelétrico das beta-conglicinas e regiões N-terminais altamente hidratadas (Morita, S. e outros, Biosci. Biotech. Biochem. 60. 1870, 1871, 1996).

As propriedades dos BC-SPIs foram comparados a isolados comerciais de proteína de soja e caseinato de sódio em um sistema modelo de bebida a fim de determinar se um aumento na composição de beta-conglicina em um ingrediente pasteurizado e pulverizado a seco de proteína de soja seria benéfico. Os BC-SPIs se saíram tão bem ou muito melhor do que o controle e SPI's comerciais, dependendo do BC-SPI e das condições (Exemplo 6). Foi descoberto que o BC-SPI-ácido-ha tinha uma estabilidade muito maior contra a agregação induzida por íons de cálcio, agregação induzida por pH (6,5) e agregação induzida pelo calor do que os controles e SPI's comerciais (Exemplo 6). A estabilidade do BC-SPI-ácido-ha contra a agregação, conforme medido pelo diâmetro de partícula da emulsão, era similar à estabilidade demonstrada pela BC purificada (Exemplo 2).

A estabilidade de proteínas de BC-SPI-ácido-ha imita àquela do caseinato de sódio e é útil para aplicações em bebidas, tal como bebidas nutricionais, fórmulas para bebês e leite de soja. Portanto, um aspecto da presente invenção é o desenvolvimento de bebidas e o uso de BC-SPI a fim de se obter boa textura.

A presente invenção também inclui a descoberta de que o BC-SPI da presente invenção possui um grau elevado de estabilidade ao congelamento-descongelamento, a qual era melhor do que aquela do SPI completo e parcialmente hidrolizado comercial, conforme discutido no Exemplo 6. Os ingredientes de Cntrl-SPI-ácido-ha também tinha boa estabilidade ao congelamento-descongelamento. Portanto, um aspecto da invenção é o processo usado para fazer as composições de BC-SPI altamente solúvel e Cntrl-SPI, conforme descrito no Exemplo 3C.

A estabilidade ao congelamento-descongelamento do BC-SPI-ácido-hb foi perdida quando íons livres de cálcio (4 mM) foram incluídos na formação (diâmetro médio de partícula > 100 microns). As emulsões preparadas usando-se BC-SPI-ácido-ha e Cntrl-SPI-ácido-ha mostraram melhor estabilidade (o diâmetro médio das emulsões era de 10 microns após tratamento por congelamento-descongelamento na presença de cálcio, 4 mM e NaCl, 70 mM). Portanto, um aspecto da invenção é o uso de composições de BC altamente solúveis, tal como BC-SPI-ácido-ha, a fim de se obter boa estabilidade ao congelamento-descongelamento.

Propriedades de Espessamento do Bc-Spi em um Ph de 5,8, um Modelo em Carne Emulsificada

Isolados comerciais de proteína de soja são, tipicamente, tratados por calor a 90-154°C durante até 20 segundos durante a fabricação a fim de esterilizar o isolado e desnaturar as proteínas. O tratamento por calor pode facilitar a gelificação dos isolados de proteína de soja em produtos alimentícios onde as temperaturas máximas de processamento do alimento estão abaixo das temperaturas de desnaturação das proteínas de soja originais. Para testar a aplicação do BC-SPI com relação às propriedades de gelificação nas condições de pH, sal e temperatura das carnes emulsifica-

das, comparamos as propriedades de gelificação do BC-SPI com e sem proteínas altamente desnaturadas (a 90°C) com as propriedades de gelificação do isolado comercial e clara de ovo. A clara de ovo é um excelente agente de gelificação usado em numerosos alimentos, incluindo produtos de carne tais como surimi (análogos de pernas de caranguejo). Contudo, da mesma forma que a proteína de carne, a clara de ovo é cara, comparado à proteína de soja. Uma descoberta inesperada da presente invenção foi a de que as viscosidades das emulsões preparadas com BC-SPIs eram 1,7-3,0 vezes maiores do que aquelas preparadas com os SPI's comerciais e eram mais próximas de um desempenho semelhante à clara de ovo (Exemplo 7, Tabela 14). Além disso, as estruturas que mantêm a água formadas pelas interações proteína-proteína entre as superfícies das gotículas de gordura revestidas por proteína eram mais facilmente quebradas nas emulsões estabilizadas pelo BC-SPI do que naquelas estabilizadas pelo isolado comercial, conforme medido pelas maiores diminuições na viscosidade com um aumento no tempo de cisalhamento (Exemplo 7, Tabela 14). Quando essa decomposição ocorre na boca, ela é percebida como uma textura mais desejável, por exemplo, mais uniforme, succulenta e menos rígida. Portanto, as propriedades de gelificação (e ligação relacionada à água e gordura) do isolado de proteína de soja sob as condições de um sistema de carne emulsificada podem ser otimizadas através do uso do BC-SPI.

Uma explicação para os efeitos positivos da desnaturação de composições com elevado teor de BC para forma géis é como segue: composições altamente desnaturadas com elevado teor de BC foram feitas em concentrações diluídas em um pH de aproximadamente 7,0 e 90°C, onde a desnaturação da proteína ocorre para expor os locais reativos, mas a agregação das proteínas desnaturadas é limitada. As maiores viscosidades (ou firmeza ou ligação relacionada à água e gordura) ocorrem quando a proteína desnaturada é exposta a condições as quais são ótimas para a formação de estruturas finas de gel/agregados. Essa condição de gelificação está em um pH próximo de 5,6-6,0 para a BC e a gelificação da BC desnaturada ocorre mais rápido e em temperaturas mais baixas (em ou abaixo da tempe-

ratura de desnaturação da BC original) quando a BC é pré-desnaturada. Os BC-SPIs foram testados, por comparação, com Bc-SPIs altamente desnaturados. A diferença entre as viscosidades das amostras feitas com BC-SPIs não-tratados e aquelas feitas com BC-SPI altamente desnaturado quantifi-

5 cam o valor adicionado pela pré-desnaturação das proteínas de soja usando-se um tratamento por calor elevado. Existe menos valor adicionado pelo SPI normal altamente desnaturado, uma vez que a glicinina forma complexos com a BC, alterando a natureza e quantidade das reações subsequentes de formação de gel (por exemplo, condições ótimas de gelificação são

10 movidas para diferentes valores de pH e existem menos locais não-agregados sobre a BC disponíveis para a formação de gel).

As boas propriedades de emulsificação e gelificação das composições com elevado teor de BC desnaturada requerem uma quantidade significativa de cisalhamento a fim de dissociar e hidratar os agregados de

15 proteína. A presente invenção inclui a descoberta de que sob condições de baixo cisalhamento (sujeição às ondas sônicas durante 20 segundos ao invés de 60 segundos), o BC-SPI-ácido-ha altamente solúvel estabilizou gotículas menores de gordura e, após tratamento por calor da emulsão, formou viscosidades maiores do que os isolados comerciais de proteína de soja

20 (Exemplo 7, Tabela 15). Portanto, as propriedades de emulsificação e ligação do SPI podem ser otimizadas em produtos tais como pedaços revestidos de carne batida através do uso de BC-SPI-ácido-ha mais altamente solúvel (menos desnaturado). As emulsões criadas usando-se ingredientes de Cntrl-SPI-ácido-ha também formaram viscosidades muito maiores em seguida ao tratamento por calor do que os ingredientes comerciais, indicando que

25 o processo usado para fazer as composições de BC-SPI e Cntrl-SPI altamente solúvel, conforme descrito no Exemplo 3C, é um aspecto da invenção.

Propriedades de Espessamento ou Formação de Gel de Bc-Spi-Ácido-Ha em 0,5% de NaCl na Fase Aquosa, um Modelo para Carne Vegetariana e

30 Outros Géis Ácidos

Verificou-se que o BC-SPI-ácido-ha da presente invenção pos-

sui propriedades de formação de gel muito maiores do que os isolados comerciais e um SPI de controle, em um pH próximo de 5,6 e baixa concentração de NaCl (0,5% na fase aquosa). Essas descobertas com relação às suspensões de BC-SPI-ácido-ha aquecida para 70°C ou 80°C (Exemplo 7) reproduzem a descoberta das boas propriedades de espessamento da beta-conglicina pura aquecida para 90°C (Exemplo 2, Tabela 3). O uso da propriedade de espessamento ou gelificação das composições com elevado teor de BC altamente solúvel, tal como BC-SPI-ácido-ha, portanto, é concebido para a fabricação de análogos de carne vegetariana (por exemplo, cachorros-quentes) e outros géis ácidos (por exemplo, análogos de iogurte, recheios em padaria) na faixa de pH de 5,2-5,6.

Composição de aminoácido das BC de soja e BC-SPI

As sojas com elevado teor de BC da presente invenção, surpreendentemente, tinham elevado teor de proteína e teores dos aminoácidos metionina, cisteína, lisina e arginina. (Veja Exemplo 7). Esses aminoácidos são, normalmente, limitativos em sojas e farinhas de soja, especialmente para filhotes de animais e seres humanos (DeLumer, B. e outros, Food Technol. 51: 67-70, 1997). Portanto, um aspecto da presente invenção inclui o uso das sojas com elevado teor de BC para fazer uma farinha de soja (com gordura e desnatada) a qual é rica em aminoácidos essenciais para uso em alimentos para animais, limitando a quantidade de aminoácidos sintéticos que são necessários para fortificar as rações alimentícias. Para realizar os benefícios desses níveis de aminoácido, é concebido que outras modificações na semente ou mistura com fontes de proteína ricas em triptofano são necessárias para impedir que as concentrações de triptofano sejam limitativas.

As composições de proteína de soja com elevado teor de BC feitas pelos processos descritos no Exemplo 3, eram similares, com relação à composição de aminoácidos essenciais, àquelas dos isolados comerciais de proteína de soja ou ricas em aminoácidos de enxofre conforme mostrado. (Veja Exemplo 10). Assim, os usos das composições com elevado teor de BC para vários benefícios fisiológicos e quanto à textura de alimentos não são necessariamente limitados por um desequilíbrio nos aminoácidos es-

senciais. A explicação provável é que as sojas com elevado teor de BC também eram ricas em outras proteínas de soja como parte da compensação para a perda de glicinina e essas proteínas são mantidas nas composições com elevado teor de BC.

5 Propriedades de Diminuição de Colesterol e Triglicerídeos do Bc-Spi

Isolados de proteína de soja foram feitos de sojas as quais incluíam ou as quais não tinham incluídas as subunidades alfa e alfa-primo da BC. Esses BC-SPIs e isolados de controle de sojas normais foram testados com relação às propriedades de diminuição de colesterol e triglicerídeos usando-se hamsters e os métodos publicados (Terpastra, A. e outros, J. Nutr. 121: 944-947, 1991; Potter, S. e outros, J. Nutr. 126: 2007-2011, 1996; Balmir, F. e outros, J. Nutr. 126: 3046-3053, 1996).

Hamsters que consomem a dieta baseada em BC-SPI durante 6 semanas tinham concentrações significativamente menores de colesterol e triglicerídeo do que aqueles alimentados com Cntrl-SPI, Com'l-SPI A ou caseinato de sódio (Exemplo 5; $P < 0,05$). As reduções no colesterol e triglicerídeos no soro quando da dieta com BC-SPI, comparado ao grupo com caseína de sódio, eram de 28% e 73%, respectivamente. A redução no colesterol era amplamente devido a uma redução significativa na fração de colesterol LDL e VLDL ($P < 0,05$). Os hamsters que consumiram a dieta a base de BC-SPI também tinham concentrações totais de colesterol e triglicerídeo no soro menores do que aqueles alimentados com a dieta de BC-SPI. As diferenças nas concentrações totais de colesterol entre os grupos com BC-SPI e baixo teor de BC-SPI não era significativamente diferente ($P = 0,057$). As diferenças nas concentrações de triglicerídeo entre os dois grupos era significativamente diferente ($P < 0,05$). A ingestão do alimento foi reduzida no grupo com BC-SPI por uma média de 16%, comparado às outras dietas contendo isolado de soja e dietas com caseína ($P < 0,02$). Não houve diferença na ingestão de alimentos entre as outras dietas.

Os resultados desse estudo proporcionam nova informação acerca dos componentes ativos no SPI os quais são responsáveis pelas propriedades de diminuição de colesterol e triglicerídeos. As subunidades

alfa e alfa-primo da BC e níveis maiores de isoflavonas não foram requeridos. A ausência das subunidades alfa e alfa-primo da BC no SPI com baixo teor de BC não fez com que esse isolado tivesse propriedades inferiores de diminuição do colesterol ou triglicerídeo. O SPI com baixo teor de BC tinha
 5 2,4-2,8 vezes menos isoflavonas do que o Com'l-SPI A ou Cntrl-SPI, mas causaram as mesmas ou reduções maiores no colesterol e triglicerídeos. A subunidade A3 da glicinina deu origem a uma proteína de ligação ao ácido biliar em seguida à digestão com pepsina pancreática (Iwami e outros, Tanpakushitsu Kenkyukai kaishi 15: 74-80, 1994). Contudo, a quantidade
 10 menor de proteína A3 no BC-SPI (Exemplo 4, Tabela 6) não limita as propriedades de diminuição de colesterol e triglicerídeo do SPI.

