

**COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS DE GUISANTE QUE TIENE CALIDAD
NUTRICIONAL MEJORADA**

CAMPO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es una composición de
5 proteína de guisante de la que se mejora la calidad nutritiva,
en particular su PDCAAS, el proceso de producción de la misma
y el uso de esta composición en una composición alimenticia o
farmacéutica.

TÉCNICA ANTERIOR

10 Las necesidades diarias de proteínas se sitúan entre el 12 %
y el 20 % de la ingesta de alimentos. Estas proteínas se
suministran tanto por productos de origen animal (carne,
pescado, huevos, productos lácteos) como por alimentos
vegetales (cereales, leguminosas, algas).

15 Sin embargo, en los países industrializados, la ingestión
de proteínas se realiza predominantemente en forma de proteínas
de origen animal. Sin embargo, muchos estudios demuestran que
el consumo excesivo de proteínas de origen animal, en
detrimento de las proteínas vegetales, es una de las causas
20 del aumento de cánceres y de enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, las proteínas animales presentan muchas
desventajas, tanto en cuanto a su alergenicidad, con respecto
a las proteínas particulares de la leche o los huevos, como en
términos ambientales, en relación con los efectos dañinos de
25 la agricultura intensiva.

Por tanto, existe una demanda creciente de los fabricantes
de proteínas de origen vegetal que tienen propiedades
nutricionales y funcionales ventajosas sin presentar, sin
embargo, las desventajas de los compuestos de origen animal.

Desde la década de 1970, el guisante ha sido la planta de semillas leguminosas que se ha desarrollado de manera más extensa en Europa y principalmente en Francia, particularmente como una fuente de proteínas para piensos aunque también para alimentos de consumo humano. El guisante contiene aproximadamente un 27 % en peso de proteínas. En el presente documento, el término "guisante" se considera en su sentido más amplio e incluye, en particular, todas las variedades de tipo silvestre de "guisante liso", y todas las variedades mutantes de "guisante liso" y de "guisante arrugado", independientemente de los usos para los que en general están destinadas dichas variedades (alimentos para consumo humano, piensos y/u otros usos).

A pesar de sus cualidades innegables, las proteínas de guisante tienen un poder nutricional por debajo de las proteínas animales y de soja. De hecho, varios estudios han mostrado que su PDCAAS (siglas del inglés *protein digestibility-corrected amino acid*) es inferior a 1 (véase, por ejemplo, "Aliments à base de soja – source de protéines de haute qualité [Soy-based foods - high quality source of protein]", ENSA, agosto de 2015). La PDCAAS, o puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas, se usa para evaluar la calidad de las proteínas según dos criterios: las necesidades de aminoácidos esenciales en los seres humanos y la digestibilidad de las proteínas. Desde 1989, la OMS y la FAO recomiendan el uso de este método para determinar la calidad de las proteínas. En este método, se acepta que una proteína que desde el punto de vista nutricional es perfecta, debe obtener una puntuación de 1 (o del 100 % dependiendo de la expresión del resultado).

Muchos trabajos y estudios han intentado superar esta deficiencia que tiene la proteína de guisante. La PDCAAS inferior a 1 es debida, al menos en parte, a la presencia de factores antinutricionales coextraídos con la proteína de guisante. Se pueden mencionar, por ejemplo, los factores antitripticos que, inhibiendo la tripsina digestiva, alteran la digestión de la proteína. Por lo tanto, el solicitante ha desarrollado un procedimiento para la producción de una composición de proteínas de guisante que comprende principalmente globulinas y que tiene un bajo contenido de factores antinutricionales (véase el documento WO 2007/017572). La PDCAAS de esta composición mejora claramente alcanzando un valor del 93 % (o de 0.93) (véase "Vegetable Protein: A winner ?", C.Lefranc-Millot, 2014). Con el fin de alcanzar el valor de PDCAAS de 1, una solución muy conocida consiste en añadir a esta composición una mezcla de proteínas extraídas del trigo (véase adicionalmente en "Vegetable Protein: A winner ?", C.Lefranc-Millot, 2014). Sin embargo, esta elegante solución tiene varias desventajas, tales como la necesidad de unir varias etapas con el fin de obtener la proteína deseada y el uso de proteínas de trigo que pueden contener trazas de gluten.

Además, aunque es posible contemplar la obtención de una proteína con un PDCAAS de 1 mezclando proteínas distintas del guisante, se obtiene una mezcla que pierde las propiedades funcionales de dicha proteína del guisante, en particular, su poder emulsionante. La conservación de un poder emulsionante, a la vez que se aumenta su PDCAAS, para que pueda formularse fácilmente en las recetas de alimentos, es un requisito importante para determinadas aplicaciones industriales, en

particular, en los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad insatisfecha de una proteína extraída únicamente del guisante, cuya calidad
5 nutricional sea equivalente a la de las proteínas animales y cuyas propiedades funcionales, en particular su actividad emulsionante, siguen siendo elevadas.

