



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 333 304**

⑯ Int. Cl.:

A23J 3/16 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02723808 .8**

⑯ Fecha de presentación : **09.04.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1377176**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

⑭ Título: **Concentrado de proteínas de soja con alto contenido en isoflavonas y procedimiento para su fabricación.**

⑯ Prioridad: **09.04.2001 US 282520 P**

⑯ Titular/es: **Solae, L.L.C.**
4300 Duncan Avenue
St. Louis, Missouri 63110, US

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.02.2010

⑯ Inventor/es: **Singh, Navpreet**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.02.2010

⑯ Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 333 304 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Concentrado de proteínas de soja con alto contenido en isoflavonas y procedimiento para su fabricación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un concentrado de proteínas de soja que presenta propiedades de sabor, funcionales y nutricionales deseables.

10 **Descripción de la técnica relacionada**

Los beneficios de las proteínas de soja se encuentran bien documentados. El colesterol es una preocupación importante para los consumidores de todo el mundo industrializado. Es bien conocido que los productos vegetales no contienen colesterol. Durante décadas, los estudios nutricionales han indicado que la inclusión de proteínas de soja en 15 la dieta de hecho reduce los niveles séricos de colesterol en personas de riesgo. Cuanto más elevado sea el nivel de colesterol, más eficaces son las proteínas de soja en la reducción de este nivel.

Las semillas de soja presentan el contenido de proteínas más alto de todos los cereales y legumbres. En particular, 20 las semillas de soja presentan aproximadamente 40% de proteínas, mientras que otras legumbres presentan entre 20% y 30%, y los cereales, aproximadamente entre 8% y 15% de proteínas. Las semillas de soja también contienen aproximadamente 20% de aceite, siendo la materia seca restante mayoritariamente carbohidratos (35%). En base húmeda (sin modificación), las semillas de soja contienen aproximadamente 35% de proteínas, 17% de aceite, 31% de carbohidratos y 4,4% de cenizas.

25 En la semilla de soja, tanto las proteínas de reserva como los cuerpos lipídicos se encuentran contenidos en la pulpa utilizable de la semilla de soja (denominada cotiledón). Los carbohidratos complejos (o fibra dietética) también se encuentran contenidos en las paredes celulares del cotiledón. La capa externa de las células (denominada cáscara de la semilla) constituye aproximadamente 8% del peso total de la semilla de soja. La semilla de soja cruda descascarillada presenta, dependiendo de la variedad, aproximadamente 18% de aceite, 15% de carbohidratos solubles, 15% 30 de carbohidratos insolubles, 14% de humedad y cenizas y 38% de proteínas.

35 Durante el procesamiento, se seleccionan cuidadosamente las semillas de soja por su color y tamaño. A continuación, se limpian, se acondicionan (para facilitar el descascarillado) y se parten, se descascarillan y se aplastan en copos. Los copos se someten a un baño de solvente que elimina el aceite. El solvente se elimina y los copos se secan, creando los copos de soja desgrasados que son la base de todos los productos de proteína de soja. A pesar del gran número de productos en el mercado, existen únicamente tres tipos de productos de proteína de soja: harinas, concentrados y aislados.

40 Las harinas de soja presentan un contenido elevado de oligosacáridos y presentan un sabor "a alubia" que puede resultar desagradable para algunos consumidores. La falta de optimización del procesamiento provoca que las harinas resulten altamente variables en términos de calidad.

45 Las harinas y sémolas de soja todavía se producen ampliamente y se utilizan con frecuencia en productos horneados, alimentos para piscolabis y aplicaciones de alimentos para animales de compañía, en los que un perfil de sabor fuerte no representa un problema. Las harinas texturizadas de soja fueron un primer intento de simular o mejorar la textura de los productos cárnicos. La texturización no modifica la composición de las harinas de soja y sólo reduce el perfil de los sabores ligeramente. Las aplicaciones principales de las mismas son productos cárnicos o alimentos económicos para animales de compañía.

50 Los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa en la harina de soja potencialmente provocan flatulencia, debido a que la fermentación bacteriana de las mismas en el colon genera gas intestinal. Suárez ha informado de que la ingestión de 34 gramos (g) de harina de soja convencional (1,3 g de rafinosa y estaquiosa) no provocan ningún incremento significativo de flatulencia, mientras que la ingestión de 80 g de harina de soja convencional (3,1 g de rafinosa y estaquiosa) resultan en un incremento significativo de la frecuencia de flatulencia (Suárez, Fabrizis L. *et al.*, Am. J. Clin. Nutr. 69:135-9, 1999).

60 Los concentrados de soja presentan por lo menos 65% de proteínas. Se ha desarrollado una multitud de aplicaciones para los concentrados de soja y concentrados texturizados en alimentos procesados, carnes, carne de ave, pescado, cereales y sistemas lácteos. Los concentrados de proteína de soja se preparan eliminando el material carbohidrato soluble de la harina de soja desgrasada. El medio más común para eliminar los carbohidratos es la extracción con alcohol acuoso (etanol al 60%-80%) o la lixiviación ácida (pH isoelectrónico 4,5). Sin embargo, tanto en la extracción con alcohol acuoso como en la lixiviación ácida, esencialmente todas las proteínas se convierten en insolubles. La solubilidad de las proteínas puede recuperarse en los productos de lixiviación ácida mediante neutralización.