Os componentes relacionados à atividade inibitória da tripsina dos SPIs podem ser importantes na determinação nas propriedades de diminuição do colesterol e triglicerídeos dos SPIs. Sustentando isso estão as
 15 regressões lineares entre os teores totais de colesterol e triglicerídeo dos hamsters com a dieta de SPI (Exemplo 5, Tabela 10) e a atividade inibitória de tripsina dos SPIs (Exemplo 4, Tabela 6) que tinham valores R-quadrados de 0,98 e 0,88, respectivamente. Uma explicação possível para os resultados é que a ingestão de alimento apenas contou pelos níveis significativa-
 20 mente menores de lipídio observados no grupo com BC-SPI, comparado aos outros grupos SPI, através de redução da quantidade de gordura e colesterol dietético consumida pelos hamsters. O mecanismo para a redução da elevada atividade inibitória de tripsina retardou a absorção de nutrientes e resultou em uma diminuição na ingestão de alimentos (Schneeman, B.O.,
 25 Am. J. Clin. Nutr. 42: (Supl. 5: 966-972, 1985)). Alternativamente, pode ser que o inibidor de tripsina causasse uma secreção aumentada do fator de satisfação, colecistoquinina (CCK), através da inibição direta da tripsina, conforme encontrado em ratos Zucker (McLaughlin C.L. e outros, Physiol. Behav. 31: 487-491, 1983). Além disso, os SPI's com maior atividade inibitória
 30 de tripsina podem ser digeridos até um ponto menor pela tripsina, resultando em uma maior concentração de fragmentos de proteína de soja os quais podem interagir fisicamente com ácidos biliares e o colesterol no intestino. A

interação com os ácidos biliares reduz a absorção dos ácidos biliares e colesterol associado e aumenta a excreção de colesterol, metabólitos de colesterol, esteróides neutros e ácidos biliares nas fezes. Tal aumento na excreção de colesterol super-regula, provavelmente, a atividade do receptor de LDL apo B/E no fígado a fim de remover o colesterol do sangue e aumenta o fornecimento de colesterol na via de síntese de ácido biliar (Beynen, A.C., J. Nutr. Sci. Vitaminol. 36 (Supl.): S387-S93, 1990). Contudo, a excreção total de esterol neutro (colesterol e coprostanol, o principal metabólito do colesterol intestinal) para todos os grupos experimentais que consomem as dietas contendo isolados de soja era similar uns aos outros e 25% maior do que a excreção de esterol neutro no grupo com caseína (Exemplo 5, Tabela 10). Similarmente, a excreção fecal de ácidos biliares com relação aos hamsters com todas as dietas contendo isolado de soja era 5 vezes maior do que aquela da dieta com caseína, mas não havia diferença na excreção fecal de ácido biliar entre as diferentes dietas contendo isolado de soja. Além disso, as concentrações de colesterol hepático foram reduzidas em 39% em média nos hamsters alimentados com as dietas contendo isolado de soja, comparado à caseína e não haviam diferenças significativas nas reduções do colesterol hepático entre os grupos com soja. Nem a excreção fecal de ácido biliar nem as concentrações de colesterol hepático nos hamsters alimentados com as dietas contendo isolado de soja se correlacionaram com os níveis de colesterol no soro.

A despeito das similaridades no mecanismo evidente de diminuição de lipídios entre os diferentes isolados de proteína de soja, o BC-SPI possuem propriedades de diminuição de colesterol e triglicerídeos significativamente melhores do que o Com'l SPI A. A diminuição de colesterol no soro mais eficaz pelo BC-SPI versus Com'l SPI A não é explicada por um aumento na excreção fecal de ácidos biliares ou esteróides neutros totais, uma vez que o BC-SPI e Com'l SPI A tinham aumentos similares (não significativo) nesses parâmetros (versus caseína). A concentração fecal de colesterol foi aumentada em 54% ($p < 0,05$) no grupo com BC-SPI, comparado ao grupo com Com'l SPI A, ao passo que o coprostanol foi diminuído em

20%, sugerindo uma decomposição reduzida de colesterol no grupo com BC-SPI. Não está claro se essa alteração no metabolismo fecal de colesterol pelo BC-SPI apenas pode ser levado completamente em conta com relação às diferenças observadas no grau de diminuição de colesterol no soro
5 entre os grupos experimentais com BC-SPI e Com'l SPI A (reduções de 28% e 15%, respectivamente, comparado ao grupo com caseína). Portanto, existem outras propriedades únicas do BC-SPI as quais podem ser consideradas com relação às propriedades mais eficazes de diminuição do colesterol e triglicerídeos.

10 O BC-SPI tinha maior atividade inibitória de tripsina devido ao fato de as sojas com elevado teor de BC serem ricas em Inibidor de Bowman Birk (BBI) e níveis maiores desse inibidor de protease estavam re-
tidos no BC-SPI (Exemplo 4, Tabelas 6 & 7). Havia uma relação entre a quantidade de BBI nos SPIs e os teores de lipídio no soro, de modo que
15 também é possível que o teor de BBI, ao invés da atividade inibitória geral de tripsina, seja um fator chave que afeta os níveis de lipídio no soro. O BBI é uma proteína solúvel em álcool e sua extração de soja pode explicar par-
cialmente porque as outras proteínas de soja extraídas de álcool observa-
das são menos capazes de mediar um efeito sobre os parâmetros de lipídio
20 (Kirk e outros, J. Nutr. 128: 954-959, 1998; Anthony, M.S. e outros, J. Nutr. 126: 43-50, 1996). Outra explicação de Sugano e outros (J. Nutr. 120: 977-985, 1990) é que a extração de álcool altera a estrutura das proteínas de soja de
modo que os fragmentos não-digeridos não se ligam mais aos ácidos bilia-
res e causam a excreção de colesterol. Um aspecto da presente invenção é
25 o uso de sojas com elevado teor de BC e ingredientes proteínáceos deriva-
dos de sojas com elevado teor de BC e o uso de BBI em combinação com
proteínas que armazenam soja como suplementos nutricionais para manu-
tenção de níveis saudáveis (baixos) de colesterol e triglicerídeo.

Em aplicações tais como fórmulas para bebês, onde a inibição
30 de protease é indesejável, é concebido na presente invenção que pode-se
usar tecnologias de processamento de soja ou técnicas de manipulação ge-
nética para remover os inibidores e/ou atividades inibitórias.

BC-SPI como uma fonte de BBI anticâncer, peptídeos antioxidantes e peptídeos de ativação da imunidade

O Inibidor de Bowman Birk (BBI) previne ou reduz ou vários tipos de transformações malignas induzidas das células em cultura e de tumores em modelos experimentais em animais (Kennedy, A., J. Nutr. 125: 733S-743S, 1995). Portanto, existe um interesse na identificação de alimentos baseados em soja os quais as pessoas estejam consumindo que conttenham níveis significativos de BBI ativo (Miyagi, Y., J. Nutr. Sci. Vitaminol. 43: 575-580, 1997; Billings, P.C. e outros, Nutr. Cancer 14: 85-93, 1990). O elevado teor de BBI em composições com elevado teor de BC da presente invenção oferece agora uma fonte econômica de material rico em BBI para melhora da composição de BBI em alimentos baseados em soja e redução da necessidade de consumir BBI como um componente isolado em um suplemento ou uma droga. As composições com elevado teor de BC tal como BC-SPIs (Exemplo 4) as quais são feitas de soja com elevado teor de BC, são concebidas na presente invenção para aumento do consumo dietético de BBI para manutenção de tecidos saudáveis (não-cancerosos). Um aspecto da presente invenção é que o teor de BBI do isolado pode ser enriquecido através do uso de ultrafiltração e diafiltração para fazer o SPI (exemplo 4, Tabela 6) Isso contrasta com o controle feito através de ultrafiltração em um pH de 9, onde o BBI não foi retido no SPI (Exemplo 4 Tabela 6). O teor de BBI em cotilédôneas cultivadas de soja também tinha aumentado através da suplementação de metionina e sulfato (Biermann, B.J. e outros, J. Agric. Food Chem. 46: 2858-2862, 1998). Outras tecnologias objetivam a redução do BBI em sojas (Beach, L. e outros, patente internacional número WO 95/27068, 1995).

Estudos de pesquisa os quais avaliam as propriedades saudáveis dos peptídeos encontrados em digestos de proteína de soja revelaram que a beta-conglicina é uma fonte de antioxidante (Chen e outros, J. Agric. Food Chem. 44: 2619-2623, 1996) e peptídeos de ativação de imunidade (Tanaka, M. e outros, Nogei Kagaku Zasshi 68: 341, 1994). Foi descoberto que os peptídeos antioxidantes (LLPH) e de ativação de imunidade (MI-

TLAIPVNLPGR) são encontrados somente em beta-conglicininas. Portanto, é concebido que a composição com elevado teor de BC da presente invenção ofereça uma fonte dietética rica desses peptídeos benéficos para manutenção da saúde.

5 BC-SPI para aplicações com queijo processado

Nas aplicações com queijo processado da presente invenção, BC-SPIs tratados com protease foram usados para criar queijo processado do tipo elástico o qual se decompõe ou um queijo que se pode espalhar. Existem muitas diferenças entre a estrutura das proteínas de caseína e
10 proteínas de soja. Uma diferença chave é que as caseínas primárias (alfa-s1- e beta-caseínas) carecem de cisteína, ao passo que as cinco subunidades de glicinina de soja contêm, cada um, 6-8 cisteínas e as subunidades da beta-conglicinina contêm 0 ou 1 cisteína (Utsumi e outros, em Food Proteins and Their Applications, Damodaran, S. e Paraf, A. editores, Marcel
15 Dekker, Inc., 1997). A beta-conglicinina é mais similar às caseínas a esse respeito do que a glicinina, de modo que poucos defeitos causados pelos grupos enxofre são prováveis no queijo carecendo de glicinina (por exemplo, aromas baseados em enxofre, agregados de proteína ligados por dissulfeto os quais retêm a água e criam uma textura succulenta).

20 Outra diferença chave entre as proteínas de caseína e as proteínas de soja é que as caseínas são fosforiladas. Os grupos fosfato das proteínas de caseína servem a dois papéis. O primeiro papel em queijo natural é tornar as proteínas de caseína insolúveis na presença de cálcio em seguida à adição da enzima quimosina, a qual cliva especificamente capcaseína. O segundo papel é resolubilizar ou hidratar as caseínas em
25 seguida à acidificação pelas culturas bacterianas e remover a água (soro). Em um pH menor, o cálcio é liberado das fosfoproteínas e os grupos fosfato hidratados limitam as interações proteína-proteína. No queijo processado, o pH não tem de ser diminuído de forma a solubilizar as caseínas, devido ao
30 fato de vários sais de fosfato serem adicionados, os quais quelam os íons de cálcio. A natureza limitada das interações caseína-caseína em um pH de 5,1-6,0 e em elevadas temperaturas de preparo, reduzem a ligação à água

e, conseqüentemente, a viscosidade da emulsão óleo-em-água estabilizada por proteína e permite que as caseínas fluam conforme demonstrado pelas propriedades de fusão e estiramento do queijo. As caseínas solubilizadas também servem a um papel crítico como agentes de emulsificação em queijo processado, o que impede a separação da gordura durante cozimento.

A beta-conglicinina é uma glicoproteína a qual contém carboidratos covalentemente presos. Esses carboidratos os quais continuam hidratados no pH do queijo, limitam as interações proteína-proteína entre as proteínas de BC. A solubilidade das proteínas de BC no pH do queijo pode ser ainda melhorada através da hidrólise parcial da BC usando-se uma enzima tal como Alacalase (Novo Nordisk) e essa alteração na estrutura e propriedades da proteína resultou em propriedades aperfeiçoadas quanto à fusão do análogo de queijo processado feito com BC-SPI (30% da proteína de queijo) (Exemplo 11). As propriedades de fusão do análogo de queijo processado contendo SPI normal também são melhoradas através de hidrólise parcial (Kim, S. e outros, JAOCS 69: 755-759). A remoção de proteínas adicionais ricas em cisteína das composições com elevado teor de beta-conglicinina também melhoraria as propriedades da BC hidrolizada no queijo processado.

O BC-SPI também foi hidrolizado usando-se uma enzima denominada Flavourzyme (Novo Nordisk). O uso desse produto (30% da proteína de queijo) em combinação com caseína reumedecida, criou uma alteração mais dramática na textura do análogo de queijo processado (exemplo 11). Esse queijo era de aparência sofisticada, com uma capacidade muito boa de ser espalhado e uniforme com relação à textura, similar a uma pasta de queijo ou queijo cremoso. O queijo tinha um sabor apenas suave de soja. O bom gosto do queijo é um resultado, em parte, às baixas quantidades de aldeídos presentes nas composições com elevado teor de BC usadas para fazer o queijo. A composição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no BC-SPI-ácido-ha 72C e BC-SPI-ácido-ha 90C eram de 0,522 e 0,688 mg de malondialdeído/kg, respectivamente. Esses são valores similares ou menores do que aqueles dos SPIs comerciais que foram testados (por exem-

plo, o Com'l SPI E tinha um valor de TBA de 0,771 mg/g). Os testes de TBA foram feitos no Ralston Analytical Laboratories, St. Louis, MO, seguindo Yu, T.C. e Sinnhuber, R.O., J.A.O.A.C. 44: 256-258, 1967. Um aspecto da presente invenção é a descoberta de que o uso de BC-SPI tratado enzimaticamente pode ser usado para criar um produto de queijo capaz de ser espalhado com um gosto bom contendo pelo menos 30% da proteína como proteína de soja e menos do que 48% de umidade.

Na presente invenção, é ainda concebido que a hidrólise parcial da BC é valiosa para a criação de texturas únicas de alimentos baseados em soja em virtude de ser possível clivar especificamente as proteínas de BC a fim de formar fragmentos de 30 kDa. (Kawai e outros, Biosci. Biotech. Biochem. 61: 794-799, 1997).