Es mérito de la empresa solicitante haber realizado estudios para satisfacer estas necesidades y haber desarrollado
10 la presente invención. En particular, el solicitante ha desarrollado una composición que tiene un PDCAAS de 1 que comprende únicamente proteínas extraídas del guisante, mezclando la composición de proteínas de la solicitud WO 2007/017572, la fracción de globulina del guisante, con un
15 extracto de guisante rico en albúmina. Esta solución no habría sido contemplada por los expertos en la técnica debido a que los extractos de guisante, ricos en albúmina, también tienen un alto contenido en factores antitripticos. Los factores antitripticos son albúminas de bajo peso molecular, de 8 a
20 10 kDa, que pueden unirse de manera irreversible a los sitios activos de la tripsina. De este modo, se impide la hidrólisis gastrointestinal de las proteínas proteasas ingeridas y, por lo tanto, reducen la digestibilidad de las proteínas y sus PDCAAS. Al lograr la reducción del contenido de factores
25 antitripticos en extractos de guisante ricos en albúmina y combinándolos con extractos de guisante ricos en globulina, el solicitante ha podido obtener una composición de proteínas de guisante que tiene una excelente calidad nutricional.

Además, la mezcla de la composición proteica de la solicitud WO 2007/017572, la fracción de globulina del guisante, con un extracto de guisante rico en albúmina, se realiza:

- 5 - utilizando un extracto de guisante rico en albúmina, cuya actividad emulsionante particular es superior a 600 ml de aceite por gramo de proteínas, preferentemente superior a 800 ml de aceite por gramo de proteínas, e incluso más preferentemente superior a 1000 ml de aceite por gramo de proteínas;
- 10 - y realizando esta mezcla mezclando en húmedo, secando después la solución así obtenida, preferentemente, mediante secado por pulverización.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 Un primer objeto de la presente invención es una composición de proteínas de guisante que comprende globulinas y albúminas, caracterizada por que el extracto de sólidos de la composición:

- 20 - comprende al menos el 80 % en peso, preferentemente del 80 al 99 % en peso, más preferentemente del 85 al 98 % en peso, del 90 al 97 % en peso, del 92 al 95 % en peso, de proteínas con respecto al peso del extracto de sólidos;
- tiene una relación en masa de globulinas con respecto a albúminas de 65/35 a 85/15, preferentemente de 70/30 a 82/18, más preferentemente de 75/25 a 80/20.

25 Preferentemente, la composición se caracteriza por una actividad emulsionante mayor de 300 ml de aceite por gramo de proteínas, preferentemente, entre 300 y 500 ml de aceite por gramo de proteínas, preferentemente entre 350 y 450.

Un segundo objeto de la presente invención es un procedimiento para la producción de una composición de proteínas de guisante que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) extraer las globulinas y albúminas del guisante con el fin de obtener una fracción de proteínas;
- b) separar las globulinas de las albúminas con el fin de obtener una fracción enriquecida en globulina y una fracción enriquecida en albúmina;
- 10 c) reducir el contenido de factores antitripticos en la fracción enriquecida en albúmina con el fin de obtener una fracción tratada enriquecida en albúmina;
- d) ajustar el pH y después calentar la fracción tratada enriquecida en albúmina para obtener una fracción termizada enriquecida en albúmina, cuya actividad emulsionante sea superior a 600 ml de aceite por gramo de proteínas, preferentemente superior a 800 ml de aceite por gramo de proteínas, incluso más preferentemente superior a 1000 ml de aceite por gramo de proteínas;
- 15 e) mezclar, en presencia de agua, la fracción enriquecida en globulina y la fracción termizada enriquecida en albúmina, de modo que el extracto de sólidos de la mezcla tenga una relación en masa de globulinas con respecto a albúminas de 65/35 a 85/15, preferentemente de 70/30 a 82/18, más preferentemente de 75/25 a 80/20;
- 20 f) secar la solución obtenida de esta manera.

Preferentemente, la etapa d) se lleva a cabo ajustando el pH entre 6 y 8, preferentemente entre 6.5 y 7.5, y calentando entre 130°C y 150°C, preferentemente a 140°C, con un tiempo de tratamiento entre 5 y 15 segundos, preferentemente 10 segundos.

30

Preferentemente, la etapa f) se lleva a cabo mediante secado por pulverización, preferentemente mediante secado por pulverización "multietapa".

5 Un tercer objeto de la presente invención es el uso de la composición de proteínas de guisante según la invención en una composición alimenticia o farmacéutica.

En la presente solicitud de patente, el término "guisante" debe entenderse en el sentido de todas las variedades naturales
10 de "guisante liso" y todas las variedades mutantes de "guisante liso" y de "guisante arrugado".

En la presente solicitud de patente, el término "proteína" debe entenderse en el sentido de macromoléculas formadas por una o más cadenas polipeptídicas que consisten en la secuencia
15 de restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. En el contexto específico de proteínas del guisante, la presente invención se refiere más particularmente a las globulinas (aproximadamente el 50-60 % en peso de proteínas de guisante) y a las albúminas (del 20-25 % en peso de proteínas
20 de guisante). Las globulinas de guisante se subdividen principalmente en tres subfamilias: leguminas, vicilinas y convicilinas. La albúmina de guisante se subdivide principalmente en dos familias denominadas PA1 y PA2.

En la presente solicitud, la expresión "factores
25 antitripticos" debe entenderse en el sentido de todos los compuestos que tienen una actividad que inhibe las proteasas digestivas, en particular la tripsina. El método para calcular el contenido de factores antitripticos en la composición según la invención, se detalla en los ejemplos de la presente
30 solicitud.

En la presente invención debe entenderse que el término "PDCAAS" significa puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas. Este método es el que más se utiliza para estimar la calidad de las proteínas de los alimentos destinados al consumo humano. La PDCAAS evalúa la calidad de las proteínas según dos criterios: las necesidades de aminoácidos esenciales de los seres humanos según las recomendaciones de la FAO y la digestibilidad de las proteínas. Desde 1989, la OMS y la FAO recomiendan el uso de este método para determinar la calidad de las proteínas. En este método, se acepta que una proteína que desde el punto de vista nutricional es perfecta, debe obtener una puntuación de 1 (o del 100 % dependiendo de la expresión del resultado). El método para calcular la PDCAAS de la composición según la invención se detalla en los ejemplos de la presente solicitud.