65 Los aislados se producen mediante aislamiento químico estándar, extrayendo la proteína del copo desgrasado mediante solubilización (extracción con álcali a pH entre 7 y 10) y separación seguida de precipitación isoelectrónica. Como resultado, el 90% de los aislados están constituidos por proteínas en una base libre de humedad. No contienen fibra

dietética y ocasionalmente presentan un contenido elevado de sodio, propiedades que pueden limitar su aplicabilidad. Las aplicaciones principales de los mismos han sido la sustitución de lácteos, tal como en las fórmulas infantiles y los sucedáneos de la leche.

5 Es conocido que puede producirse un producto de proteína de soja que presenta un sabor sustancialmente insípido y apariencia incolora utilizando una membrana que presenta un valor de corte de peso molecular (MWCO) de 70.000. La técnica anterior no enseña cómo preparar proteínas de soja de bajo contenido en oligosacáridos que presenten como mínimo aproximadamente 80% de proteínas en peso. La técnica anterior no enseña como preparar proteínas de soja de alto contenido en isoflavonas y bajo contenido en oligosacáridos. La técnica anterior no enseña cómo preparar 10 proteínas de soja de contenido elevado en saponinas.

El documento US 4420425 enseña un método para producir aislados o concentrados de proteínas a partir de semillas oleaginosas no ligantes, tales como las semillas de soja, que se afirma que mejoran el color y el sabor de los aislados o concentrados. El método comprende extraer una fracción de proteínas a partir de una mezcla de agua/semillas oleaginosas y pasar dicha fracción por un sistema de membranas de ultrafiltración con un valor de corte de peso molecular (MWCO) de aproximadamente 70.000, o preferentemente 100.000 daltons.

20 En los últimos años, se han llevado a cabo investigaciones para mejorar la comprensión del papel de las isoflavonas en la prevención de las enfermedades crónicas. Según el American Institute for Cancer Research, las isoflavonas podrían inhibir algunos enzimas necesarios para el crecimiento y la extensión de muchos tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el cáncer de colon. Las isoflavonas también resultan muy prometedoras en la prevención de la osteoporosis y en el tratamiento de los síntomas menopáusicos.

25 Las semillas de soja contienen aproximadamente 0,5% en peso de saponinas. Las saponinas de soja han sido investigadas desde principios del siglo veinte. Estos compuestos consisten de un esqueleto triterpenoide con diversos grupos de azúcar y acetilo. El consenso actual es que los sapogenoles de soja A, B y E son agliconas verdaderas, mientras que otros sapogenoles de soja son artefactos que resultan de las condiciones de hidrólisis. Los glucósidos correspondientes son las denominadas "saponinas de grupo A", "saponinas de grupo B" y "saponinas de grupo E", respectivamente.

30 Las saponinas de soja presentan propiedades antimutagénicas demostradas que las convierte en agentes prometedores para la profilaxis del cáncer. Además, las saponinas de soja de grupo B han mostrado efectos supresores pronunciados de la replicación *in vitro* del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La estructura química de las saponinas de la semilla de soja es muy similar a la del compuesto gliciricina, un agente antivírico conocido, de manera que las saponinas de la soja son prometedoras como bloques de construcción para la síntesis de compuestos farmacéuticos antivíricos.

Descripción resumida de la invención

40 La presente invención comprende un concentrado de proteínas de soja que presenta un contenido bajo de oligosacáridos y un contenido elevado de isoflavonas y de saponina. Más específicamente, la presente invención comprende un método que utiliza harina de soja o copos de soja como material de partida para producir un concentrado de proteínas de soja que presenta un contenido bajo de oligosacáridos no digeribles y un contenido elevado de isoflavonas y saponina.

45 Es un objetivo de la presente invención producir concentrados de proteínas de soja que presentan un contenido de fibra cruda inferior a aproximadamente 3% en peso, un contenido de proteínas superior a 75% en peso y un contenido inferior a 85% en peso de materia seca total, y un contenido de isoflavonas de por lo menos 2 miligramos/gramo (mg/g) de materia seca total.

50 Es otro objetivo de la presente invención producir concentrados de proteína de soja que contengan un contenido combinado de rafinosa y estaquiosa inferior a aproximadamente 50 mg/g de materia seca total.

55 Es un objetivo adicional de la presente invención producir concentrados de proteínas de soja que presenten un contenido de sapogenol de soja superior a 2,0 mg/g de materia seca total.

60 Es todavía un objetivo adicional de la presente invención producir concentrados de proteínas de soja que presenten un índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) superior a 80.

65 En una realización, la presente invención proporciona un método para fabricar un concentrado de proteínas de soja, que comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar un material de semillas de soja desgrasadas, (b) añadir agua al material para formar una lechada, (c) eliminar la fibra de la lechada para producir una suspensión, (d) ultrafiltrar la suspensión utilizando una membrana que presente un valor de corte de peso molecular (MWCO) de hasta 30.000, y (e) recuperar un producto que presente un contenido de proteínas de por lo menos 70% en peso de la materia seca total y un contenido de isoflavonas de por lo menos 2 mg/g de la materia seca total, comprendiendo además el método una etapa de pasteurización de dicha suspensión antes de dicha etapa de ultrafiltración y las etapas de pasteurización y secado por pulverización del producto. Preferentemente se utiliza una membrana que presenta un MWCO de entre 10.000

5 y 30.000. Alternativamente, puede utilizarse una membrana que presente un MWCO de 1.000.000 para eliminar los oligosacáridos y producir un producto que presente un contenido de proteínas de por lo menos 70% en peso de la materia seca total y un contenido de isoflavonas de por lo menos 2 mg/g de materia seca total y un contenido de sapogenol de soja superior a 2 mg/g de materia seca total.