Proteína com Baixo Teor de Metionina, Elevado Teor de Arginina para Homocisteína

A metionina derivada de proteínas dietéticas serve como uma das principais fontes para a biossíntese de aminoácidos de enxofre, incluindo homocisteína. A homocisteína é um fator de risco chave de doença cardiovascular. O consumo prolongado de dieta com baixo teor de metionina, portanto, reduzirá ou pelo menos manterá o nível de homocisteína no plasma.

A arginina, por outro lado, é o substrato natural para a síntese de óxido nítrico, o qual converte arginina em citrulina e óxido nítrico (NO).

A citotoxicidade endotelial da homocisteína é modulada pela presença de NO; o NO e a homocisteína reagem sob condições fisiológicas a fim de formar a S-nitroso-homocisteína não tóxica. Além disso, o NO é um mediador vascular importante, liberado continuamente pelas células endoteliais no estado basal. No modelo com coelhos hipercolesterolêmicos, a suplementação dietética com L-arginina reduz a formação de ateroma, melhora a dilatação dependente de endotélio, diminui a agregação plaquetária e a adesão de monócitos ao endotélio aórtico. Também foi mostrado que a suplementação com L-arginina inibe a agregação plaquetária em adultos jovens saudáveis através da via de óxido nítrico. Em seres humanos hipercolesterolêmicos, foi mostrado que a suplementação com L-arginina melhora o

vasorrelaxamento dependente do endotélio. Além disso, o óxido nítrico, o qual é conhecido por servir como uma realimentação negativa para o fator do desenvolvimento endotelial vascular (VEGF), tem um benefício adicional na prevenção da angiogênese e metástase. Assim, com esses benéficos conhecidos para a saúde da liberação contínua de baixos níveis de óxido nítrico, na presente invenção, uma proteína de soja contendo elevado teor de arginina e baixo teor de metionina é usada como uma abordagem natural para desintoxicar a homocisteína e representa uma alternativa viável e atraente para a terapia corrente do uso de suplementos vitamínicos. O preparo desse aspecto da invenção é discutido no Exemplo 12.

Ingrediente de Proteína com Baixo Teor de Aminoácido de Enxofre para Reduzir os Riscos de Câncer e Osteoporose

A metionina exerce um papel metabólico crítico no desenvolvimento de tumor através da promoção da síntese de proteína e proliferação celular. Assim, o menor teor de metionina das proteínas de soja comparado às proteínas animais tal como caseína contribui para a inibição da tumorigênese através das proteínas com baixo teor de metionina tal como o isolado comercial de proteína de soja (Hawrylewicz, E. e Huang, H., em "Dietary Proteins, How They Alleviate Disease and Promote Better Health", Liepa, G. editor, Amer. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, páginas 123-150, 1992). O uso de uma composição com elevado teor de BC contendo ainda menos metionina da presente invenção (Exemplo 12) em aplicações alimentícias com elevado teor de proteína ainda melhorará a segurança do consumo de alimentos com elevado teor de proteína.

A composição de proteína em nossa dieta também influencia a saúde dos ossos através de influência sobre nossa retenção de cálcio dietético. A maior excreção de cálcio urinário em indivíduos sob dieta com proteína animal está relacionada ao maior teor de aminoácidos contendo enxofre (Breslau, N. e outros, J. Clin. Endocrinol. Metab. 66: 140-146, 1988) e está relacionada à maior incidência de fraturas do quadril em mulheres que ingerem maiores quantidades de proteína animal (Abelow, B. e outros, Calcif. Tissue Int. 50: 14-18, 1992). Um dos mecanismos envolvidos é como

- segue: o enxofre é oxidado em sulfato *in vivo*, o que gera uma carga fixa de ácido que é amortecida pelos ossos, resultando em dissolução óssea. O baixo teor de aminoácidos de enxofre de uma composição com elevado teor de beta-conglicina que possui um baixo teor de metionina é benéfico na
- 5 prevenção da osteoporose, câncer e doença cardíaca.

Aplicações Funcionais em Alimentos

- Os benefícios fisiológicos acima da beta-conglicina para aplicações funcionais em alimentos não foram reconhecidos por aqueles que desenvolvem produtos alimentícios. Novas composições com elevado teor
- 10 de beta-conglicina, as quais são agora possíveis de acordo com a presente invenção, são usadas para fazer bebidas e análogos de carne e queijo com textura, aroma, cor e qualidade nutricional aperfeiçoadas.

Modificações Adicionais

- A presente invenção inclui modificações adicionais das sojas
- 15 ricas em beta-conglicina e proteínas de beta-conglicina as quais ainda ampliam a eficácia de fabricação do isolado e utilidade das composições com elevado teor de BC. Exemplos incluem o seguinte: 1) redução da quantidade de proteínas não-armazenáveis na soja a fim de aumentar os rendimentos da beta-conglicina; 2) adição de traços de lipoxigenase-null única,
- 20 dupla, tripla ou quádrupla para reduzir o desenvolvimento de aroma durante a fabricação das composições com elevado teor de beta-conglicina; 3) redução no teor de ácido linoléico e linolênico na soja, por exemplo, através do aumento de ácido oléico ou esteárico, a fim de reduzir o desenvolvimento de aroma durante a fabricação das composições com elevado teor de beta-
- 25 conglicina; 4) modificação das quantidades de subunidades alfa, alfa' e beta da beta-conglicina a fim de se obter vários benefícios (por exemplo, reduzir a alergenicidade, melhorar a solubilidade) através do uso da super-expressão de subunidades específicas ou antimensageira de subunidades específicas ou modificação das estruturas de subunidades em particular
- 30 através do uso de mutagênese local-dirigida; 5) hidrólise enzimática parcial do isolado rico em beta-conglicina usando-se diferentes enzimas e condições a fim de melhorar a solubilidade da proteína, propriedades do análogo

de queijo, propriedades de gelificação e espumação; e 6) fosforilação ou desamidação enzimática das proteínas de beta-conglicinina a fim de melhorar a solubilidade e propriedades funcionais relacionadas.

A soja com elevado teor de beta-conglicinina, baixo teor de glicinina também é obtida através de engenharia genética. A beta-conglicinina e as glicininas são codificadas por famílias múltiplas de genes na soja. Esses genes são regulados por fatores de transcrição e outras proteínas regulatórias. A transformação eficiente da soja permite a introdução de genes mensageiros e antimensageiros no genoma da soja. O antimensageiro contra os genes de glicinina é uma forma eficaz de diminuição do nível de glicinina. As seqüências apropriadas de nucleotídeo do cDNA de glicinina do grupo 1 podem ser obtidas de banco de dados com tag (EST) de expressão em semente de soja e clonadas na orientação antimensageira em um cassete de expressão de semente. Essas estruturas podem ser usadas para gerar plantas transgênicas de soja que podem ser selecionadas quanto à expressão reduzida de glicinina do grupo 1. As seqüências de gene das glicininas do grupo 1 são descritas por Nielsen e outros (Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development, Eds. B. Larkins e I. Vasil editores, Kuwer Academic Publishers (1997)). A informação publicada ou aquela do banco de dados EST pode ser usada para isolar os genes de glicinina do grupo 1 de interesse e esses genes podem ser apropriadamente truncados para co-supressão do grupo 1 em sojas transgênicas. Também é possível diminuir o nível de glicinina através da co-supressão da expressão do gene de glicinina com um promotor de glicinina ou RNA mensageiro de glicinina. Fatores de transcrição e outras proteínas regulatórias que controlam a expressão da glicinina podem ser manipulados a fim de se obter sojas com um teor menor de glicinina. Os fatores de transcrição e outras proteínas regulatórias podem ser identificados através de clonagem baseada em mapeamento usando-se o mutante de soja com baixo teor de glicinina. A redução no acúmulo de glicina nas novas variedades de soja está, provavelmente, associada com um aumento simultâneo de beta-conglicinina nos mutantes com baixo teor de glicinina. Pode-se também aumentar os níveis de beta-

conglucina (diminuindo simultaneamente os níveis de glicina) através da superexpressão de fatores de transcrição ou outras proteínas regulatórias específicas ao gene da beta-conglucina que possuem um efeito positivo ou através da repressão mediada por RNA antimensageiro de proteínas regulatórias que possuem um efeito negativo sobre a expressão da beta-conglucina. O maior nível de uma subunidade ou subunidades em particular de beta-conglucina também pode ser obtido através de manipulação dos genes que codificam essas subunidades sob o controle de promotores semente-específicos. Isso permite o aumento específico das subunidades desejadas de beta-conglucina. Formas mutantes de beta-conglucina que têm funcionalidade intensificada também podem ser manipuladas *in vitro* e introduzidas na soja usando-se tecnologia transgênica.

Raios gama podem ser usados para gerar uma população de mutantes de soja. Essa população pode ser selecionada quanto à ausência ou diminuição dos níveis de proteínas de glicina do grupo 1 nas sementes ou mutações físicas nos genes de glicina do grupo 1 através de estratégias de mapeamento genético.

Métodos similares podem ser usados para eliminar os inibidores de protease de Kunitz e/ou Bowman em sojas com elevado teor de BC.

Procedimentos e métodos adicionais são bem conhecidos na técnica. Procedimentos, materiais e métodos adequados para tecnologia antimensageira podem ser encontrados em Burkle, L., Hibberd, J.M., Quick, W.P., Kuhn, C., Hirner, B., Frommer, W.B., *Plant Physiol.* 118(1): 59-68 (1998); Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J., Boudet, A.M., *Plant J.* 13(1): 71-83 (1998); e Temple, S., Bagga, S., Sengupta-Gopalan, C., *Plant Mol. Biol.* 37(3): 535-47 (1998). Procedimentos, materiais e métodos adequados para a tecnologia de co-supressão podem ser encontrados em: Palauqui, J.C., Vaucheret, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(16): 9675-80 (1998); Que, Q., Jorgensen, R.A., *Dev. Genet.* 22(1): 100-9 (1998); de Carvalho, Niebel, F., Frendo, P., Van Montagu, M., Cornelissen, M., *Plant Cell* 7(3): 347-58 (1995).

Procedimentos, materiais e métodos adequados relacionados ao

preparo de ingredientes de proteína e uso em aplicações alimentícias podem ser encontrados em Liu, KeShun, Soybeans - Chemistry, Technology and Utilization, Chapman & Hall, NY (1997); Erickson, D.R. editor, Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization, AOCS Press, Champaign, IL and United Soybean Board, St. Louis, MO (1995); Applewhite, T.H. (editor), Proceedings of the World Congress of Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (1989); Soy Protein Products - Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization, Soy Protein Council, Washington D.C. (1987); Damodaran, S. e Paraf, Alain, Food Proteins and Their Applications, Marcel Dekker, Inc. NY (1997); Gueguen, J. e Popineau, Y. editores, Plant Proteins from European Crops, Springer-Verlag, NY, 1998; Kolar, C.W. e outros, J. Amer. Oil Chem. Soc. 56: 389-391 (1979); Fukushima, D., Food Rev. Int. 7: 323-351 (1991); Hoogenkamp, H.W., Vegetable Protein Technology Value in Meat, Poultry & Vegetarian Foods, (1992); Fox, P.F., Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2, Major Cheese Groups, páginas 339-383 (1987); Mead, G.C. 1989, Processing of Poultry, Elsevier Appl. Sci. NY; Forrest, J.C. e outros, 1975, Principles of Meat Science, W.H. Freeman Co., San Francisco; Wilson, L.A., Amer. Oil Chem. Soc. (1995) e Hua, Y.F. e outros, J.A.O.C.S. 73: 1067-1070 (1996), todos os quais são incorporados aqui por referência.

Exemplos

Os exemplos a seguir são proporcionados a fim de ilustrar a presente invenção e não são destinados a limitar a invenção além das limitações apresentadas nas reivindicações em anexo. Aqueles exemplos que se referem ao uso de isolados de proteína de soja são exemplificativos somente e aqueles versados na técnica saberão qual composição de proteína de soja em particular da presente invenção poderia ser usada na produção dos produtos alimentícios descritos aqui.

Exemplo 1

30 Eletroforese em gel SDS-PAGE de Sojas e Isolados de Proteína de Soja

1) Pesar 5 mg de amostra com teor conhecido de proteína determinado por kjedahl (proteína = nitrogênio x 6,25) e colocá-la em um tubo

para microcentrifuga de 650 microlitros.

2) Adicionar solução de solubilização de amostra de SDS (contendo 10% de glicerol, 2,3% de SDS, Tris a 0,0626 M, pH de 6,8, 5% de 2-mercaptoetanol, 0,05% de Azul de Bromofenol) até um teor final de proteína de 4 mg/mL.

3) Fechar os tubos e, no caso de amostras de SPI, colocar no agitador durante 20 minutos. Colocar em um banho de água em ebulição durante 10 minutos.

4) Esfriar as amostras para a temperatura ambiente.

5) Girar as amostras na microcentrifuga ($\sim 14.000 \times g$) durante 10 minutos.

6) Recuperar o flutuante.

7) Carregar 5-8 microlitros (20-30 microgramas de proteína).

Condições para operação/coloração:

1) Todos os géis tinham sido fundidos em 10-20% da acrilamida total (T) e 2,67% de géis de Laemmli que tinham 0,75 mm de espessura. Os géis foram fundidos e manipulados usando-se o sistema Bio-Rad Protean II xi o qual cria géis que são de aproximadamente 16 cm x 16 cm.

2) Os géis empilhados foram fundidos com 15 cavidades e as amostras não foram manipuladas em outras colunas. Padrões de peso Bio-Rad Broad Molecular foram carregados sobre cada lado do gel a ser usado para determinação do peso molecular evidente.