La expresión "actividad emulsionante" debe entenderse en el sentido de cantidad máxima de aceite que puede dispersarse en una solución acuosa que contenga una cantidad definida de emulsionante antes de la descomposición o inversión de fase de la emulsión (Sherman, P., 1995). A critique of some methods proposed for evaluating the emulsifying capacity and emulsion stabilizing performance of vegetable proteins. Ital. J. Food Sci., 1: 3.). Para cuantificarla, el solicitante ha desarrollado un ensayo que permite cuantificarla de manera fácil, rápida y reproducible. Esta expresión también se conoce como "Concentración Micelar Crítica" o "CMC".

Los diversos objetos de la invención se entenderán mejor en la siguiente descripción detallada de la invención.

La composición que es el objeto de la presente invención es una composición de proteínas de guisante que comprende globulinas y albúminas.

En lo sucesivo, los términos "proteínas", "globulinas" y "albúminas", indican, respectivamente, proteínas, globulinas y albúminas extraídas solo del guisante. Por tanto, la proteínas, globulinas y albúminas extraídas de una fuente vegetal distinta de guisante o de una fuente animal no se incluyen en estos términos. Las globulinas pueden diferenciarse de las albúminas por diversos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, en particular por su solubilidad en agua, siendo las albúminas solubles en agua pura, mientras que las globulinas solo son solubles en agua salada. También es posible identificar las albúminas y globulinas presentes en una mezcla por electroforesis o cromatografía.

El extracto de sólidos de la composición según la invención comprende al menos el 80 % en peso, preferentemente del 80 al 99 % en peso, más preferentemente del 85 al 98 % en peso, del 90 al 97 % en peso, del 92 al 95 % en peso de proteínas con respecto al peso del extracto de sólidos. Para cuantificar el nivel de proteína puede usarse cualquier método de ensayo de referencia bien conocido por los expertos en la materia. Preferentemente, el nitrógeno total (en %/bruto) se somete a ensayo y el resultado se multiplica por el coeficiente 6.25. Esta metodología bien conocida en el campo de las proteínas vegetales se basa en la observación de que las proteínas contienen un promedio de nitrógeno del 16 %. También puede usarse cualquier método de ensayo de materia seca bien conocido por los expertos en la técnica.

Además, el extracto de sólidos de la composición según la invención tiene una relación en masa de globulinas con respecto a albúminas de 65/35 a 85/15, preferentemente de 70/30 a 82/18, más preferentemente de 75/25 a 80/20.

5 Según una realización particular, las albúminas contenidas en la composición según la invención consisten esencialmente en albúminas del tipo PA1 y PA2 y lectinas. Por tanto, el porcentaje en peso de los factores antitripticos con respecto al peso de las proteínas de la composición según la invención
10 es menor que el porcentaje en peso de los factores antitripticos con respecto al peso de las proteínas en el guisante en el estado natural. preferentemente, el extracto de sólidos de la composición según la invención, tiene un contenido de factores antitripticos de 1 a 5 UIT/mg. El
15 contenido de factores antitripticos en particular puede medirse según el método descrito a continuación.

Las albúminas de la composición según la invención tienen una actividad emulsionante superior a 600, preferentemente superior a 800, más preferentemente superior a 1000 ml de
20 aceite de maíz por gramo de albúminas.

La actividad emulsionante se define como la cantidad máxima de aceite que puede dispersarse en una solución acuosa que contiene una cantidad definida de emulsionante antes de la descomposición o inversión de fases de la emulsión (Sherman,
25 1995). Para cuantificarla, el solicitante ha desarrollado un ensayo que permite cuantificarla de manera fácil, rápida y reproducible. Este procedimiento consiste en realizar las siguientes etapas:

1. dispersión de 0.2 g de la muestra del producto en 20 ml
30 de agua;

2. homogeneización de la solución con un dispositivo Ultraturax IKA T25 durante 30 segundos a una velocidad de 9500 revoluciones por minuto (rpm);

3. adición de 20 ml de aceite de maíz comercializado con el nombre de Amphora por la empresa Cargill, homogeneizando en las mismas condiciones que las de la etapa 2 anterior;

4. centrifugación durante 5 minutos a 3100 g;

a. si se obtiene una buena emulsión, el ensayo se reinicia en la etapa 1, aumentando un 50 % las cantidades de agua y de aceite de maíz;

b. si se obtiene una emulsión pobre, por ejemplo, una separación de fases, el ensayo se reinicia en la etapa 1, reduciendo las cantidades de agua y aceite de maíz en un 50 %.

Por tanto, la cantidad máxima de aceite ($C_{\text{máx}}$ en ml) que puede emulsionarse se determina de forma iterativa.

Por lo tanto, la actividad emulsionante es la cantidad máxima de aceite de maíz que puede emulsionarse por gramo de producto.

$$\text{Actividad emulsionante} = (C_{\text{máx}} / 0.2) \times 100$$

Las albúminas que tienen una actividad emulsionante superior a 600 ml de aceite de maíz por gramo de albúmina pueden obtenerse, en particular, calentando una fracción de proteínas constituida por albúminas, como se describe en la etapa d) del procedimiento indicado a continuación.