10 El material de soja desgrasada puede ser copos de soja o harina de soja. El material desgrasado puede contener menos de aproximadamente 1,0% en peso de grasa, por lo menos 45% en peso de proteínas y presentar un índice de dispersibilidad de proteínas (PDI) de aproximadamente 90. El material desgrasado puede contener adicionalmente entre aproximadamente 30 y 40% en peso de carbohidratos, y entre aproximadamente 5% y 10% en peso de humedad.

15 En una forma específica de la presente invención, se añade una cantidad de agua al material desgrasado, para producir una lechada que contiene entre aproximadamente 5% y 15% en peso de sólidos.

20 15 En otra forma específica de la presente invención, se utiliza una membrana que presenta un valor de corte de peso molecular de 10.000 en la etapa de ultrafiltración de la suspensión.

25 En una realización específica, el producto contiene además un contenido combinado de rafinosa y estaquiosa inferior a 50 mg/g de la materia seca total.

30 En otra realización de la presente invención, el método para fabricar un concentrado de proteínas de soja incluye una etapa de ajuste del pH de la lechada a por lo menos aproximadamente 7,0 antes de la etapa de eliminación de la fibra. Específicamente, el pH de la lechada puede ajustarse a un valor comprendido entre aproximadamente 7 y aproximadamente 7,5. Más específicamente, el pH de la lechada puede ajustarse mediante la adición de hidróxido sódico a la lechada.

35 La etapa de pasteurización del producto puede llevarse a cabo mediante cocción en horno de chorro de vapor a una temperatura de entre aproximadamente 76°C y aproximadamente 130°C, preferentemente se utiliza una temperatura superior a aproximadamente 93°C.

40 35 En una realización más específica de la presente invención, el método para preparar un concentrado de proteínas de soja comprende las etapas siguientes: (a) proporcionar un material de soja desgrasado, (b) añadir agua al material para formar una lechada, en el que la lechada presenta entre aproximadamente 5% y 15% en peso de sólidos, (c) ajustar el pH de la lechada a un valor de entre aproximadamente 7 y 7,5 con hidróxido sódico, (d) eliminar fibra de la lechada mediante centrifugación, produciendo una suspensión, (e) pasteurizar la suspensión mediante cocción a chorro de vapor a temperatura superior a 115°C, (f) ultrafiltrar la suspensión utilizando una membrana que presenta un valor de corte de peso molecular (MWCO) de hasta 30.000, produciendo un retenido, (g) pasteurizar el retenido mediante cocción a chorro de vapor por encima de aproximadamente 93°C, (h) secar por pulverización el retenido pasteurizado, formando un producto, e (i) recuperar el producto que presenta un contenido de proteínas de por lo menos 70% en peso de materia seca total y por lo menos 2 mg de isoflavonas por gramo de materia seca total.

45 Descripción detallada

50 El presente método comprende de manera general: 1) descascarillar semillas de soja enteras, 2) aplastar formando copos las semillas de soja descascarilladas, 3) extraer aceite de soja de los copos de soja utilizando un solvente, tal como hexano, 4) eliminar el solvente de los copos de soja desgrasados sin calentamiento elevado ni tueste, produciendo copos "blancos", 5) moler los copos para preparar harina de soja, 6) eliminar la fibra de la harina de soja y retener las proteínas, y 7) ultrafiltrar para eliminar los carbohidratos y los minerales.

55 Se hace referencia a las etapas 1 a 4 anteriormente descritas como procedimiento de extracción para semillas de soja. El procedimiento general para las etapas 1 a 5 anteriormente descritas se conoce bien (ver la patente US No. 5.097.107 de Konwinski y la patente US No. 3.897.574 de Pass, cada una de ellas asignada al cesionario de la presente invención, las exposiciones de las cuales se incorporan expresamente en la presente invención como referencia. Ver también "Extraction of Oil from Soybeans", J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 157, (1981), y "Solvent Extraction of Soybeans", J. Am. Oil Chem. Soc. 55, 754, (1978).

60 60 La primera etapa descrita anteriormente es el descascarillado. El descascarillado es el procedimiento en el que se eliminan las cáscaras de las semillas de soja de las semillas de soja enteras. Las semillas de soja se limpian cuidadosamente antes del descascarillado para eliminar materias extrañas, de manera que el producto final no se encuentre contaminado por cuerpos de color. Además, las semillas de soja normalmente se parten en aproximadamente 6 a 8 trozos antes del descascarillado. La cáscara típicamente explica aproximadamente un 8% del peso de la semilla de soja entera. La semilla de soja descascarillada presenta aproximadamente 10% de agua, 40% de proteínas, 20% de grasas, siendo el resto principalmente carbohidratos, fibra y minerales.