3) Os géis foram manipulados usando-se voltagem constante (60-100 volts durante a noite) ou corrente constante (15-30 mA/gel durante 6-8 horas).

4) Os géis foram fixados em ácido tricloroacético a 12,5% durante pelo menos 1 hora em temperatura ambiente.

5) Os géis foram removidos do TCA e rapidamente enxaguados em água desionizada. Eles foram colocados em Solução coloidal de Coomassie A (11% de sulfato de amônio/2% de ácido fosfórico) durante 1 hora em temperatura ambiente, então, colocados em solução de coloração composta de 160 ml de solução A, 40 ml de metanol e 4,2 ml de solução B (1 gm

de Coomassie G250 em 20 ml de água desionizada).

6) Os géis foram corados em temperatura ambiente nessa solução durante pelo menos 16 horas (>24 é melhor), então, eles foram enxaguados com água desionizada e colocados em ácido acético a 7% a fim de lavar os vestígios que existissem da coloração anterior. Nesse ponto, os géis estavam prontos para formação de imagem ou fotografia.

As imagens digitais dos géis corados com Coomassie foram geradas usando-se um dispositivo com uma câmera com carga acoplada Kodak Videk Mega-plus (CCD) e software de exploração incluído com um sistema de análise Biolumage Visage 2000 Image. A câmera CCD gerou imagens digitais as quais eram de 1024 x 1024 pixels, com valores digitais de 256 representando uma faixa de densidade óptica. Durante o processo de aquisição de imagem, o sistema foi calibrado com relação ao tamanho de pixel e valores digitais. Os géis foram escaneados usando-se luz transmitida, uma lente de 17 mm, filtros com densidade neutra de 2 e um filtro amarelo a fim de intensificar o contraste da coloração de Coomassie.

A análise das imagens digitais foi realizada usando-se o software de análise Biolumage Whole Band. Com esse software, o analista proporcionou colunas limites e o software identificou as bandas, então, gerou seus limites em uma base automática. O analista tinha a capacidade de remover a banda limite que falhava em representar a banda e a capacidade de ajudar na determinação da colocação de limites através de indicação dos eixos principais da banda. Esse método controla as bias do analista através da aplicação dos mesmos algoritmos ao processo de determinação de limites. Também era possível para o analista definir manualmente (desenhar) os limites da banda, mas essa abordagem foi usada somente onde todas as outras abordagens falharam (tipicamente menos do que 2% das bandas). O software da banda toda quantificou as bandas individuais somando-se os valores digitais para todos os pixels dentro dos limites da banda, gerando um valor conhecido como densidade óptica integrada ou IOD. Padrões de peso molecular comerciais (Bio-Rad Broad Molecular Weight Standards Catálogo #161-0317) manipulados em colunas individuais sobre o mesmo

gel foram usados para determinar o peso molecular evidente das bandas nas amostras. As bandas individuais podem ser denominadas pelo analista a fim de auxiliar em sua identificação sobre a lista de bandas.

Os resultados da análise da imagem foram apresentados na forma tabular conhecida como uma "lista de banda". A lista de banda contém os dados agrupados por colunas, incluindo o número de bandas (numerado de cima da coluna para baixo), nome da banda, IOD da banda, IOD % (% de todo material quantificado na coluna representada por essa banda) e peso molecular. Cópias da tela no computador foram impressas como "blocos de telas". Blocos de telas foram gerados mostrando a imagem digital do gel sem anotação no lugar, com os centros das bandas quantificadas indicados por uma linha pontilhada e com anotação completa mostrando os limites da coluna, nomes da coluna, centros da banda, limites da banda e padrões de peso molecular.

15 Exemplo 2

Diâmetro médio de partícula e viscosidade da BC purificada, isolado de proteína de soja de laboratório e proteína comercial

Isolados comerciais de proteína de soja, Supro 760 (Com'l SPI A) e Supro 940 (Com'l SPI B) foram obtidos da Protein Technologies International, St. Louis, Missouri. O concentrado comercial de proteína de soja, Promine DS (Com'l SPC) foi obtido da Central Soya Company, Inc., Fort Wayne, Indiana. Isolado de proteína total (Lab. SPI) foi preparado de acordo com o método de Boatright, W.L. e outros, J. Amer. Oil Chem. Soc. 72: 1439-1444 (1995), exceto que éter de petróleo foi usado para extrair a gordura. Emulsões contendo proteína (1% de proteína), óleo de amendoim (10%), sacarose (5% na fase aquosa), NaCl (70 mM, 0,4% na fase aquosa) e CaCl₂ onde indicado (4 mM), foram preparadas através de sujeição às ondas sônicas (160 watts, 60 segundos) e as medições do diâmetro médio de partícula foram determinadas usando-se um instrumento de difração por luz a laser mastersizer Malvern. Um reômetro Bohlin VOR foi usado para determinar a viscosidade das amostras tratadas por calor (taxa de cisalhamento de 14,6 1/segundo, 5 minutos, 5°C). As emulsões foram congeladas

(4 dias, - 14°C) e descongeladas ou tratadas por calor (20 mL em frascos de vidro submersos em um banho de água a 90°C durante 60 minutos).

- Os menores diâmetros de partícula das emulsões congeladas-descongeladas ou tratadas por calor preparadas com caseinato de sódio e beta-conglicinina demonstram o potencial de beta-conglicinina para substituir o caseinato de sódio em aplicações em emulsão em um pH próximo de 6,7, tal como bebidas nutricionais e cremes para café, conforme mostrado na Tabela 1.
- Tabela 1. Diâmetros médios de partícula de emulsões estabilizadas por beta-conglicinina purificada, isolado de proteína de soja de laboratório e ingredientes comerciais de proteína

Proteína	<u>Diâmetro médio de partícula (microns)</u>			
	<u>0,4 % NaCl</u>		<u>0,4% NaCl, 4 mM CaCl₂</u>	
	pH 6,0-6,1	pH 6,6-6,8	pH 6,0-6,1	pH 6,6-6,8
Caseinato de sódio	1,0	-	1,1	1,1
Beta-conglicinina	1,2	1,2	9,8	3,4
SPI Lab.	14,2	2,2	36,3	14,1
Com'l SPI A	30,0	1,6	69,1	61,9
Com'l SPI B	82,7	56,0	89,2	81,8
Com'l SPC	46,6	44,6	49,7	60,4

Tabela 2. Diâmetro médio de partícula de emulsões tratadas por calor ou congeladas-descongeladas estabilizadas por beta-conglicinina purificada, isolado de proteína de soja de laboratório e ingredientes comerciais de proteína, 0,4% de NaCl, 5% de sacarose

Proteína	<u>Diâmetro médio de partícula (microns)</u>			
	<u>Tratada por calor</u>		<u>Congelada-descongelada</u>	
	pH 6,0-6,1	pH 6,6-6,8	pH 6,0-6,1	pH 6,6-6,8
Caseinato de sódio	1,0	-	1,0	-
Beta-conglicinina	3,1	1,4	4,0	13,8
SPI Lab.	39,1	11,5	55,0	88,0
Com'l SPI A	34,9	1,9	83,9	75,3
Com'l SPI B	72,4	49,9	111	104
Com'l SPC	47,7	49,9	111	98,8

Tabela 3. Viscosidade de emulsões tratadas por calor estabilizadas por beta-conglicinina purificada, isolado de proteína de soja de laboratório e ingredientes comerciais de proteína, 0,4% de NaCl, 5% de sacarose

pH	Proteína				
	Beta-conglicinina	SPI Lab.	Com'l SPI A	Com'l SPI B	Com'l SPC
	mPas	mPas	mPas	mPas	mPas
6,6	50	180	60	70	230
6,1	60	650	270	50	140
5,6	1.490	270	110	30	110
5,0	120	30	70	-	100

Exemplo 3

5 Preparo de planta piloto com elevado teor de BC-SPI, baixo teor de BC-SPI e Contrl-SPI

A. Remoção de gordura de sojas

1. Ajustar as sojas para uma umidade de cerca de 10% e temperar em temperatura ambiente.
- 10 2. Quebrar as sojas através do uso de um triturador.
3. Descascar as sojas quebradas através do uso de um Aspirador Kice.
4. Condicionar as sojas quebradas e descascadas a 50-60°C usando-se um forno.
- 15 5. Transformar as sojas condicionadas em flocos usando-se um Triturador para Formação de Flocos.
6. Extrair os flocos de soja com hexano.
7. Extrair o solvente da desnatada em uma coifa de laboratório durante três dias.
- 20 8. Os flocos da etapa 7 foram triturados a fim de fazer a farinha usada na seção C abaixo.

B. SPI-ácido-hb e etapas 1 e 2 para SPI-UF-hb

- BC-SPI-ácido-hb (ácido hb = calor antes de precipitação de ácido) e SPI-ácido-hb com baixo teor de BC foram processados conforme descrito abaixo. Cntrl-SPI-ácido-hb usou o processo descrito na seção C abai-
- 25

xo, exceto a proteína de C2 foi ajustada a pH 7,0 e tratada com calor (72°C, 15 segundos) antes de C3. não houve tratamento com calor em C6.

1. Água foi adicionada a um tanque com camisa de 200 litros e ajustado para 27-35°C e pH de 8,5-9,0 usando NaOH a 20%. Flocos de soja desnatada foram adicionadas e misturadas com um agitador equipado com dois propulsores e um misturador in-line com 3 estágios o qual foi adaptado com rotores fino, médio e grosso. O misturador in-line com uma circulação de loop fechado foi usado no decorrer do processo de extração a fim de reduzir o tamanho de partícula dos flocos e melhorar a extração de proteína. A proporção de água para soja era de 10/1 (peso/peso). O pH da pasta fluida foi reajustado para um pH de 8,5-9,0 se o pH da pasta fluida estava abaixo de 8,5.

2. A proteína de soja solubilizada foi recuperada da pasta fluida de extração por meio de centrifugação (25-35°C), primeiro com um decantador a fim de remover a maioria dos sólidos gastos, seguido por clarificação do líquido contendo proteína em uma centrífuga com disco de não sedimentação em uma taxa de alimentação de 250-500 kg/hora.

3. O pH da solução de proteína clarificada foi ajustado para 6,8-7,0 usando-se ácido clorídrico a 6%. A solução de proteína foi tratada por calor a 72°C durante 15 segundos ou a 90°C durante 20 segundos usando-se uma placa e um permutador de calor e esfriada para 25-35°C.

4. A solução de proteína pasteurizada foi ajustada para um pH de 4,5 +/- 0,1 através da adição de ácido clorídrico (12%) e deixada reagir durante 30 minutos a 30-35°C.

5. A proteína precipitada foi recuperada usando-se uma centrífuga com disco de não sedimentação em uma taxa de alimentação de 200-400 kg/hora e um intervalo de não sedimentação de 3 minutos.

6. A coalhada de proteína foi lavada durante 10-30 minutos, duas vezes usando-se água acidificada (pH de 4,5 +/- 0,1, 30-35°C). A proporção de água de lavagem para sólidos acondicionados a úmido era de 5:1 (peso/peso). Quaisquer grumos na coalhada foram decompostos usando-se um misturador in-line. A coalhada de proteína foi recuperada usando-se uma centrífuga com disco de não sedimentação em uma taxa de alimenta-

ção de 350-450 kg/hora após cada lavagem.

7. A coalhada lavada foi misturada com hidróxido de sódio diluído (0,5%) para neutralizar (pH de 7,0-7,2), diluída com água até 12-15% de sólidos (de preferência 15% de sólidos) e reajustada para um pH de 7,0-7,2.

5 Uma mistura in-line homogeneiza a pasta fluida antes de secagem por pulverização. A solução de proteína foi armazenada a 4°C ou resfriada tão logo possível antes de secagem por pulverização usando-se um permutador de calor.

8. A solução de proteína homogeneizada e neutralizada foi ajustada a 45-55°C e foi seca por pulverização usando-se uma temperatura de ar de entrada de 180-185°C, temperatura de ar de saída de 85-90°C.

C. SPI-ácido-ha

1. Água foi adicionada a um tanque com camisa de 300 litros e ajustada para 55°C e pH de 9,0-9,5 usando NaOH a 30%. Flocos de soja desnatada foram adicionadas e misturadas com um misturador do tipo propulsor ajustado para um ajuste de velocidade elevada (1725 rpm). A proporção de água para farinha de soja era de 12/1 (peso/peso). O tempo de extração foi de 45 minutos.

2. A proteína de soja solubilizada foi recuperada da pasta fluida de extração através do uso de uma centrífuga com disco de não sedimentação em uma taxa de alimentação de 250-500 kg/hora.

3. A solução de proteína clarificada foi ajustada para um pH de 4,5 +/- 0,1 através da adição de ácido clorídrico (30%) e deixada reagir durante 30 minutos a 45°C.

4. A proteína precipitada foi recuperada usando-se uma centrífuga com disco de não sedimentação em uma taxa de alimentação de 200-400 kg/hora e um intervalo de não sedimentação de 3 minutos.

5. A coalhada de proteína foi lavada durante 10-30 minutos, duas vezes usando-se água acidificada (pH de 4,5 +/- 0,1, 30-35°C). A proporção de água de lavagem para sólidos acondicionados a úmido era de 6:1 (peso/peso). A coalhada de proteína foi recuperada usando-se uma centrífuga com disco de não sedimentação em uma taxa de alimentação de 350-450 kg/hora após cada lavagem.

6. A coalhada lavada foi misturada com hidróxido de sódio (30%) para ajustar o pH (pH de 7,2) e, então, tratada por calor a 72°C durante 15 segundos ou 90°C durante 20 segundos usando-se uma placa e permutador de calor e esfriada para 25-35°C. Então, o pH foi ajustado para um pH de 6,8 usando-se HCl (30%).