Según una realización particular, la composición según la invención tiene una PDCAAS igual a 1 (o de 100 % dependiendo de la expresión de los resultados). De hecho, el bajo contenido de factores antitripticos en la composición según la invención la proporciona buena digestibilidad. La relación en masa de

globulinas con respecto a albúminas en la composición según la invención también contribuye a un buen equilibrio de aminoácidos. La presencia de albúminas permite en particular enriquecer la composición con aminoácidos portadores de azufre. Por tanto, la composición según la invención tiene excelente calidad nutricional.

La composición según la invención puede obtenerse, en particular, mediante el procedimiento para la producción de una composición de proteínas de guisante descrito a continuación.

El procedimiento para la producción de una composición de proteínas de guisante que es el objeto de la presente invención comprende una etapa a) en la que las globulinas y las albúminas se extraen del guisante con el fin de obtener una fracción de proteínas.

Según una realización preferida, en la etapa a) las globulinas y las albúminas se extraen del guisante con un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

a-i) moler los guisantes;

a-ii) introducir los guisantes molidos en una solución acuosa con el fin de obtener una fase sólida A suspendida en una fase líquida B; y

a-iii) separar la fase líquida B, correspondiente a la fracción de proteínas, de la fase sólida A.

Un procedimiento de este tipo se describe en particular en la solicitud de patente EP1400537.

Los guisantes utilizados en la etapa a-i) pueden haberse sometido previamente a etapas bien conocidas por los expertos en la materia, tales como, en particular, limpieza (eliminación de partículas no deseadas, tales como piedras, insectos muertos,

residuos de tierra, etc.) o incluso eliminación de las fibras externas del guisante (cáscara externa de celulosa) mediante una etapa paso bien conocida denominada "descascarillado".

5 En la etapa a-i), los guisantes pueden molerse en ausencia de agua (un procedimiento conocido como "molienda en seco"). Según una realización alternativa, los guisantes pueden molerse en presencia de agua (un procedimiento conocido como "molienda en húmedo"). En este caso, la etapa a-ii) no se implementa ya que al final de la etapa de molienda en húmedo se obtiene una
10 fase sólida A directamente en suspensión en una fase líquida B.

En la etapa a-ii), el pH de la solución acuosa puede oscilar, en particular, entre 6.2 y 7 y la temperatura de la solución acuosa puede oscilar, en particular, entre 5 y 20°C.

15 La etapa a-iii) permite separar la fase líquida B de la fase sólida A. La fase líquida B corresponde a la fracción de proteínas y también se denomina "fracción soluble". Contiene proteínas, en particular, globulinas y albúminas, y también otros compuestos que son solubles en la fase acuosa, en particular, sales, aminoácidos e hidratos de carbono. Por su
20 parte, la fase sólida A contiene fibras de guisante y almidón.

Preferentemente, la fase líquida B y la fase sólida A se separan mediante fraccionamiento. En particular, la separación mediante fraccionamiento puede llevarse a cabo mediante
25 decantadores centrífugos o hidrociclones.

El procedimiento según la invención comprende una etapa b) en la que las globulinas y las albúminas se separan con el fin de obtener una fracción enriquecida con globulina y una fracción enriquecida con albúmina.

Las expresiones "fracción enriquecida en globulina" y "fracción enriquecida en albúmina" quieren decir una fracción que tiene un porcentaje en peso de globulinas, respectivamente de albúminas, con respecto al peso de proteínas en dicha fracción, que es mayor que el porcentaje en peso de globulinas, respectivamente de albúminas, con respecto al peso de proteínas en guisantes en su estado natural. Por lo tanto, el enriquecimiento corresponde al aumento porcentual en la proporción de globulinas, respectivamente de albúminas, entre guisantes en su estado natural y la fracción enriquecida. En particular, el enriquecimiento de la fracción enriquecida es de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en comparación con guisantes en su estado natural. En particular, el enriquecimiento puede obtenerse mediante purificación y/o concentración de las fracciones de proteína de interés en cuanto a globulinas y albúminas. Estas fracciones, dependiendo del procedimiento aplicado, pueden estar en forma hidratada o seca.

La etapa b) en particular pueden llevarse a cabo mediante precipitación de las proteínas a su pH isoelectrico o mediante separación en membrana, por ejemplo, mediante ultrafiltración.

Según una realización preferida, en la etapa b), las globulinas se separan de las albúminas con un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

b-i) flocular globulinas de la fracción de proteínas con el fin de obtener una fase sólida C suspendida en una fase líquida D; y

b-ii) separar la fase líquida D, que contiene las albúminas, de la fase sólida C, que contiene las globulinas.

Preferentemente, en la etapa b-i), la floculación de las globulinas se lleva a cabo llevando el pH de la fracción de proteína al pH isoelectrico de las globulinas. Más preferentemente, el pH de la fracción de proteínas se ajusta a 4.5. La floculación de las proteínas en particular puede llevarse a cabo calentando la fracción de proteínas a una temperatura de 30 a 70°C, en particular durante 5 a 30 minutos, más particularmente entre 10 y 30 minutos.

En la etapa b-ii), la fase sólida C (también denominada "floc") se separa preferentemente de la fase líquida D mediante centrifugación. La fase sólida C corresponde a la fracción enriquecida en globulina y comprende las globulinas. La fase líquida D corresponde a la fracción enriquecida en albúmina y comprende las albúminas y también otros compuestos que son solubles en la fase acuosa, en particular sales, aminoácidos e hidratos de carbono.

El procedimiento según la invención comprende una etapa c) en la que el contenido de factores antitripticos en la fracción enriquecida en albúmina se reduce con el fin de obtener una fracción tratada enriquecida en albúmina.