65 La segunda etapa descrita anteriormente es el procedimiento de formación de copos. Las semillas de soja se acondicionan antes de la formación de copos mediante ajuste de la humedad y la temperatura para que los trozos de semilla

ES 2 333 304 T3

de soja sea suficientemente plásticos. Los trozos de semilla de soja acondicionados se pasan a través de rodillos de formación de copos para formar copos de un grosor comprendido entre aproximadamente 0,25 y 0,30 milímetros (mm).

- 5 La tercera etapa descrita anteriormente implica la separación del aceite de semilla de soja de los copos, o desgrasado. Este procedimiento se lleva a cabo poniendo en contacto los copos con hexano. El aceite que se elimina mediante este procedimiento puede utilizarse en margarina, mantecas y otros productos alimenticios. El aceite de semilla de soja también es una buena fuente de lecitina, que presenta muchas aplicaciones útiles como emulsionante.
- 10 En la cuarta etapa descrita anteriormente, de los copos de soja desgrasados con hexano se elimina el hexano, sin tueste, produciendo copos blancos. Este procedimiento es diferente de los procedimientos convencionales con hexano en aceite de semilla de soja, en los que los copos se tuestan y se utilizan para piensos animales.
- 15 En la quinta etapa descrita anteriormente, se muelen los copos blancos para preparar harina de soja. La harina de soja que puede utilizarse como material de partida para la invención se encuentra fácilmente disponible comercialmente. La harina de soja comercial típicamente presenta por lo menos 50% de proteína (52,5%) (N x 6,25); aproximadamente 30% a 40% (34,6%) de carbohidratos; aproximadamente 5% a 10% (6%) de humedad; aproximadamente 5% a 10% (6%) de cenizas; aproximadamente 2% a 3% (2,5%) de fibra cruda; y menos de aproximadamente 1% (0,9%) de grasa (extracto en éter).
- 20 La harina de soja puede presentar un índice de dispersibilidad de proteínas (PDI) de 90. Se determina el PDI mediante el método Ba 10-65 de la American Oil Chemist's Society (AOCS). La harina de soja con PDI 90 sería harina de soja sin tratamiento térmico y que se encuentra enzimáticamente activa. La harina de soja puede ser de malla 80, que significa que más de 95% en peso de la harina de soja pasa a través de una malla de número 80 de un tamiz de estándar USA.
- 25 Según una realización de la presente invención, el material de partida, que puede ser harina de soja o copos de soja, se produce siguiendo el procedimiento descrito en las etapas 1 a 5 anteriores.
- 30 La etapa siguiente implica eliminar la fibra del material de partida. En esta etapa, se añade una cantidad de agua al material de partida para formar una lechada. El agua puede precalentarse a una temperatura de entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 65°C. En una realización específica, la lechada contiene entre aproximadamente 5% y 15% en peso de sólidos. Habitualmente resulta necesario proporcionar cierta agitación o mezcla para la lechada del material de partida. Un medio para llevar a cabo la mezcla es un agitador de tipo hélice.
- 35 En la etapa de eliminación de la fibra, se ajusta el pH de la mezcla en suspensión a un valor aproximado entre 7 y 7,5, y más preferentemente de aproximadamente 7,4. El pH puede ajustarse mediante la adición de hidróxido sódico a la lechada.
- 40 La separación de la fibra de la lechada puede llevarse a cabo mediante cualquiera de entre varios medios de separación física, tales como la centrifugación utilizando una centrífuga de decantación, por ejemplo. Tras la centrifugación, la torta que contiene fibra se separa de la suspensión, que se recoge.
- 45 En una realización de la presente invención, la suspensión se pasteriza. Un medio para pasterizar es en horno de cocción a chorro de vapor a temperatura elevada, preferentemente a aproximadamente 93°C. La temperatura puede alcanzar aproximadamente 127°C. En todavía otra realización de la presente invención, la suspensión puede pasterizarse en una caldera con camisa de vapor.
- 50 En la etapa siguiente, la suspensión se ultrafiltra para eliminar los oligosacáridos y otros azúcares, reteniendo simultáneamente isoflavonas y saponinas en el retenido. Las isoflavonas y saponinas son componentes de peso molecular reducido, inferior a 1.500. Sin embargo, inesperadamente se ha encontrado que las isoflavonas y saponinas resultan retenidas por las membranas de ultrafiltración en la fracción retenida. En la actualidad se cree que las isoflavonas y saponinas pueden acompañarse con las proteínas de manera que la mayor parte de las isoflavonas y saponinas resulta retenida en la fracción retenida. Típicamente se elimina aproximadamente 75% en peso del volumen de la fracción en forma de permeado durante la ultrafiltración, resultando en un producto retenido que presenta un contenido mínimo de proteínas de aproximadamente 70% en peso de la materia seca total. Preferentemente el producto contiene una fracción de proteínas de entre aproximadamente 75% y 85% en peso de la materia seca total.
- 55 Cualquier membrana que incluya membranas arrolladas en espiral con un MWCO de hasta 30.000 resulta adecuada para la etapa de ultrafiltración. Preferentemente se utiliza una membrana con un MWCO de entre 10.000 y 30.000. Alternativamente, puede utilizarse una membrana con un MWCO de 1.000.000. Las membranas arrolladas en espiral de diferente MWCO se encuentran fácilmente disponibles comercialmente. Las membranas adecuadas se encuentran disponibles de, por ejemplo, Koch Membrane Systems, Wilmington, MA; Osmonics, Minnetonka, MN; PTI Advanced Filtration, Oxnard, CA, y Snyder Filtration, Vacaville, CA.