7. A solução de proteína foi ajustada a 45-55°C e foi seca por pulverização usando-se uma temperatura de ar de entrada de 204-215°C, temperatura de ar de saída de 88°C.

D. Ultrafiltração e diafiltração

10 1. A solução de proteína clarificada foi obtida da etapa 2 do Exemplo 3B ou 3C acima. Para fazer o SPI-UF-hb (hb = antes de calor), a solução de proteína foi neutralizada (pH de 6,8-7,0) e tratada por calor a 72°C durante 15 segundos ou 90°C durante 20 segundos usando-se uma placa e permutador de calor. Para fazer o SPI-UF-ha (ha = após calor), a
15 solução de proteína (pH de 9,0) foi usada da etapa 2 e a amostra foi neutralizada e tratada por calor após a etapa 4.

2. A solução de proteína foi passada sobre uma membrana de ultrafiltração (por exemplo, fibra oca) com um corte de peso molecular de 100.000 Dáltons. O volume original da solução de proteína foi mantido em
20 um recipiente de alimentação durante ultrafiltração e diafiltração através da adição de água a fim de remover o permeado.

3. A solução de retentado foi reciclada ao recipiente de alimentação.

4. Uma vez que o permeado era cerca de 1,3 a 1,5 vezes o volume original de alimentação, a adição de água ao recipiente de alimentação foi descontinuada e o permeado foi coletado.

5. O volume do recipiente de alimentação foi reduzido através de ultrafiltração até um teor de sólidos de cerca de 15% de sólidos fosse obtido e ajustado para um pH de 6,8-7,0 através da adição da NaOH a 8%
30 ou HCl a 6%.

6. O retentado foi seco por pulverização usando-se uma temperatura de ar de entrada de 180-185°C, temperatura de ar de saída de 85-90°C.

Exemplo 4

Composição, solubilidade e cor das sojas e BC-SPI

Materiais: BC-SPIs, baixo-BC SPI e Cntrl-SPIs foram feitos através dos métodos de precipitação e ultrafiltração no POS Pilot Plant Corp., Saskatoon, SK, Canadá e Texas A&M University, College Station, Texas, de acordo com os métodos no Exemplo 3. A fabricação do Bc-SPI-UFpH9 incluía a adição de tripolifosfato de sódio (0,5% baseado no peso dos flocos desnatados) no solvente de extração de SPI (pH de 8,5-9,0), possivelmente contando com o maior teor de cinzas do SPI (Tabela 5). Com'l SPI A, C (parcialmente hidrolizado) e D foram obtidos da Protein Technologies International, St. Louis, Missouri. Com'l SPI D, E e F foram obtidos da Archer Daniel Midland, Decatur, Illinois. Caseinato de sódio (Alanato 180) era da New Zealand Milk Products (América do Norte), Inc., Santo Rosa, CA. As composições e propriedades físicas dos SPIs são apresentados abaixo.

Composição da proteína: A proteína total nos SPIs foi determinada através de combustão (Official Methods of Analysis of the AOAC, 16ª Edição, 1995; 990.02, Locator# 4.2.08). A quantidade dos tipos individuais de proteínas nos SPIs foi determinada como uma percentagem da proteína total usando-se eletroforese em gel (Exemplo 1).

BC-SPI continha aproximadamente duas vezes mais BC comparado ao Com'l SPI A (Tabela 6). Somente a subunidade beta da beta-conglicina estava presente no baixo-BC SPI.

Composição de gordura: a quantidade de gordura nos SPIs foi determinada por um método de hidrólise de ácido (Official Methods of Analysis of the AOAC, 1995, 16ª Edição, Método 922.06 (modificado), Locator # 32.1.14).

Atividade inibitória de tripsina: Sojas e SPI foram analisados com relação à atividade inibitória de tripsina usando-se um método AACC padrão (1995, 9ª edição, método 71-10).

Índice de solubilidade em nitrogênio: Uma porção da amostra é suspensa em água, com agitação, a 120 rpm e 30°C, durante duas horas; então, diluída até um volume conhecido de água (5 g/250 ml, 2%). Uma por-

ção da amostra extraída é centrifugada (1500 rpm) e uma alíquota analisada com relação à proteína de Kjeldahl. Uma porção separada da amostra é analisada com relação à proteína total. Nitrogênio solúvel em água como um percentual do nitrogênio total, é definido como o índice de solubilidade em nitrogênio (Official and Tentative Methods of the AOCS (1989), 4ª Edição, Método Ba 11-65).

Cor do SPI: Uma amostra de SPI foi colocada em um Colorímetro de Hunter (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA) onde a reflexão da cor é medida contra três escalas no instrumento: L, a e b (Am. Assoc. Cereal Chemists, Método 14-22). BC-SPI ultrafiltrado da invenção tinha significativamente mais brancura e menos amarelidão do que os outros SPIs e, portanto, era mais similar, com relação à cor, ao caseinato de sódio comercial (Alanato 180) (Tabela 4).

Tamanho das partículas de SPI hidratado: O pó isolado de proteína foi colocado diretamente na circulação de água no analisador de tamanho de partícula Horiba LA910 na quantidade necessária para se obter um percentual de transmissão de luz de 70% a 90%. Cada amostra foi misturada durante 10 minutos no instrumento com uma velocidade de agitação de 2 e uma velocidade de circulação de 2 (bomba peristáltica). O tamanho de partícula foi determinado usando-se um índice de reflexão relativa (para água) de 1,02-ooi.

BC-SPI-ácido-ha da invenção eram os únicos SPIs não hidrolizados os quais quando de dispersão em água tinham menos do que 15 por cento do volume de partícula contribuído por partículas maiores do que 10 microns (Tabela 4).

Tabela 4. Índice de solubilidade em nitrogênio (NSI), cor e distribuição de tamanho de partícula dos BC-SPIs comparados aos isolados de controle e comerciais

<u>Isolados de proteína</u>	<u>NSI</u>	<u>Valores colorimétricos de Hunter</u>		<u>P. Vol. ></u>	<u>Microns</u>
	<u>(%)</u>	<u>L (brancura), b amarelidão</u>		<u>10 m (%)*</u>	<u>med.**</u>
Caseinato de sódio	98	92,4	7,1	0,0	0,30
BC-SPI-ácido-ha, 72C	96	86,1	10,9	7,3	0,37

Tabela 4 (Continuação)

Isolados de proteína	NSI (%)	Valores colorimétricos de Hunter		P. Vol. > 10 m (%)*	Microns med.**
		L (brancura)	b amarelidão		
BC-SPI-ácido-ha, 90C	95	85,9	11,3	6,9	0,38
Cntrl SPI-ácido-ha, 72C	94	86,1	10,9	19,7	0,39
Cntrl SPI-ácido-ha, 90C	94	86,1	11,0	18,3	0,31
Cntrl SPI-UFpH9-ha	-	85,2	10,6	11,0	0,37
BC-SPI-UF-hb, 72C	96	89,3	8,3	9,9	0,30
BC-SPI-UF-ácido-hb, 72C	34	85,5	11,8	30,8	1,32
Cntrl SPI-ácido-hb, 72C	95	85,2	11,5	19,4	0,35
Cntrl SPI-ácido-hb, 90C	63	83,5	12,8	75,1	53,2
Com'l SPI A (S760)	63	85,5	12,8	75,1	53,2
Com'l SPI C (S670)	82	82,8	13,5	0,9	0,37
Com'l SPI D (S500E)	72	--	--	84,0	72,2
Com'l SPI E (P974)	67	85,8	12,6	92,0	96,6
Com'l SPI F (A DHV)	78	86,1	11,4	76,7	71,5

*P Vol. > 10 m. - volume de partícula de partículas maiores que 10 microns

** Diâmetro médio de partícula

hb = tratado por calor antes de UF ou precipitação de ácido

5 ha = tratado por calor após precipitação de ácido

Tabela 5. Composição química dos isolados de proteína. A proteína é expressa como nitrogênio x 6,25 (provavelmente representa a proteína total de soja).

SPI	% de Proteína, base seca	Gordura (% de hidrólise de ácido, base seca)	% de cinzas, base seca
Caseinato de Na	95,74	0,75	3,71
Baixo-BC-SPI-hb	94,39	4,02	3,89
BC-SPI-ácido-hb	91,89	4,57	3,86
BC-SPI-ácido-ha	95,24	2,54	3,75
BC-SPI-UfpH7-hb	92,31	3,18	3,65
BC-SPI-UfpH9	88,39	3,57	5,83
Cntrl-SPI-UFpH9-ha	92,28	--	--
Cntrl-SPI-ácido-hb	93,03	3,05	4,60

Tabela 5 (Continuação)

SPI	% de Proteína, base seca	Gordura (% de hidrólise de ácido, base seca)	% de cinzas, base seca
Cntrl-SPI-ácido-ha	92,34	--	--
Com'l SPI A	92,55	4,94	--

Tabela 6. Composição de proteína dos SPI's. BBI = Inibidor de Protease de Bowman Birk; KTI = Inibidor de protease de Kunitz

Isolados de proteína de soja	Composição de proteína do SPI (% de proteína)					Atividade inibitória de protease (TIU/mg de proteína)
	BC	Glicinina	A ₃	BBI	KTI	
Baixo-BC-SPI-ácido-hb	12,4*	55,2	5,7	--	2,4	31,5
BC-SPI-ácido-hb	51,3	5,5	2,4	0,50	2,5	85,2
BC-SPI-ácido-ha	61,9	3,0	1,8	0,35	2,8	45,6
BC-SPI-UFpH7-hb	54,0	4,2	1,8	2,4	3,1	284,6
BC-SPI-UFpH9	40,0**	3,4	1,5	3,1	3,7	347,7
Cntrl-SPI-UFpH9-ha	28,2	45,4	5,9	0,0	2,7	26,8
Cntrl-SPI-ácido-hb	30,0	37,4	5,9	0,31	1,4	28,3
Com'l SPI A	26,1	45,2	5,2	0,17	0,7	8,9
Com'l SPI E	28,9	39,8	4,9	0,37	2,5	10,0
Com'l SPI F	28,3	45,5	5,4	0,31	2,1	10,7

* Representa a subunidade beta da BC. Não existem subunidades alfa ou alfa-primo da BC no SPI com baixo teor de BC.

** Uma banda ampla próxima de 62 kDa (8,2% de proteína total) provavelmente representa os produtos da hidrólise das subunidades alfa e alfa' da BC, mas não estava incluída no cálculo com relação à BC aqui.

Tabela 7. Composição de proteína das sojas. Regiões de desenvolvimento de sojas com elevado teor de BC eram IL = Illinois, PR = Porto Rico.

Soja	Beta-conglicininas (% de proteína)	Glicininas (% de proteína)	BBI (% de proteína)	KTI (% de proteína)	Atividade inibitória de tripsi- na (TIU/mg de proteína)
Elevado teor de BC-IL	53,0 +/- 0,9	2,8 +/- 0,7	2,9 +/- 0,1	3,5 +/- 0,4	92,4 +/- 3,3
Elevado teor de BC-PR	51,6 +/- 0,2	1,6 +/- 0,1	2,6 +/- 0,4	3,7 +/- 0,3	77,4 +/- 2,2
Com'l (H6397)	26,2	36,6	0,9	3,2	31,2
Sojas Com'l*			--	--	31,8 +/- 4,4

Tabela 8. Teor de isoflavona dos SPI. Os valores de isoflavonas totais listados são as somas dos isômeros individuais de genisteína, daidzeína e gliciteína, normalizados com relação às suas diferenças no peso molecular a fim de proporcionar as concentrações totais de isoflavonas.

Isoflavonas	Composição de isoflavonas dos SPIs (microgramas/g de SPI seco)			
	BC-SPI- ácido-hb	Baixo-BC- ácido-hb	Cntrl SPI-A	Cntrl-SPI- ácido-hb
Malonil daidzina	86	31	0	0
Malonil glicitina	25	34	88	26
Malonil genistina	300	150	819	204
Daidzina	47	67	190	579
Glicitina	17	32	60	69
Genistina	200	170	658	1259
Acetil daidzina	17	0	207	0
Acetil genisteína	41	31	255	28
Acetil glicitina	0	0	18	0
Daidzeína	106	92	84	191
Gliciteína	21	35	21	30
Genisteína	290	217	116	273
Daidzeína total	188	148	315	544
Genisteína total	594	418	1099	1181
Gliciteína total	45	73	116	88
Isoflavonas totais	827	639	1530	1813

5 Exemplo 5

Propriedades de diminuição do colesterol e triglicerídeo do BC-SPI

Animais e dietas: Hamsters adultos (Golden Syrian machos) (94 +/- 5,5 g) foram individualmente alojados em gaiolas de aço inoxidável com fundo com grades em uma sala ambientalmente controlada a 23°C com um ciclo de claro:escuro de 12 horas. Quando da chegada, os hamsters foram alimentados com ração para roedores com dieta não purificada energi-

zada (Purina, St. Louis, MO) durante 1 semana para aclimatar os mesmos às dietas em pó. Aos hamsters foi aleatoriamente atribuído um dos cinco grupos de tratamento dietético (n = 10 por grupo). As dietas eram similares, exceto quanto à fonte de proteína (Tabela 1). Caseinato de Na era Alanato 180, recebido da New Zealand Milk Products. As sojas com baixo teor de BC foram obtidas da Asgrow seed company (A233) e foram processadas para fazer SPI-ácido-hb com baixo teor de BC (Exemplo 3B). O controle-SPI e BC-SPI foram descritos anteriormente. Todos os hamsters foram alimentados ad libitum durante 6 semanas e a ingestão de alimento foi monitorada durante as semanas 1, 3 e 6. Amostras de sangue retro-orbital foram coletadas nos dias 0, 14, 28 e 42 para medições dos lipídios no soro (Tabela 10). Ao final do estudo, os hamsters foram sacrificados através de exsanguinação e o fígado foi extraído a fim de medir os níveis de lipídios no fígado.