Según una realización preferida, en la etapa c,) la fracción tratada enriquecida en albúmina tiene un contenido de factores antitripticos en el extracto de sólidos de 20 a 80 UIT/mg, preferentemente de 30 a 50 UIT/mg.

Preferentemente, en la etapa c), el contenido de los factores antitripticos en la fracción enriquecida en albúmina se reduce con un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

c-i) llevar a cabo una microfiltración o una centrifugación de la fracción enriquecida en albúmina con el fin de

obtener un filtrado de microfiltración o un sobrenadante de centrifugación; y

5 c-ii) llevar a cabo una ultrafiltración de dicho filtrado de microfiltración o de dicho sobrenadante de centrifugación con el fin de obtener un retenido de ultrafiltración, correspondiente a la fracción tratada enriquecida en albúmina.

La microfiltración de la etapa c-i) da como resultado un filtrado de microfiltración y un retenido de microfiltración.
10 Es el filtrado el que posteriormente se trata en la siguiente etapa c-ii) de ultrafiltración. A su vez, la centrifugación de la etapa c-i) da como resultado un sobrenadante de centrifugación y un sedimento de centrifugación. Es el sobrenadante el que posteriormente se trata en la siguiente
15 etapa c-ii) de ultrafiltración.

Cuando la etapa c-i) es una microfiltración, esta es, preferentemente, una microfiltración en membrana tangencial. Más particularmente, la microfiltración tangencial se lleva a cabo preferentemente con una membrana de cerámica que tiene
20 una porosidad que varía de 0.01 μm a 1 μm , preferentemente de 0.05 μm a 0.5 μm .

La etapa c-ii) de ultrafiltración se lleva a cabo en el permeado de microfiltración o en el sobrenadante de centrifugación. Esta etapa permite obtener, por un lado, un
25 retenido de ultrafiltración rico en albúmina y, por otro lado, un filtrado rico en sales, aminoácidos e hidratos de carbono. Más particularmente, se recomienda llevar a cabo la ultrafiltración usando una membrana que tenga un umbral límite de entre 0.1 y 0.5 μm , manteniéndose la presión transmembrana por debajo de 4 bares (400 kpa).
30

El procedimiento según la invención comprende una etapa d) en la que la fracción tratada enriquecida en albúmina se somete a un ajuste de pH y después a un calentamiento para obtener una fracción termizada enriquecida en albúmina. Esta etapa permite, en particular, obtener albúminas con una actividad emulsionante superior a 600 ml de aceite de maíz por gramo de albúminas.

Según una realización preferida, en la etapa d), el pH de la fracción tratada enriquecida en albúmina, se ajusta a un valor entre 6 y 8, preferentemente entre 6.5 y 7.5. El pH de la fracción tratada enriquecida en albúmina, puede ajustarse, en particular, añadiendo una base seleccionada de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco acuoso, preferentemente hidróxido de sodio. Debe apreciarse que el uso de carbonato tiene que evitarse ya que tiene una acción perjudicial sobre el sabor de la fracción de albúmina obtenida.

El calentamiento de la fracción tratada enriquecida en albúmina después de ajustar el pH puede ser, en particular, un calentamiento UHT, es decir, un calentamiento a una temperatura muy alta durante un corto periodo de tiempo. Según una realización preferida, en la etapa d), la fracción tratada enriquecida en albúmina se calienta a una temperatura entre 130°C y 150°C, preferentemente a 140°C, durante un período de entre 5 y 15 segundos, preferentemente 10 segundos.

El procedimiento según la invención comprende una etapa e) en la que se mezclan la fracción enriquecida en globulina y la fracción termizada enriquecida en albúmina, de manera que el extracto de sólidos de la mezcla tenga una relación en masa de globulinas con respecto a albúminas de 65/35 a 85/15,

preferentemente de 70/30 a 82/18, más preferentemente de 75/25 a 80/20.

La fracción enriquecida en globulina y la fracción termizada enriquecida en albúmina se mezclan en un ambiente húmedo, y después, dicha mezcla se seca. El mezclado en un ambiente húmedo en particular puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para este fin, preferentemente equipado con un sistema de agitación adecuado, tal como un eje móvil equipado con palas o turbinas. Después de obtener una mezcla homogénea, ésta se seca utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, tales como secado por pulverización, preferentemente, secado por pulverización "multietapa", o si no liofilización.

El procedimiento según la invención también puede comprender una o más etapas opcionales antes y/o después de una de las etapas a) b) c), d) o e). Según una realización particular, el procedimiento según la invención puede comprender, entre la etapa c) y e), una etapa de hidrólisis enzimática de la fracción de proteína enriquecida en globulina y/o de la fracción de proteína tratada enriquecida en albúmina. El tipo de enzima que se usa en la reacción de hidrólisis enzimática es, preferentemente, una enzima del grupo de proteasas.

Sin ligarse a ninguna teoría, el solicitante se dio cuenta de que es la elección

- de una fracción rica en albúmina que se caracteriza por una actividad emulsionante superior a 600 ml de aceite por gramo de proteína, preferentemente superior a 800 ml de aceite por gramo de proteína, e incluso más

preferentemente superior a 1000 ml de aceite por gramo de proteína

- después de su mezclado en húmedo con una fracción rica en globulina, seguido de secado de la solución así obtenida, preferentemente, mediante secado por pulverización

lo que permite obtener las propiedades únicas de la composición que es el objeto de la presente invención.