Durante la etapa de ultrafiltración, puede reducirse la temperatura de la suspensión. Una manera de reducir la temperatura es incluir un intercambiador de calor en el sistema de ultrafiltración y pasar agua fría a través del inter-

ES 2 333 304 T3

cambiador de calor. El intercambiador de calor puede instalarse antes o después de un prefiltro para el sistema de membrana o en el interior del sistema de membrana mismo.

El producto ultrafiltrado puede pasteurizarse antes de secarse. Un medio para la pasteurización es la cocción a 5 chorro de vapor. En todavía otra realización de la presente invención, el producto puede pasteurizarse en una caldera con camisa de vapor. La pasteurización se lleva a cabo de manera que el producto consiga un perfil microbiano aceptable y presente un ensayo negativo para *Salmonella*. El medio preferente de secado es un secador vertical por pulverización con una boquilla de alta presión.

10 El producto se seca para formar un concentrado de proteínas de soja que contiene por lo menos 2 mg/g de materia seca total de isoflavonas. El producto presenta un contenido bajo de oligosacáridos no digeribles; el contenido combinado de rafinosa y estaquiosa es inferior a 50 mg/g de materia seca total. El producto además puede presentar un contenido elevado de sapogenoless de soja, que puede ser aproximadamente de por lo menos 2,0 mg/g de materia seca total.

15 El producto presenta muchos usos. Por ejemplo, puede utilizarse como sustituto de la leche y en mezclas para bebidas y en bebidas, tales como bebidas de chocolate, de vainilla y de piña; productos lácteos, tales como yogur de frutas; productos nutricionales y dietéticos, tales como barras de proteínas; inyecciones completas para carne de músculo; productos de surimi; carnes emulsionadas; productos de cereal, tales como cereales de desayuno; 20 productos horneados, tales como magdalenas con arándanos y otros productos para bebidas líquidos o secos, alimentarios o nutricionales. El producto seco puede recubrirse con lecitina comercial u otros surfactantes de grado alimentario, tales como monodiglicéridos, para mejorar la dispersibilidad en agua y reducir el apelmazamiento del producto.

25 *Métodos y estándares*

1. Se midió el índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) según el método Ba 11-65 de American Oil Chemists.
2. Se midió el índice de dispersibilidad de proteínas (PDI) según el método Ba 10-65 de American Oils Chemists.

30 3. Se caracterizaron las isoflavonas mediante el procedimiento descrito en Thiagarajan, D.G., Bennink, M.R., Bourquin, L.D. y Kavas, F.A., Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium, Am. J. Clin. Nutr. 68(supl.):1394S-9S, 1998.

35 4. Se analizaron las saponinas mediante HPLC. Se desarrolló un método analítico basado en la HPLC y se validó para estimar los precursores de saponina presentes en las semillas de soja. El método se basa en el aislamiento de las saponinas totales a partir de semilla de soja finamente molida o de productos de soja utilizando una extracción etanólica seguida de hidrólisis ácida para cortar la cadena o cadenas de azúcar conjugadas para formar agliconas (sapogenoless de soja). Los sapogenoless de soja resultantes se aislaron y se concentraron utilizando técnicas de extracción en fase sólida. Los sapogenoless de soja se resolvieron utilizando una columna de fase reversa con eluciones isocráticas y se detectaron utilizando un detector de dispersión lumínica evaporativa (ELSD). Se llevó a cabo la cuantificación de los sapogenoless de soja utilizando las curvas de calibración derivadas frente a compuestos auténticos. El contenido total de saponina de soja es aproximadamente el doble del contenido total de sapogenoless de soja (Duhan *et al.*, Int. J. Food Sci. Nutr. 52:53-59, (2001)).

40 50 Los ejemplos no limitativos siguientes se presentan con el fin de ilustrar la invención, que no debe considerarse limitada a los mismos. En los ejemplos y en toda la memoria, los porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

55 (Tabla pasa a página siguiente)

60

65

ES 2 333 304 T3

Ejemplo 1

Se dispersaron aproximadamente 23 kilogramos (50 libras) de harina de soja que presentaba un índice de dispersibilidad de proteínas (PDI) de 86, en 236 kilogramos (519 libras) de agua para formar una lechada. Se ajustó el pH a aproximadamente 7,5 utilizando hidróxido sódico. La lechada se mezcló durante 30 minutos a una temperatura de aproximadamente 60°C y después se centrifugó en una centrífuga decantadora. La torta insoluble de la centrífuga se descartó y el sobrenadante (suspensión) se trató térmicamente pasándolo a través de un horno de cocción a chorro de vapor a aproximadamente 121°C con un tiempo de retención de 15 segundos. A continuación, la suspensión se enfrió a aproximadamente 48,8°C en un recipiente con camisa. Seguidamente la suspensión se ultrafiltró utilizando una membrana arrollada en espiral de valor de corte de peso molecular (MWCO) de 10.000 para eliminar aproximadamente un 75% en peso del volumen de la fracción en forma de permeado. El retenido de la membrana se trató térmicamente pasándola a través de un horno de cocción a chorro de vapor a aproximadamente 93°C con un tiempo de retención de 15 segundos. Después, el retenido se enfrió a aproximadamente 60°C en un recipiente con camisa y se secó por pulverización. El producto se analizó para determinar el contenido.