Ensaio de colesterol e triglicerídeos: As concentrações de colesterol total e HDL foram medidas enzimaticamente usando-se kits comerciais (Wako Cholesterol CII Enzymatic Kit (Cat. No 276-64909), Sigma HDL (Cat. No. 352-3). Os triglicerídeos foram determinados usando-se o kit para triglicerídeos da Sigma (Cat. No. 337). As concentrações de VLDL e LDL foram calculadas como a diferença entre o colesterol total e HDL. Além disso, os perfis da lipoproteína colesterol no soro foram diretamente determinados empocando-se o soro dos hamsters de cada grupo e separando-se as lipoproteínas sobre 2 colunas de Superose 6 (Pharmacia, Uppsala, Suécia) de acordo com o procedimento descrito por E.S. Krul e outros (Arteriosclerosis 9: 856-868, 1989).

Ensaio de ácidos biliares fecais e esterol neutro: Os ácidos biliares fecais foram extraídos das fezes secas por meio do método de Van der Meer e outros (Van der Meer e outros, em: Cholesterol Metabolism in Health and Disease: Studies in the Netherlands. Wageningen: Ponsen and Looijen, 113-119, 1985). Os ácidos biliares extraídos foram analisados conforme descrito por Turley e Dietschy (Turley, S.D. e Dietschy, J.M., J. Lipid Res. 19: 924-928, 1978). Os esteróis neutros fecais foram extraídos das fezes secas de acordo com o método de Grundy e outros (Grundy, S.M.

e outros, J. Lipid Res. 6: 397-410, 1965). Os esteróis não derivatizados extraídos foram analisados em um Hewlett Packard Modelo 6890, usando-se uma coluna capilar de vidro HP-5 Ultra 2 (50 m x 0,32 mm de D.I.).

Tabela 9. Composição da dieta de base

5	Componente	g/100 g
	Proteína*	22
	Farinha de arroz	43
	Mistura de óleo**	12
	Celulose	7,5
10	Mistura de minerais	3,5
	Mistura de vitaminas	1,0
	Farelo de trigo	7,5
	Cloreto de colina	0,3
	Bicarbonato de potássio	2,0
15	Colesterol	0,1

* Valor de proteína baseado sobre 6,25 x nitrogênio.

** Manteiga de cacau (25%), óleo de semente de linho (3%), óleo de palma (35%), óleo de açafroa (19%), óleo de girassol (85% oléico; 18%).

Tabela 10. Composição dos lipídios em soro e fezes de hamster após 6 semanas de dietas contendo isolados de proteína de soja e ingestão de alimento após 5 semanas.

SPI	Lipídios no soro		Colesterol fecal		Coprostanol fecal		Colesterol hepático	Ingestão de alimentos
	Colesterol (mg/dl)	Triglicerídeos (mg/dl)	(ug/peso seco em g / dia)	Ácidos biliares fecais (umoles/peso seco em g)	(ug/peso seco em g/dia)	(mg/em peso no fígado em g)	(g/dia)	
Caseinato de Na	307,2 +/- 30,1	243,0 +/- 130,6	144 +/- 14	0,42 +/- 0,64	354 +/- 53	3,89 +/- 1,28	8,39 +/- 0,73	
Com'l SPI A	262,4 +/- 25,2	115,0 +/- 46,7	147 +/- 4	2,27 +/- 1,18	455 +/- 23	2,70 +/- 1,15	9,17 +/- 1,08	
Cntrl-SPI-ácido-hb	248,2 +/- 20,7	123,2 +/- 57,7	195 +/- 14	1,09 +/- 1,09	484 +/- 36	2,23 +/- 0,57	8,48 +/- 0,91	
Baixo-BC-SPI-ácido hb	248,2 +/- 25,8	105,6 +/- 29,0	160 +/- 5	1,72 +/- 1,11	467 +/- 31	2,29 +/- 0,51	8,92+/- 0,79	
BC-SPI-ácido-hb	222,0 +/- 31,7	64,6+/- 19,7	227 +/- 45	2,13 +/- 1,06	364 +/- 29	2,33 +/- 1,13	7,40 +/- 0,95	

Exemplo 6

Propriedades dos BC-SPIs comparados a SPIs comerciais e caseinato de sódio em um sistema modelo de bebida

Materiais: BC-SPIs, Cntrl-SPIs e Com'l SPIs são descritos nos

5 Exemplos 3 e 4.

Formação da emulsão: Proteína (concentração final de 1% usando-se 5,71 x nitrogênio para proteínas de soja e 6,38 x nitrogênio para caseína) (Morr, C.J., Food Sci. 47: 1751, 1982) foi lentamente adicionada a uma solução de sacarose a 5% usando-se um misturador Dispermat e 0,4%
10 de NaCl (na fase aquosa) foi adicionado à mistura. O pH inicial das soluções foi ajustado de acordo com os experimentos anteriores de modo que o pH final da solução se igualasse ao pH alvo. Óleo de amendoim foi lentamente adicionado à solução de proteína no Dispermat (cerca de 3 minutos) (o peso total da formulação era de 50 g). As formulações foram submetidas
15 à ondas sônicas (160 watts) durante 1 minuto em um béquer de plástico de 50 ml com uma prova de ondas sônicas em uma profundidade a partir da marca de 20 ml do béquer.

Tratamento por calor: as emulsões estabilizadas por proteína (20 mL) foram transferidas para frascos de vidro com tampas de rosca,
20 submersas em um banho de água a 90°C e armazenadas em um refrigerador durante a noite.

Medições do tamanho de partícula e viscosidade: As amostras foram testadas com relação à viscosidade usando-se um reômetro Bohlin (copo C14 e fio de prumo serrado, tempo de equilíbrio de 5 minutos, 5°C,
25 taxa de cisalhamento de 14,6 1/segundo e 5 minutos de cisalhamento) e foram testadas com relação ao diâmetro médio de partícula usando-se um Analizador de tamanho de partícula Horiba LA910 (base em volume, índice refrativo relativo de 1,10, menor velocidade de circulação).

Resultados: Caseinato de sódio é um bom emulsificador e é
30 estável contra agregação, conforme ilustrado pelos pequenos diâmetros de partícula (0,8 microns) das emulsões preparadas sob várias condições de temperatura, concentração de cálcio e pH (Tabela 11). Essas propriedades

desejáveis do caseinato de sódio estavam mais próximas dos ingredientes de BC-SPI-ácido-ha (Tabela 11). Somente o caseinato de sódio e BC-SPI-ácido-ha criaram pequenas partículas na emulsão na presença de CaCl_2 a 4 mM. Os pequenos tamanhos das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio e ingredientes de BC-SPI-ácido-ha na presença de CaCl_2 a 4 mM impediram a separação do soro durante o armazenamento, em contraste às emulsões estabilizadas por BC-SPI-ácido-hb e Com'l SPI A, as quais tinham diâmetros maiores de partícula e exibiram 5 ml e 10 ml de soro livre após 1 dia (pH de 6,7, 0,4% de NaCl, CaCl_2 a 4 mM). BC-SPI-ácido-ha também era mais estável contra reações de agregação do que os outros SPIs em um pH de 6,5, conforme ilustrado pelo pequeno diâmetro médio de partícula das emulsões (0,8 microns comparado a > 1,0 micron para todos os outros SPIs) (Tabela 11). BC-SPI-ácido-ha e BC-SPI-ácido-hb eram muito mais estáveis contra a agregação durante condições de congelamento-descongelamento do que os SPIs comerciais, conforme indicado pelos menores diâmetros das partículas da emulsão estabilizada pelos BC-SPIs (2,0-3,7 microns comparado a 9,6-97,6 microns). Parte da estabilidade do BC-SPI-ácido-ha poderia ser atribuída ao processo usado para fazer o ingrediente, ao invés de meramente em virtude do teor de beta-conglicina, devido ao fato de, as partículas da emulsão estabilizada pelos SPIs de controle também terem, surpreendentemente, boa estabilidade ao congelamento-descongelamento.

Tabela 11. Diâmetros médios de partícula de emulsões estabilizadas por proteína ou armazenadas sob condições de pH, sal e congelamento indicadas. Todas as emulsões continham 0,4% de NaCl e 5% de sacarose na fase aquosa e 1% de proteína, 10% de óleo de amendoim. Os resultados são a média de testes duplos.

Proteína	Diâmetro médio de partícula (microns)					
	pH de 6,7 (microns)	pH de 6,5 (microns)	pH de 6,7, congelamento- descongelamento (microns)	pH de 6,7, Ca a 4 mM (microns)	pH de 6,7, 90C, 30 minutos (microns)	pH de 6,5, 90C, 30 minutos (microns)
Caseinato de sódio	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7
BC-SPI-ácido-ha 72C	0,9	0,8	2,0	1,2	0,9	0,9
BC-SPI-ácido-ha 90C	0,9	0,8	2,9	1,1	0,9	0,9
Cntrl-SPI-ácido-ha 72C	1,1	1,3	1,8	12,9	1,7	1,4
Cntrl-SPI-ácido-ha 90C	1,1	1,6	1,9	13,6	2,8	2,9
BC-SPI-UFpH7-hb	1,3	4,9	3,3	10,6	5,1	10,6
BC-SPI-ácido-hb 72C	1,7	2,9	3,7	19,8	4,6	6,5
Com. SPI-A	1,8	7,7	86,9	36,7	4,3	9,7
Com. SPI-C	11,8	17,5	9,6	33,8	19,3	--
Com. SPI-E	1,0	1,1	34,8	18,0	1,0	1,4
Com. SPI-F	1,1	3,7	97,6	19,1	1,8	8,6

* Quando essa emulsão (20 mL) foi tratada por calor em um banho de água a 90°C durante 30 minutos e deixada esfriar em um refrigerador, o diâmetro de partícula aumentou somente para 2,4 microns. A emulsão tratada por calor não mostrou separação de soro após armazenamento (24 horas).

Exemplo 7

Propriedades de texturização dos BC-SPIs sob condições que modelam um sistema de carne emulsificado

Materiais: BC-SPIs e Com'l SPIs A, D, E e F são descritos nos

5 Exemplos 3 & 4. Com'l SPI A, da mesma forma que o Com'l SPI D, é fabricado como um SPI altamente desnaturado conforme medido pela entalpia da desnaturação total (Arrese, E. e outros, J. Agric. Food Chem. 39: 1029-1032, 1991). Para fazer uma composição com elevado teor de BC a qual é altamente desnaturada, BC-SPI-ácido-hb e BC-SPI-UFpH7-hb disperso em

10 água, foram transferidos para frascos de vidro e submerso em um banho de água a 90°C durante 30 minutos e, então, esfriados em um refrigerador. Com'l SPI A também foi processado pelo mesmo método (90°C durante 30 minutos) a fim de determinar como o tratamento por calor ainda afetou as propriedades do Com'l SPI A. Clara de ovo seca era da Canadian Inovatech

15 Inc., Abbotsford, British Columbia.

Formação da emulsão: Proteína (concentração final de 2% usando-se 5,71 x nitrogênio para proteínas de soja e 6,25 x nitrogênio para proteína de clara de ovo) foi lentamente adicionada a uma solução de sacarose a 5% usando-se um misturador Dispermat e 3,5% de NaCl (na fase

20 aquosa) foi adicionada à mistura. O pH inicial das soluções foi ajustado de acordo com os experimentos anteriores de modo que o pH final da solução se igualasse ao pH alvo. Óleo de amendoim foi lentamente adicionado à solução de proteína no Dispermat (cerca de 3 minutos). As formulações foram submetidas à ondas sônicas (160 watts) durante 20 segundos ou 1 mi-

25 nuto em um béquer de plástico de 50 ml com uma prova de ondas sônicas em uma profundidade a partir da marca de 20 ml do béquer.

Gelificação: Cada amostra de emulsão (porção de 20 mL) foi aquecida em um frasco de vidro em um banho de água a 70°C durante 30 minutos ou em um banho de água a 80°C durante 30 minutos, então, armazenada em um refrigerador (5°C) durante a noite. O tempo para que as emulsões fossem para as temperaturas do banho era de aproximadamente

30 8-10 minutos.

Medições do tamanho de partícula e viscosidade. As amostras foram testadas com relação à viscosidade usando-se um reômetro Bohlin (copo C14 e fio de prumo serrado, tempo de equilíbrio de 5 minutos, 5°C, taxa de cisalhamento de 1/segundo de 14,6, segundo e 5 minutos de cisa-

5 lhamento) e foram testadas com relação ao diâmetro médio de partícula usando-se um Analizador de tamanho de partícula Horiba LA910 (base em volume, índice refrativo relativo de 1,10, menor velocidade de circulação).