Un objeto de la presente invención es también el uso de la composición de proteínas de guisante según la invención en una composición alimenticia o farmacéutica.

De hecho, debido a su excelente calidad nutricional y a su baja alergenicidad, una composición de proteínas de guisante de este tipo es de gran interés en muchas aplicaciones industriales, en particular, en el procesamiento de alimentos o en la industria farmacéutica y en piensos para animales.

Por composición alimenticia se entiende que es una composición destinada a la alimentación de seres humanos o de animales. La expresión composición alimenticia incluye alimentos y complementos alimenticios. Por composición farmacéutica se entiende que es una composición destinada a un uso terapéutico.

Los siguientes ejemplos permiten ilustrar mejor la solicitud, sin embargo, sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1: Producción de harina de guisante y de fracciones enriquecidas respectivamente con globulinas de guisante y albúminas de guisante

Inicialmente se prepara harina de guisante moliendo guisantes forrajeros sin cáscara en un molino de martillo

Alpina equipado con una rejilla de 100 μm . Esta harina se denominará "harina de guisante".

Después, se sumergen en agua 300 kg de harina de guisante que contiene 87 % en peso de materia seca a la concentración final de 25 % en peso de materia seca (MS), a un pH de 6.5. A
5 continuación se introducen 1044 kg de suspensión de harina que contiene 25 % en peso de MS (por lo tanto, 261 kg de harina seca) con 500 kg de agua en una batería de hidrociclones compuesta de 14 fases. A esta se la suministra la suspensión
10 de harina en la fase n.º 5. Esta separación da lugar a la obtención de una fase ligera que corresponde al producto de la fase n.º 1. Esta consiste en una mezcla de proteínas, fibras y materia soluble. Esta fase ligera en la salida del hidrociclón contiene como una mezcla (142 kg de MS en total: fibras
15 (aproximadamente el 14.8 % en peso, es decir, 21 kg de MS), proteínas (aproximadamente el 42.8 % en peso, es decir, 60.8 kg de MS) y materia soluble (aproximadamente el 42.4 % en peso, es decir, 60.2 kg de MS). Esta fracción tiene un contenido de MS del 11.4 % en peso. Las fibras se separan en decantadores
20 centrífugos de tipo Westfalia usados en una unidad industrial de procesamiento de almidón de patata. La fase ligera a la salida del decantador centrífugo contiene una mezcla de proteínas y materia soluble, mientras que la fase pesada contiene las fibras de guisante. La fase pesada contiene 105 kg
25 de fibras en el 20 % en peso de MS. Se aprecia que casi todas las fibras se encuentran, de hecho, en esta fracción. En cuanto a la fracción de proteína y materia soluble, esta contiene 1142 kg de una mezcla en solución de materia soluble y proteínas (fracción que contiene el 6 % en peso de MS). Las
30 proteínas se flocculan a su punto isoeléctrico ajustando la fase

ligera a la salida del decantador centrífugo hasta un pH de 4.5 y calentando a 50°C. Las proteínas así floculadas se dejan durante 10 minutos en un tanque de maduración. Después de la precipitación de las proteínas, se lleva a cabo la decantación centrífuga, lo que permite recuperar sedimentos que contienen 56 kg de proteínas (86 % de Nx6.25 en seco) que contienen el 20 % en peso de MS, y un sobrenadante que contiene, entre otros, la fracción de proteínas que contiene las albúminas. Este sedimento corresponde a la fracción de proteína enriquecida en globulinas y se denominará "fracción enriquecida en globulina". El sobrenadante corresponde a la fracción de proteínas enriquecida en albúminas y se denominará "fracción enriquecida en albúmina".

Después, se refina la fracción enriquecida en albúmina. Se ajusta su pH a 7.0 añadiendo hidróxido de sodio al 50 %. La temperatura de la suspensión así obtenida se llevó a 70°C. La solución se bombea a través de una unidad de microfiltración equipada con membranas de cerámica del tipo Inside Ceram® que tienen un umbral límite de 0.14 µm (19 canales de 4.5 mm). Durante la filtración, la temperatura se regula a 60°C y la presión transmembrana se mantiene a un valor entre 0.4 y 0.6 bares (40 y 60 kpa). Por tanto, se recuperan 707 litros de filtrado de microfiltración y 1768 litros de retenido de microfiltración. Se bombean 550 litros del filtrado a través de una unidad de ultrafiltración. La unidad de ultrafiltración está equipada con membranas de cerámica de tipo Kerasep® BX comercializadas por la empresa Novasep y que tienen un umbral límite de 15 kDa (7 canales de 6 mm). Durante la filtración, la temperatura se regula a 60°C y la presión transmembrana se mantiene a un valor entre 1 y 3 bares (100 y 300 kpa). Por

tanto se recuperan 467 litros de filtrado de ultrafiltración y 33 litros de retenido que contiene 75 % en peso de proteínas en el 7.2 % en peso de MS. Este filtrado de ultrafiltración corresponde a la fracción tratada de proteínas enriquecida en albúminas y se denominará "fracción tratada enriquecida en albúmina".

Después, el pH de la fracción tratada enriquecida en albúmina se ajusta a un pH de 6.8 añadiendo, mientras se agita, hidróxido de sodio concentrado al 50 %. Después, se aplica tratamiento térmico UHT haciendo pasar la fracción tratada enriquecida en albúmina sobre una plataforma Vimatec, a una temperatura de 140°C durante un tiempo de contacto de aproximadamente diez segundos y después a una pasteurización relámpago al vacío a aproximadamente 90°C. El producto final se denominará "fracción termizada enriquecida en albúmina".