Los resultados de dos análisis (Tabla 1) muestran que el producto presenta un contenido de proteínas de entre 79,79% y 82,97% en peso de materia seca. El contenido total de isoflavonas es superior a 2 mg/g de la materia seca total y la cantidad combinada de rafinosa y estaquiosa es inferior a 3% en peso. Además, el NSI del producto era superior a 95% en ambos análisis.

20

25 TABLA 1
Composición del producto derivado del método del Ejemplo 1

	Composición	% en peso	
		Análisis 1	Análisis 2
30	Proteínas	79,79*	82,97*
35	Humedad	1,23	3,73
40	Cenizas (sin modificación)	6,87	6,50
45	Fibra cruda (sin modificación)	0,80	0,80
	Monosacáridos (sin modificación)	0,13	0,06
	Sacarosa (sin modificación)	2,88	3,49
	Melibiosa (sin modificación)	0,00	0,44
	Rafinosa (sin modificación)	0,18	0,32
	Estaquiosa (sin modificación)	1,80	2,40
	Isoflavonas totales	2,18**	3,51**
	Índice de solubilidad de nitrógeno (NSI)	96,99	95,45
	*base peso seco (% en peso), **base peso seco (mg/g de materia seca total)		

50

55

60

65

ES 2 333 304 T3

Ejemplo 2

Se añadieron aproximadamente 227 litros a un tanque de mezcla y se calentaron a aproximadamente 60°C. A continuación, se añadieron aproximadamente 45 kilogramos de copos de soja al tanque de mezcla para formar una lechada. Se ajustó el pH de la lechada a aproximadamente 7,1 utilizando aproximadamente 1.400 ml de solución de NaOH al 4,5%. La lechada se mezcló durante 10 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 58°C y después se transfirió a un tanque de alimentación de centrífuga, que contenía aproximadamente 303 litros de agua precalentada a aproximadamente 60°C. La lechada diluida se mezcló durante aproximadamente 20 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 58°C y después se alimentó a una tasa de aproximadamente 7,6 litros por minuto a una centrífuga Sharples de tipo sifón. El sobrenadante (suspensión) se sometió a cocción a chorro de vapor a aproximadamente 127°C. La suspensión sometida a cocción a chorro de vapor se transfirió a un tanque de alimentación de membranas a través de un filtro de malla 100. Se añadieron aproximadamente 10 gramos de metabisulfito sódico al tanque de alimentación de membranas. La suspensión se alimentó a un sistema de membranas de ultrafiltración que contenía una membrana arrollada en espiral con un MWCO de 10.000. La temperatura de la suspensión se mantuvo entre aproximadamente 26,5°C y 26,8°C durante el procesamiento de las membranas. Se eliminó en forma de permeado aproximadamente un 75% del volumen de alimentación original añadido al tanque de alimentación de membranas. El retenido del sistema de membranas se pasterizó a aproximadamente 76,7°C y se secó por pulverización utilizando una bomba de alta presión que alimentaba a una boquilla de pulverización en un secador vertical por pulverización. El producto seco se analizó para determinar el contenido del mismo. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 2.

25

TABLA 2

Composición del producto derivado del método del Ejemplo 2

Composición	% en peso	mg/g de materia seca total
Proteínas	82,73	
Fibra cruda	0,94	
Grasa cruda	0,01	
Cenizas	5,91	
Fructosa	2,90	
Galactosa	1,33	
Sacarosa	40,29	
Rafinosa	6,88	
Estaquiosa	30,13	
Isoflavonas	4,54	
Daidzina	0,77	
Glicitina	0,22	
Genistina	1,00	
6"-O-malonildaizina	0,91	
6"-O-malonilglicitina	0,16	
6"-O-acetilgenistina	0,12	
6"-O-malonilgenistina	1,24	
Daidzeína	0,05	
Genisteína	0,07	
Sapogenoles de soja	4,06	
Sapogenol de soja A	1,25	
Sapogenol de soja B	2,81	
Nitrógeno	Índice de solubilidad (NSI)	92

ES 2 333 304 T3

Ejemplo 3

Se añadieron aproximadamente 227 litros a un tanque de mezcla y se calentaron a aproximadamente 60°C. A continuación, se añadieron aproximadamente 45 kilogramos de copos de soja al tanque de mezcla, formando una lechada. Se ajustó el pH de la lechada a aproximadamente 7,08, utilizando aproximadamente 1.400 ml de solución de NaOH al 4,5%. La lechada se mezcló durante 10 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y 58°C y después se transfirió a un tanque de alimentación de centrífuga, que contenía aproximadamente 303 litros de agua precalentada a aproximadamente 60°C. La lechada diluida se mezcló durante aproximadamente 20 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y 58°C y después se alimentó a una tasa de aproximadamente 7,6 litros por minuto a una centrífuga Sharples de tipo sifón. El sobrenadante (suspensión) se sometió a cocción a chorro de vapor a aproximadamente 127°C. La suspensión sometida a cocción a chorro de vapor se transfirió a un tanque de alimentación de membranas con un MWCO de 10.000. La temperatura de la suspensión se mantuvo a una temperatura de entre aproximadamente 48,8°C y aproximadamente 49°C durante el procesamiento de las membranas. Se eliminó en forma de permeado aproximadamente un 75% del volumen original de alimentación añadido al tanque de alimentación de membranas. El retenido del sistema de membranas se pasterizó a aproximadamente 76,7°C y se secó por pulverización utilizando una bomba de alta presión que alimentaba a una boquilla pulverizadora en un secador vertical por pulverización. El producto seco se analizó para determinar el contenido del mismo. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 3.