Resultados: Clara de ovo é um excelente agente de gelificação usado em numerosos alimentos incluindo produtos de carne tal como surimi

10 (análogos de perna de caranguejo). Contudo, da mesma forma que a proteína de carne, a clara de ovo é dispendiosa comparado à proteína de soja. Os ingredientes de proteína de soja os quais se parecem mais ao desempenho da clara de ovo, sob condições as quais imitam um sistema de carne emulsificada, eram os BC-SPIs tratados por calor elevado (Tabela 14). Uma ex-

15 plicação é como segue: BC-SPI tratado por calor elevado foi feito em um pH de aproximadamente 7,0 e 90°C onde a desnaturação de proteína ocorre e a agregação das proteínas desnaturadas é limitada. As maiores viscosidades (ou firmeza ou ligação relacionada à água e gordura) ocorre quando a proteína desnaturada é exposta às condições as quais são ótimas para a

20 formação de estruturas finas de gel/agregado. Essa condição de gelificação está próxima de um pH de 5,6-6,0 para a BC e a gelificação da BC ocorre em temperaturas mais baixas (em ou abaixo da temperatura de desnaturação da BC original) quando a BC é pré-desnaturada. BC-SPIs tratados com

baixo calor foram testados por comparação com os BC-SPIs tratados com

25 calor elevado. A diferença entre as viscosidades das amostras feitas com BC-SPIs tratados com baixo calor e aquelas feitas com BC-SPIs tratados com calor elevado quantificam o valor adicionado pela pré-desnaturação das proteínas de soja usando-se um tratamento por calor elevado. Existe

menos valor adicionado pelo preaquecimento do SPI normal porque a glicina

30 nina forma complexos com a BC alterando a natureza e quantidade de reações subsequentes de formação de gel (por exemplo, condições ótimas de gelificação são movidas para diferentes valores de pH e existem menos lo-

cais não-agregados sobre a BC disponível para formação de gel).

- As propriedades de emulsificação dos ingredientes de BC-SPI também foram comparadas sob condições de baixo cisalhamento (20 segundos de sujeição às ondas sônicas ao invés de 60 segundos). BC-SPI-ácido-ha
- 5 estabilizou gotículas menores de gordura e, após tratamento por calor da emulsão, formou viscosidades maiores do que os isolados comerciais de soja (Tabela 15).

Tabela 14. Viscosidades (em unidades de mPa s) das emulsões tratadas por calor preparadas com BC-SPIs comparado às preparadas com isolado comercial de proteína de soja, pH de 5,8, 3,5% de NaCl em água, 5% de sacarose em água. O diâmetro médio de partícula de todas as emulsões antes do tratamento por calor estava entre 0,9 e 1,1 microns

Isolado de proteína	Viscosidade (70°C) 5 segundos de cisalhamento	Viscosidade (70°C) 5 minutos de cisalhamento	Viscosidade (80°C) 5 segundos de cisalhamento	Viscosidade (80°C) 5 minutos de cisalhamento
Clara de ovo	464 (17)	327 (14)	1800 (375)	1157 (287)
BC-SPI-UFpH7-hb tratado por calor elevado	222 (21)	189 (13)	341 (10)	278 (9)
BC-SPI-ácido-hb tratado por calor elevado	229 (17)	199 (6)	404 (32)	317 (9)
BC-SPI-UFpH7-hb	149	138	229	202
BC-SPI-ácido-hb	142	126	193	167
Com'i SPI A "tratado por calor elevado"	74 (4)	73 (4)	149 (25)	145 (6)
Com'i SPI A	115 (0)	111 (3)	185 (4)	164 (3)

As figuras entre parênteses indicam os valores de desvio padrão para testes duplos.

- Tabela 15. Diâmetros médios de partícula de emulsões estabilizadas por proteína e viscosidades de emulsões tratadas por calor preparadas com BC-SPI e isolados comerciais. Todas as emulsões foram preparadas usando-se 20 segundos de sujeição à ondas sônicas e continham 3,5% de NaCl e 5% de sacarose na fase aquosa, 2% de proteína, 10% de óleo, pH de 5,8. Os valores de viscosidade foram registrados após 5 minutos de cisalhamento.

Isolado de proteína	Tamanho de partícula (microns)	Viscosidade (mPa s) 70C
BC-SPI-ácido-ha, 72C	1,6	27
BC-SPI-ácido-ha, 90C	1,6	32
BC-SPI-UF-hb, 72C	1,6	57
Cntrl-SPI-ácido-ha, 72C	1,9	43
Cntrl-SPI-ácido-ha, 90C	2,2	58
Com'l SPI D	2,0	14
Com'l SPI E	1,9	11
Com'l SPI F	2,8	12

Exemplo 8

Géis induzidos por calor com um pH próximo de 5,6 e baixo teor de NaCl na fase aquosa

- 10 Preparo da amostra: Suspensões de SPI (descrito nos Exemplos 3 e 4) foram preparadas a 7% de proteína e 3,5% de NaCl na fase aquosa e deixadas hidratar durante a noite no refrigerador. Então, o pH das soluções foi ajustado para um pH de 5,6 usando-se HCl diluído.

- 15 Medições da viscoelasticidade dinâmica: O módulo de armazenamento G' foi determinado usando-se um reômetro Bohlin VOR. A célula tinha sido previamente mantida a 30°C. A solução de amostra foi adicionada à célula de teste, coberta com óleo mineral a fim de impedir a evaporação e submetida a cisalhamento por oscilação em uma frequência de 1 Hz e tensão de 0,025 (copo C14 e peso de prumo serreado). A temperatura foi aumentada de 30 para 70 ou 90°C, então, diminuída para 20°C a 1 grau C/minuto.

20 Resultados: as propriedades de formação de gel dos ingredientes de BC-SPI-ácido-ha sob as condições testadas eram muito maiores do

que os SPIs de controle (diferença de 4,6-8 vezes em G') e os SPIs comerciais (diferença de 31-111 vezes em G') (Tabela 16).

Tabela 16. Comparações das propriedades de formação de gel do BC-SPI, SPI de controle e SPI comercial. O módulo de armazenamento (G') dos géis de SPI (7% de proteína, 0,5% de NaCl na fase aquosa, pH de 5,6) foram registrados quando os géis foram esfriados para 20°C (de 70 ou 90°C)

Isolado de proteína	G' máximo a 70C (Pa)	G' máximo a 90C (Pa)
BC-SPI-ácido-ha 90C	2.000	4310
SPI-ácido-ha de controle, 90C	247	933
Com'l SPI D	25	133
Com'l SPI E	18	65

Exemplo 9

Composição de aminoácido e proteína de sojas com BC

As composições de aminoácido e proteína de sojas com BC colhidas em Jeseryville, IL, foram comparadas à composição média de 58 linhas diversas de sojas conforme indicado nas Tabelas 17 e 18. As sojas (7-10 gramas) foram finamente trituradas e analisadas com relação à composição de aminoácido, proteína e umidade pela Ralston Analytical Laboratories, St. Louis, Missouri, de acordo com seus procedimentos padrões. As sojas ricas em beta-conglicinina tinham níveis elevados de proteína, cisteína, metionina, arginina e lisina as quais eram especialmente valiosas para alimentos para animais e fórmulas para bebês.

Tabela 17. Mostrando o teor de aminoácidos e proteína em unidades percentuais, base seca. A linha de elite é Hartz 5350.

Aminoácido	Média de 58 linhas	Faixa	Linha de elite	Elevado teor de BC
Lisina	2,42	2,11-2,66	2,65	2,91
Metionina	0,49	0,41-0,57	0,55	0,62
Cisteína + Met	1,03	0,84-1,19	1,14	1,44
Treonina	1,43	1,35-1,59	1,52	1,54
Triptofano	0,48	0,42-0,55	0,50	0,48
Arginina	2,74	2,36-3,51	2,91	3,40
Proteína total	41,0	37,4-44,8	41,0	43,0

Tabela 18. Dados com relação aos aminoácidos para sojas em unidades de mg/grama de proteína

Aminoácido	Média de 58 linhas	Faixa	Linha de elite	Elevado teor de BC
Lisina	59,6	49-66	64,6	68,0
Metionina	12,0	10,5-13,4	13,5	14,5
Cisteína + Met	25,3	21-29	28,0	33,8
Treonina	35,2	30-40	37,2	36,1
Triptofano	11,8	10,8-13,0	12,1	11,1
Arginina	67,4	57-78	71,0	79,5

Exemplo 10

Composição de aminoácidos de isolados de proteína de soja

- 5 **Materiais e métodos:** BC-SPIs, Cntrl-SPI e Com'l SPI A são descritos no Exemplo 4. Os SPIs foram analisados com relação à composição de aminoácido, proteína e umidade pelo Ralston Analytical Laboratories, St. Louis, Missouri, de acordo com seus procedimentos padrões.

- 10 **Resultados:** BC-SPI-ácido vai de encontro aos requisitos quanto aos aminoácidos através da FAO.WHO durante 2-5 anos (Tabela 19). O BC-SPI-ácido não era rico em cisteína devido ao fato de o BBI rico em cisteína ter sido perdido no soro durante o processamento. A composição com elevado teor de cisteína de BC-SPI-UF é o resultado da retenção de BBI o qual é expresso em altos níveis em sojas com elevado teor de BC (Exemplo 4).

Tabela 19. Composição de aminoácidos dos isolados de proteína de soja

Aminoácidos	Ácido-hb com baixo teor de BC	BC-SPI-ácido-hb	BC-SPI-UF-pH7hb	Contrl-ácido-hb	Com'l SPI-A	FAO.WHO Req. 2-5 anos
Cisteína (perfórmico)						
Cisteína	12,49	12,24	18,51	12,39	11,52	
Metionina	14,16	13,04	14,40	11,70	12,56	
Aminoácidos totais de enxofre	26,64	25,29	32,91	24,08	24,08	25
Tript. de alg hidrol.	14,27	11,21	10,51	11,70	11,18	11
Aminoácidos (Hi Vac)						
Aspártico	124,53	119,11	117,83	114,11	111,29	
Glutâmico	204,12	203,09	191,54	204,93	195,97	
Alanina	47,71	45,08	43,77	38,19	41,24	
Isoleucina	48,49	47,71	44,69	41,74	42,40	28
Fenilalanina	55,52	58,58	52,91	50,92	49,19	
Arginina	76,37	77,57	74,17	74,54	71,08	
Treonina	41,36	37,53	37,83	34,17	35,94	34
Prolina	55,41	51,95	53,26	51,95	50,58	
Valina	52,95	48,97	44,80	43,69	44,59	35

Tabela 19. (Continuação)

Aminoácidos	Ácido-hb com baixo teor de BC	BC-SPI-ácido-hb	BC-SPI-UF-pH7hb	Contrl-ácido-hb	Com'l SPI-A	FAO.WHO Req. 2-5 anos
Leucina	86,06	90,39	81,37	77,41	78,11	66
Histidina	23,86	26,77	25,60	23,05	22,93	19
Serina	53,62	55,26	54,63	50,92	49,77	
Glicina	46,49	39,02	38,17	38,88	40,09	
Tirosina	41,25	39,24	38,29	35,44	37,10	
Lisina	62,10	72,43	71,66	58,03	59,91	58
Phe + tyr	96,77	97,83	91,20	86,35	86,29	63

As quantidades são mostradas em mg/g de proteína.

Exemplo 11Propriedades físicas e sensação na boca dos análogos de queijo processado

Materiais: BC-SPIs, BC-SPIs parcialmente hidrolizados e Com'l SPI A são descritos no Exemplo 4. Com'l SPI G (Supro 710) era da Protein Technologies International, St. Louis, MO. Caseína coalhada era da Century Foods Inc., Sparta, WI; óleo de soja era da International Food Products, St. Louis, MO; diidrato de citrato de sódio e ácido láctico (80%) da Archer Daniels Midland Company, Decatur, IL; Alcalase 2.4L e Flavourzyme L da Novo Nordisk BioChem North America, Inc., Franklinton, NC. Forno Stephan UMC 5 (Stephan Machinery Co.) foi equipado com um banho de circulação (Haake, Paramus, NJ) contendo Óleo de Silicone HF 200 (Haake, Paramus, NJ).

Teste de derretimento do queijo: Um método modificado de Arnott foi empregado. Amostras de cubo de análogo de queijo com dimensões controladas foram preparadas através de um dispositivo de corte à fio. Após o preparo, os cubos de queijo foram colocados em sacos plásticos herméticos ao ar e armazenados a 4°C até a testagem. Os cubos (14 x 14 mm) foram colocados sobre um disco de Petri de vidro, tampados e colocados em um forno de laboratório a 100°C durante 15 minutos. A altura central de cada cubo foi medida 30 minutos após a remoção do forno. A diminuição percentual no comprimento foi calculada e é relatada como a capacidade de derretimento de Arnott em uma escala de 0-100.

Teste de textura do queijo: Um Analizador de Textura TAX.T2 (Texture Technologies Corp.) foi usado com uma prova de corte a fio TA-26. Cubos de queijo (15 mm) foram cortados e armazenados em sacos plásticos herméticos ao ar a 4°C. Ajustes: o modo de teste era para medir a força na compressão; a velocidade de pré-teste era de 1,0 mm/segundo; a velocidade de teste era de 0,5 mm/segundo; a velocidade pós-teste era de 5,0 mm/segundo; a distância era de 90% de tensão e a força era de 5 gramas.

Teste de umidade: Duas almofadas de fibra de vidro CEM foram taradas sobre um instrumento CEM Lab Wave 9000. O análogo de queijo (3,5 g) foi espalhado uniformemente sobre uma grande área de uma almofada de fibra de vidro. A amostra foi coberta com as almofadas restantes de

fibra de vidro e colocada no instrumento durante 4 minutos e 30 segundos em uma energia de 40%.