Ejemplo 2: Producción de composiciones de proteínas de guisante según la invención

Se usa un tanque de acero inoxidable equipado con un agitador motorizado. En este tanque se introducen 1.89 kg de "fracción enriquecida en globulina" y 2 kg de "fracción termizada enriquecida en albúmina". Esta mezcla permite obtener una relación, expresada como porcentaje relativo de materia seca, entre la "fracción enriquecida en globulina" y la "fracción termizada enriquecida en albúmina", de 75/25. Después, el agitador motorizado se pone en marcha y el producto se homogeneiza durante 15 a 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se envía a una torre de secado por pulverización de una sola etapa para secarse. Por tanto, se recupera un polvo que contiene 95 % en peso de MS. El producto se denominará "composición de proteínas de guisante 75/25".

Se usa de nuevo el tanque de acero inoxidable anterior equipado con un agitador motorizado. En este tanque se introducen 2.5 kg de "fracción enriquecida en globulina" y 2 kg de "fracción termizada enriquecida en albúmina". Esta mezcla permite obtener una relación, expresada como porcentaje relativo de materia seca, entre la "fracción enriquecida en globulina" y la "fracción termizada enriquecida en albúmina", de 80/20. Después, el agitador motorizado se pone en marcha y el producto se homogeneiza durante 15 a 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se envía a una torre de secado por pulverización de una sola etapa para secarse. Por tanto, se recupera un polvo que contiene 96 % en peso de MS. El producto se denominará "composición de proteínas de guisante 80/20".

Ejemplo 2a: Producción de composiciones de proteínas de guisante fuera de la invención, usando "fracciones tratadas enriquecidas en albúmina"

Se usa un tanque de acero inoxidable equipado con un agitador motorizado. En este tanque se introducen 1.89 kg de "fracción enriquecida en globulina" y 2 kg de "fracción tratada enriquecida en albúmina". Como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2, esta fracción no se neutraliza a 6.8 y no se somete a tratamiento UHT. Esta mezcla permite obtener una relación expresada como el porcentaje relativo de materia seca entre la "fracción enriquecida en globulina" y la "fracción tratada enriquecida en albúmina" de 75/25. Después, el agitador motorizado se pone en marcha y el producto se homogeneiza durante 15 a 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se envía a una torre de secado por pulverización de una sola etapa para secarse. Por tanto, se recupera un polvo que contiene 95 % en

peso de MS. El producto se denominará "composición de proteínas de guisante 75/25".

Ejemplo 3: Metodología para calcular la digestibilidad y la PDCAAS

5 La medición de la digestibilidad de las proteínas en ratas se describe en el siguiente artículo de la FAO: "Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Roma, Italia".

10 Para esto, el alimento del experimento está compuesto por 10 % en peso de las proteínas que van a someterse a ensayo, 1 % en peso de una mezcla de vitaminas AIN93, el 3.5 % en peso de una mezcla mineral AIN93, 0.2 % en peso de bitartrato de colina, 5 % en peso de celulosa y 10 % en peso de aceite de maíz. El alimento se constituye hasta al 100 % con almidón de
15 maíz.

Este mismo alimento que no contiene proteínas, se usará como control en el ensayo. Para esto, las proteínas se reemplazarán por almidón de maíz.

20 Ratas Sprague-Dawley en crecimiento (con un peso entre 50 y 70 g al comienzo del ensayo) se alojarán individualmente en jaulas de metabolismo a una temperatura de entre 18 y 24°C y una humedad de entre 40 y 70 %. Las ratas recibirán una alimentación estándar al menos 2 días antes del comienzo del ensayo. Después se alimentan con las dietas del experimento
25 durante un mínimo de 9 días que consiste en un primer período de aclimatación a las dietas de 4 días seguido de un período de 5 días de recogida de heces. Durante el estudio se proporciona agua a voluntad. Las heces así recogidas se pesan diariamente, se liofilizan durante 24 horas y se muelen. La
30 medición del nitrógeno contenido en el alimento y en las heces

permitirá calcular la digestibilidad de las proteínas. El método de medición usado es el método de Kjeldahl.

El nitrógeno ingerido y el nitrógeno excretado se obtiene multiplicando la ingestión de alimento o el peso de las heces por los niveles de nitrógeno respectivos. El nivel de nitrógeno basal se obtiene midiendo el nitrógeno fecal de los animales alimentados con la dieta que no contiene proteínas.

La digestibilidad de las proteínas se obtiene de la siguiente manera:

Digestibilidad = $[\text{Nitrógeno ingerido} - (\text{Nitrógeno fecal} - \text{Nitrógeno basal})] / \text{Nitrógeno ingerido} \times 100$

El aminograma o perfil de aminoácidos totales se establece usando la norma NF EN ISO13903: 2005 método oficial.

Se determina que la puntuación de aminoácidos es el aminoácido esencial limitante con respecto al perfil de referencia determinado en adultos. Para obtenerlo, debe calcularse la siguiente relación: $[\text{mg del aminoácido contenido en 1g de la proteína de ensayo}] / [\text{mg del aminoácido del perfil de referencia}]$. El valor más pequeño representa la puntuación de aminoácidos.

La PDCAAS (puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad de proteínas) se obtiene multiplicando esta puntuación de aminoácidos limitante por la digestibilidad de las proteínas determinada en ratas.

El perfil de referencia en adultos lo describe la FAO en su artículo: "Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation". Ginebra, Suiza. 2007".