20

25

TABLA 3

Composición del producto derivado del método del Ejemplo 3

	Composición	% en peso	mg/g de materia seca total
30	Proteínas	82,81	
35	Fibra cruda	0,84	
40	Grasa cruda	0,13	
45	Cenizas	6,00	
50	Fructosa		2,72
55	Galactosa		1,21
60	Sacarosa		30,11
	Rafinosa		4,99
	Estaquiosa		21,80
	Isoflavonas		3,54
	Daidzina		0,67
	Glicitina		0,09
	Genistina		0,90
	6"-O-malonildaizina		0,61
	6"-O-malonilglicitina		0,08
	6"-O-acetilgenistina		0,16
	6"-O-malonilgenistina		0,96
	Daidzeína		0,03
	Genisteína		0,04
	Sapogenoles de soja		3,98
	Sapogenol de soja A		1,05
	Sapogenol de soja B		2,93
	Nitrógeno	Índice de solubilidad (NSI)	93,8

65

ES 2 333 304 T3

Ejemplo 4

Se añadieron aproximadamente 227 litros de agua a un tanque de mezcla y se calentaron a aproximadamente 60°C. A continuación, se añadieron aproximadamente 45 kilogramos de harina de soja al tanque de mezcla para formar una lechada. Se ajustó el pH de la mezcla en suspensión a aproximadamente 7,08 utilizando aproximadamente 1.400 ml de solución de NaOH al 4,5%. La lechada se mezcló durante 10 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 58°C y después se transfirió a un tanque de alimentación de centrífuga, que contenía aproximadamente 303 litros de agua precalentada a aproximadamente 60°C. La lechada diluida se mezcló durante aproximadamente 20 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 58°C y después se alimentó a una tasa de aproximadamente 7,6 litros por minuto a una centrífuga Sharples de tipo sinfín. El sobrenadante (suspensión) se sometió a cocción a chorro de vapor a aproximadamente 127°C. La suspensión sometida a cocción a chorro de vapor se transfirió a un tanque de alimentación de membranas a través de un filtro de malla 100. La suspensión se alimentó a un sistema de membranas de ultrafiltración que contenía una membrana arrollada en espiral con un MWCO de 30.000. La temperatura de la suspensión se mantuvo entre aproximadamente 48,8°C y aproximadamente 49°C durante el procesamiento de las membranas. Se eliminó en forma de permeado aproximadamente un 75% del volumen original de alimentación añadido al tanque de alimentación de membranas. El retenido del sistema de membranas se pasterizó a aproximadamente 76,7°C y se secó por pulverización utilizando una bomba de alta presión que alimentaba a una boquilla de pulverización en un secador vertical por pulverización. El producto seco se analizó para determinar el contenido del mismo. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 4.

20

TABLA 4
25 *Composición del producto derivado del método del Ejemplo 4*

	Composición	% en peso	mg/g de materia seca total
30	Proteínas	82,31	
35	Fibra cruda	1,14	
40	Grasa cruda	0,01	
45	Cenizas	5,44	
50	Fructosa	2,79	
55	Galactosa	1,60	
60	Sacarosa	33,14	
65	Rafinosa	5,88	
	Estaquiosa	24,24	
	Isoflavonas	3,53	
	Daidzina		0,60
	Glicitina		0,17
	Genistina		0,70
	6"-O-malonildaizina		0,76
	6"-O-malonilglicitina		0,11
	6"-O-acetilgenistina		0,09
	6"-O-malonilgenistina		0,99
	Daidzeína		0,04
	Genisteína		0,07
	Sapogenoles de soja	3,74	
	Sapogenol de soja A		1,04
	Sapogenol de soja B		2,70
	Nitrógeno	Indice de solubilidad (NSI)	89,2

ES 2 333 304 T3

Ejemplo 5

Se añadieron aproximadamente 227 litros de agua a un tanque de mezcla y se calentaron a aproximadamente 60°C. A continuación, se añadieron aproximadamente 45 kilogramos de harina de soja al tanque de mezcla para formar una lechada. Se ajustó el pH de la lechada a aproximadamente 7,0 utilizando aproximadamente 1.400 ml de solución de NaOH al 4,5%. La lechada se mezcló durante 10 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 58°C y después se transfirió a un tanque de alimentación de centrífuga, que contenía aproximadamente 303 litros de agua precalentada a aproximadamente 60°C. La lechada diluida se mezcló durante aproximadamente 20 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 58°C y después se alimentó a una tasa de aproximadamente 7,6 litros por minuto a una centrífuga Sharples de tipo sinfín. El sobrenadante (suspensión) se sometió a cocción a chorro de vapor a aproximadamente 127°C. La suspensión sometida a cocción a chorro de vapor se transfirió a un tanque de alimentación de membranas a través de un filtro de malla 100. La suspensión se alimentó a un sistema de membranas de ultrafiltración que contenía una membrana arrollada en espiral con un MWCO de 1.000.000. La temperatura de la suspensión se mantuvo entre aproximadamente 48,8°C y aproximadamente 49°C durante el procesamiento de las membranas. Se eliminó en forma de permeado aproximadamente un 75% del volumen original de alimentación añadido al tanque de alimentación de membranas. El retenido del sistema de membranas se pasterizó a aproximadamente 76,7°C y se secó por pulverización utilizando una bomba de alta presión que alimentaba a una boquilla de pulverización en un secador vertical por pulverización. El producto seco se analizó para determinar el contenido del mismo. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 5.