Métodos para a fabricação de queijo usando-se BC-SPI tratado com Alcalase:

1. BC-SPI (45-47 g; 30% da proteína na fórmula do queijo) foi
5 adicionado à água (355 g) a 50°C e completamente misturado com um batedor até uniformidade (55°C).
2. O pH da solução foi ajustado para 8,0 usando-se NaOH a 1 N.
3. Alcalase (0,19 g, 0,51% x g de proteína) foi adicionada à
mistura e agitada.
- 10 4. A mistura foi colocada em um Forno Stephan a aproximadamente 55°C e misturada a 250 rpm durante 45 minutos a fim de possibilitar um período para hidrólise limitada das proteínas de soja.
5. A mistura foi, então, transferida para um béquer e aquecida a 90°C durante 7 a 10 minutos a fim de inativar a enzima.
- 15 6. A pasta fluida foi adicionada a uma mistura de citrato de sódio, cloreto de sódio, caseína coalhada e óleo (50°C) contidos em um ebulidor duplo.
7. A massa foi mantida em 66°C e ácido láctico (pH de 5,25-5,35) foi adicionado e a mistura foi agitada durante 4 minutos, o período para que a
20 massa atingisse 80°C.
8. A massa quente foi transferida para um Forno de Stephan (80°C) e misturada a 250 rpm durante 3 minutos e, então, entornada em um recipiente plástico, esfriada durante 5 minutos, fechada com uma tampa e armazenada em um refrigerador (4°C).

25 Métodos para a Fabricação de Queijo usando-se SPIs não-tratados:

BC-SPI, Com'l SPI A ou Com'l SPI G também foram usados para fazer um análogo de queijo processado através de mistura da proteína hidratada com os outros ingredientes no ebulidor duplo e seguindo-se as etapas 7 a 8 acima.

30 Métodos para a Fabricação de Queijo usando-se Flavourzyme:

1. BC-SPI (45-47 g; 30% da proteína na fórmula do queijo) e água (300 g) foram adicionados a um béquer de peso conhecido. O béquer

foi colocado sobre uma balança com tara determinada. Esse peso foi registrado como o peso total antes da hidrólise.

2. O pH da solução não foi ajustado (pH de 6,4).

3. Flavourzyme (0,73 g) foi adicionada à mistura e agitada.

5 4. A mistura foi colocada em um forno Stephan a aproximadamente 55°C e misturada a 250 rpm durante 90 minutos a fim de possibilitar um período para hidrólise limitada das proteínas de soja.

5. A mistura foi transferida para um béquer na etapa 1 e aquecida para 90°C durante 10 minutos e resfriada em um banho de gelo durante
10 10 minutos. O béquer foi seco e colocado em uma balança com tara determinada. O peso foi registrado como o peso total após hidrólise.

6. A pasta fluida foi adicionada a uma mistura de citrato de sódio, cloreto de sódio, caseína coalhada e óleo (50°C) contido em um ebulidor duplo.

15 7. A massa foi mantida em 66°C e a água (peso total antes da hidrólise da etapa 1 menos o peso total após a hidrólise da etapa 5 mais 55 g extra de água para compensar a evaporação durante a fabricação do queijo) mais 10 gramas de ácido láctico (80%) foram lentamente adicionados à mistura. O pH foi ajustado para 5,25-5,35 com a adição de até 2 g de ácido
20 láctico (80%).

8. A massa quente foi transferida para um Forno de Stephan (80°C) e misturada a 600 rpm durante 4 minutos e, então, entornada em um recipiente plástico, esfriada durante 5 minutos, fechada com uma tampa e armazenada em um refrigerador (4°C) durante 3 dias.

25 Os queijos tinham 18% de proteína, 27% de gordura e 47,5% de umidade (Tabela 20). Os níveis de umidade dos queijos eram maiores do que o produto comercial para torná-lo passível de comparação com as propriedades de uma faixa maior de ingredientes de proteína de soja nesse sistema modelo, alguns dos quais tinham sido inadequadamente misturados
30 em níveis menores de umidade.

Resultados: os análogos de queijo que continham SPIs comerciais parcialmente hidrolizados (Com'l SPI C & G) e o BC-SPI tratado com

- Alcalase tinham texturas mais elásticas ao invés de suculentas e derretiam mais similarmente aos queijos contendo somente caseína coalhada como a fonte de proteína (Tabela 21). O BC-SPI tratado com Flavourzyme tinha uma textura uniforme e uma capacidade muito boa de ser espalhado similar a um patê de queijo. Essa diferença na textura foi quantificada usando-se um teste de compressão (Tabela 22).

Tabela 20. Fórmula do análogo de queijo

Ingrediente	Peso em gramas	Proteína em gramas	Gordura em gramas	Umidade em gramas
Caseína Coalhada (N x 6,38 = 79,9% de proteína)	108,0	86,29		
Proteína de soja (N x 5,71 = teor de proteína)	45,0	35,93		
Óleo de soja	184,8		184,8	
Citrato de sódio	15,0			
Cloreto de sódio	10,5			
Água	300,0 (+25-55)*			300,0
Ácido láctico (80%)	10-12			24
Total	675,3	122,2	184,8	320,8
Percentual da fórmula		18,0	27,0	47,5

* 25 ou 55 g adicionados a fim de compensar a perda de água através de evaporação durante a fabricação do queijo.

- 10 Tabela 21. Composição do análogo de queijo, propriedades de textura e fusão

Amostra	Textura	PH	Umidade (%)	Fusão (%)*
BC-SPI-ácido-ha 72C tratado com Flavourzyme	Uniforme, capaz de ser espalhado	5,80	47,0	57,1
BC-SPI-ácido-ha 72C tratado com Alcalase	Elástico	5,86	47,4	50,0
BC-SPI-ácido-hb 72C tratado com Alcalase	Elástico	5,69	46,5	50,7 (1,0)
BC-SPI-ácido-hb	Suculento	5,89	48,2	39 (0,8)
Com'l SPI A	Suculento	5,86	47,2	41 (3,4)
Com'l SPI C	Elástico	5,73	46,2	55 (2,5)
Com'l SPI G	Elástico	5,92	47,7	65,5 (1,7)
Caseína de Coalhada	Elástico	5,93	48,8	76,2

* diminuição na altura de um cubo de 14 mm de altura aquecido em um forno a 100°C durante 15 minutos.

Os números entre parênteses mostram o desvio padrão com relação aos dados em dois dias.

- 5 Tabela 22. Textura de análogos de queijo conforme medido pelo esforço necessário para que um arame penetre na superfície e afunde 90% nas amostras de queijo.

	<u>Isolado de proteína de soja</u>	<u>Área de trabalho (gs)</u>
	Com'I SPI G	1389 +/- 131
10	Com'I SPI C	1263 +/- 87
	Tratada por Alcalase	1233 +/- 273
	BC-SPI-ácido-ha 72C	
	Tratada com Flavourzyme	402 +/- 73
	BC-SPI-ácido-ha 72C	

- 15 Exemplo 12

BC-SPIs com baixo teor de metionina, elevado teor de arginina como suplementos nutricionais e dietéticos

- Os preparados dos novos BC-SPIs contendo baixo teor de metionina, elevado teor de arginina são úteis como suplementos nutricionais e dietéticos para a modulação do nível total de homocisteína no plasma. Tais BC-SPIs são preparados através do uso de condições as quais limitam as reações de interação de dissulfeto entre as proteínas de soja (por exemplo, através do uso de um agente de redução tal como bissulfito de sódio) e ultrafiltração a fim de ter as beta-conglicininas, glicininas e gama-conglicininas. As proteínas ricas em metionina e cisteína de peso molecular mais baixo passam através da membrana no permeado. Alternativamente, uma soja com elevado teor de BC pode ser desenvolvida a qual é deficiente em metionina através da seleção de condições apropriadas de desenvolvimento, cruzamentos com outras sojas ou modificação da composição da soja. SPI com elevado teor de beta-conglicinina feito através de um processo de precipitação de ácido de sojas com elevado teor de BC desenvolvidas em Porto Rico tinham elevado teor de arginina (75 mg/g de proteína) e baixo teor de metionina

(menos do que 11 mg/g de proteína).

Exemplo 13

BC com reduzido teor de lipoxigenase para reduzir o desenvolvimento de aroma

- 5 As enzimas lipoxigenase são conhecidas por causar o desenvolvimento de aroma em ingredientes de proteína de soja através de catalisação da oxidação de gorduras poliinsaturadas (Nishiba, Y. E outros, J. Agric. Food Chem. 43: 738-741). A característica da lipoxigenase de uma variedade de soja desenvolvida por Keisuke Kitamura (Japan J. Breed 41: 10 507-509, 1991) foi transferida para uma semente de soja americana carecendo de um gene de lipoxigenase e, então, ainda cruzada com a variedade com elevado teor de beta-conglicinina a fim de criar uma variedade de soja com elevado teor de beta-conglicinina, de baixo aroma, carecendo de todas as três lipoxigenases.
- 15 Outra abordagem para reduzir os aromas seria reduzir a presença de glucosidases em sojas, devido ao fato da atividade dessas enzimas sobre as isoflavonas da soja aumentarem a intensidade dos aromas (Okubo e outros, Biosci. Biotech. Biochem. 56: 99-103; Matsuura e outros, J. Food Sci., 54: 602-605, 1989).
- 20 Embora a invenção precedente tenha sido descrita em alguns detalhes por meio de ilustração e exemplo para fins de clareza e compreensão, será óbvio que determinadas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do escopo da invenção, conforme limitada somente pelo escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um substituinte de leite, fórmula infantil, mistura para bebida, creme líquido para café, sobremesa congelada, barra alimentícia nutricional, análogo de queijo processado, ou análogo de queijo capaz de ser espalhado, caracterizado pelo fato de que compreende substituir caseinato de sódio por isolado de proteína de soja com elevado teor de beta-conglicinina (BC-SPI), em que o referido isolado apresenta um teor de beta-conglicinina de mais do que 40% de proteína e um teor de glicinina de menos do que 10% de proteína, como um ingrediente alimentício, em que o BC-SPI é produzido por um método compreendendo:
- a) o contato de material de soja desnatada e um solvente aquoso a fim de formar uma mistura de componentes solúveis e insolúveis, em que uma porção da proteína é solubilizada no solvente aquoso;
 - b) ajuste do pH da mistura para acima de 6,7 a fim de aumentar a porção da proteína solubilizada no solvente aquoso;
 - c) remoção dos componentes insolúveis da mistura;
 - d) ajuste do pH da mistura para um pH mais baixo adequado a fim de precipitar uma porção da proteína solubilizada no solvente aquoso;
 - e) recuperação de uma porção da proteína precipitada na etapa d);
 - f) ajuste do pH da mistura contendo proteína recuperada na etapa e) para 6,7 a 7,2; e
 - g) secagem da mistura,
- em que a etapa de tratamento por calor, a qual ocorre entre as etapas (f) e (g), a um pH de 6,7 a 7,2 é realizada após ajuste do pH da mistura a um pH baixo adequado para precipitar uma porção da proteína solubilizada no solvente aquoso,
- e em que o método para produção de BC-SPI rende partículas com diâmetros médios de 1,1-1,2 micra no pH 6,7.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de tratamento por calor é selecionada do grupo consistindo em:

- a) 72-90 °C durante 15 a 20 segundos;
- b) 80-90 °C durante 5 a 10 minutos; ou
- c) 120-154 °C durante 7 a 20 segundos.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado
5 pelo fato de que a beta-conglicinina está compreendida em uma composição de soja tendo um teor de beta-conglicinina de mais do que 40% de proteína e tendo um teor de glicinina de menos do que 10% de proteína.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
3, caracterizado pelo fato de que BC-SPI tem um teor de aminoácido de en-
10 xofre de menos do que 24 mg/g de proteína e um teor de arginina maior do que 70 mg/g de proteína.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
4, caracterizado pelo fato de que menos do que 10% do volume de partícula
da composição é de partículas maiores do que 10 microns de diâmetro, con-
15 forme medido através da adição suficiente da composição à água circulando em um instrumento Horiba LA910 equipado com uma bomba peristáltica a fim de se obter uma transmitância de luz de 80-90% e mistura durante 10 minutos no instrumento com uma velocidade de agitação de 2 e velocidade de circulação de 2 e usando-se um índice de reflexão relativa de 1,02.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA PREPARAR UM SUBSTITUINTE DE LEITE, FÓRMULA INFANTIL, MISTURA PARA BEBIDA, CREME LÍQUIDO PARA CAFÉ, SOBREMESA CONGELADA, BARRA ALIMENTÍCIA**
5 **NUTRICIONAL, ANÁLOGO DE QUEIJO PROCESSADO, OU ANÁLOGO DE QUEIJO CAPAZ DE SER ESPALHADO"**.

A utilidade de sojas tendo uma composição de mais do que 40% da proteína como beta-conglicinina e menos do que 10% da proteína como glicinina para fabricação de composições com elevado teor de beta-conglicinina altamente funcionais foi descoberta. Os ingredientes descobertos são úteis na imitação das propriedades texturizadas da caseína, ao mesmo tempo em que também mantém ou melhora os benefícios fisiológicos dos ingredientes de proteína de soja (por exemplo, propriedades de diminuição de colesterol e triglicerídeo). A elevada estabilidade das composições com elevado teor de beta-conglicinina contra as reações de agregação proteína-proteína é valiosa para a criação de bebidas com um gosto bom e misturas para bebidas. Queijo com boa capacidade de ser espalhado, gosto e uniformidade foi feito usando-se uma versão enzima-modificada da composição com os novos ingredientes. Queijo com boa firmeza e capacidade de derretimento também foi criado usando-se diferentes tratamentos com enzima. Verificou-se que as composições com elevado teor de beta-conglicinina demonstram excelentes propriedades de emulsificação e gelificação na região de pH (5,5-6,2) relevante para aplicações alimentícias. As composições com elevado teor de beta-conglicinina também possuem uso
10
15
20
25 possível para melhora da composição de aminoácidos essenciais para bebês e animais.