20

TABLA 5

25 *Composición del producto derivado del método del Ejemplo 5*

	Composición	% en peso	mg/g de materia seca total
30	Proteínas	82,32	
	Fibra cruda	1,25	
35	Grasa cruda	0,07	
	Cenizas	5,72	
40	Fructosa	2,78	
	Galactosa	1,38	
	Sacarosa	36,44	
	Rafinosa	6,82	
	Estaquiosa	26,07	
45	Isoflavonas	3,37	
	Daidzina	0,54	
	Glicitina	0,16	
	Genistina	0,69	
50	6"-O-malonildaizina	0,74	
	6"-O-malonilglicitina	0,11	
	6"-O-acetilgenistina	0,10	
	6"-O-malonilgenistina	0,98	
	Daidzeína	0,02	
55	Genisteína	0,03	
	Sapogenoles de soja	3,55	
	Sapogenol de soja A	1,04	
	Sapogenol de soja B	2,51	
60	Nitrógeno	Índice de solubilidad (NSI)	90,7

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de proteínas de soja que comprende un contenido de fibra cruda inferior a aproximadamente 3% en peso y un contenido de proteínas de entre 75% en peso y 85% en peso de la materia seca total, **caracterizada** porque el contenido de isoflavonas es, como mínimo, 2 mg/g de la materia seca total.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que además comprende un contenido combinado de rafinosa y estaquiosa inferior a aproximadamente 50 mg/g de la materia seca total.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, que además comprende un índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) superior a aproximadamente 80.
- 20 4. Composición según la reivindicación 1, que además comprende un contenido de sapogenoles de soja de, como mínimo, aproximadamente 2 mg/g de la materia seca total.
- 25 5. Método que comprende las etapas de proporcionar un material de soja desgrasada; añadir agua a dicho material para formar una lechada; eliminar fibra de dicha mezcla en suspensión para producir una suspensión, y **caracterizado** porque incluye las etapas de ultrafiltrar dicha suspensión utilizando una membrana que presenta un valor de corte de peso molecular de hasta 30.000; y recuperar un producto que comprende un contenido de proteínas de, como mínimo, 70% en peso de la materia seca total, y un contenido de isoflavonas de por lo menos 2 mg/g de la materia seca total, en el que dicho método comprende además una etapa de pasteurización de dicha suspensión antes de dicha etapa de ultrafiltración y las etapas de pasteurización de dicho producto y de secado por pulverización de dicho producto.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en el que la temperatura de la suspensión se reduce durante la etapa de ultrafiltración, preferentemente incluyendo un intercambiador de calor en el sistema de ultrafiltración y pasando agua fría a través del intercambiador de calor.
- 35 7. Método según la reivindicación 5, en el que dicho material de soja desgrasada contiene menos de aproximadamente 1% en peso de grasa, y por lo menos 45% en peso de proteínas.
- 40 8. Método según la reivindicación 5, en el que dicho material de soja desgrasada contiene además entre aproximadamente 30% y 40% en peso de carbohidratos y entre aproximadamente 5% y 10% en peso de humedad.
- 45 9. Método según la reivindicación 5, en el que dicho material de soja desgrasada es harina de soja o copos de soja.
- 50 10. Método según la reivindicación 5, en el que dicha lechada contiene entre aproximadamente 5% y 15% en peso de sólidos.
- 55 11. Método según la reivindicación 5, en el que dicha membrana presenta un valor de corte de peso molecular de entre 10.000 y 30.000.
- 60 12. Método según la reivindicación 5, en el que el producto presenta además un contenido de sapogenoles de soja de, como mínimo, aproximadamente 2 mg/g de la materia seca total.
- 65 13. Método según la reivindicación 6, en el que la etapa de pasteurización de dicho producto se lleva a cabo mediante cocción a chorro de vapor a una temperatura superior a aproximadamente 93°C.
- 70 14. Método que comprende las etapas de proporcionar un material de soja desgrasada; añadir agua a dicho material para formar una lechada; eliminar fibra de dicha lechada para producir una suspensión; y **caracterizado** porque incluye las etapas de ultrafiltrar dicha suspensión utilizando una membrana que presenta un valor de corte de peso molecular de 1.000.000; y recuperar un producto que comprende un contenido de proteínas de por lo menos 70% en peso de la materia seca total, un contenido de isoflavonas de por lo menos 2 mg/g de la materia seca total, y un contenido de sapogenoles de soja de, como mínimo, aproximadamente 2 mg/g de la materia seca total, en el que dicho método comprende además las etapas de secar por pulverización el producto, pasteurizar el producto antes de secar por pulverización el producto, y pasteurizar la suspensión antes de la etapa de ultrafiltración.
- 75 15. Producto alimentario o nutricional que comprende la composición de proteínas de soja según la reivindicación 1.