Aminoácido esencial	g/g de proteína
Histidina	15

5	Isoleucina	30
	Leucina	59
	Lisina	45
	Metionina	16
	Cisteína	6
10	Metionina + Cisteína	22
	Fenilalanina + Tirosina	30
	Treonina	23
	Triptófano	6
	Valina	39

Ejemplo 4: Metodología para medir el contenido de factores antitripticos

El método para medir el contenido de factores antitripticos consiste en extraer los inhibidores de tripsina con hidróxido de sodio. Los volúmenes crecientes de la muestra diluida se ponen en contacto con un exceso de tripsina en presencia de N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) que después se hidrolizará en forma de p-nitroanilina, un compuesto que se absorbe a 410 nm. Después del bloqueo de la reacción con ácido acético, el aumento en la coloración se mide con un espectrofotómetro a 410 nm. Después se calcula el contenido del inhibidor a partir de la tasa de disminución en la coloración. Una unidad de tripsina se define de manera arbitraria como la cantidad de enzima necesaria para provocar un aumento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción en las condiciones del método AOCS Ba 12-75. El contenido de factor antitriptico se expresa en unidades de inhibición de tripsina por mg de muestra que se va a someter a ensayo (UIT/mg).

Ejemplo 5: Comparación de las diversas fracciones

En la siguiente tabla se resumen los análisis de la PDCAAS (según el ejemplo 3), del contenido de factores antitripticos (según el ejemplo 4) y de la capacidad emulsionante (según el método explicado en la descripción).

5

10

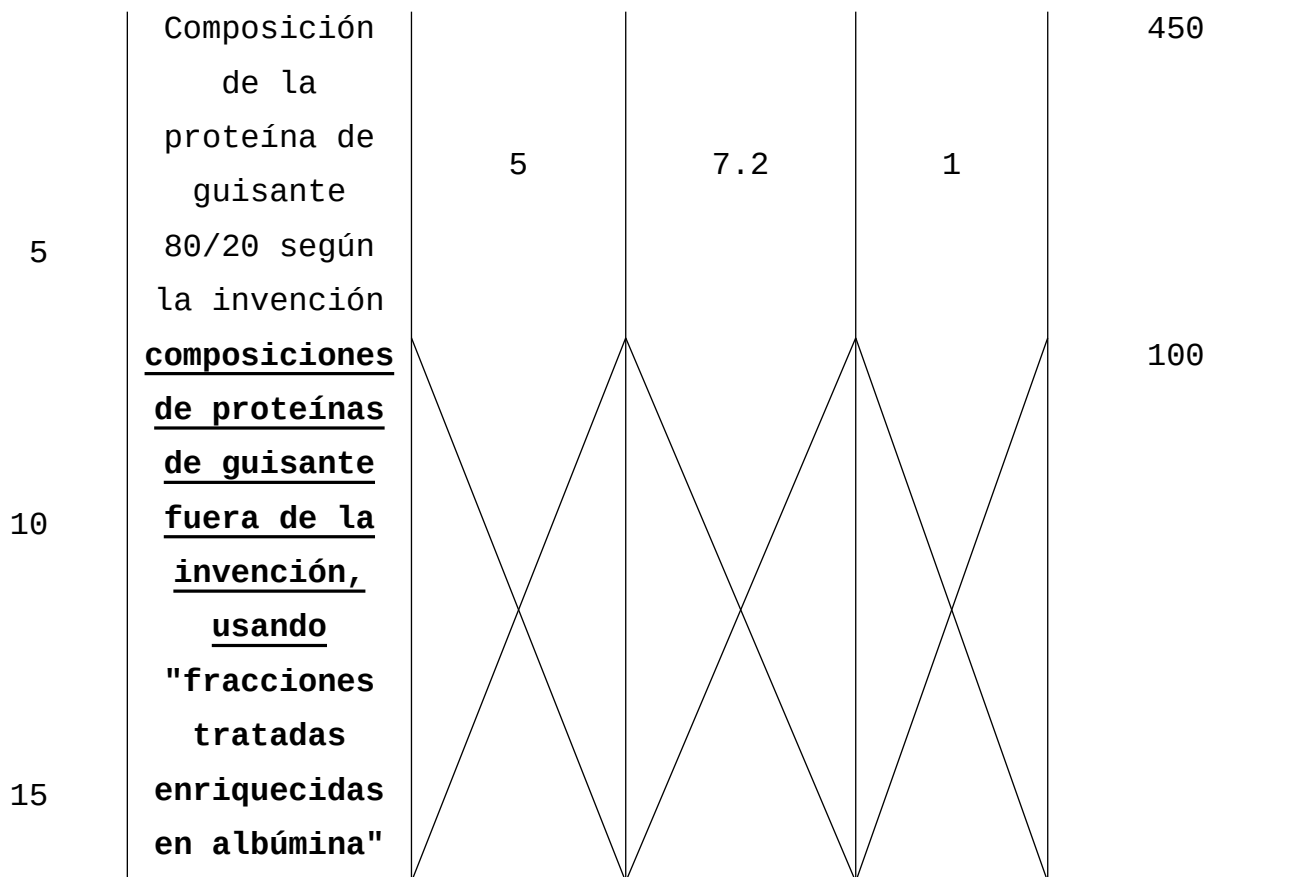
15

20

25

30

Referencia	Contenido de factores antitripticos (UIT/mg)	Digestibilidad	PDCAAS	Capacidad emulsionante (en ml de aceite por g de proteínas)
Harina de guisante	No realizado	77.3	0.63	
Fracción enriquecida en globulina	3	97.3	0.93	
Fracción tratada enriquecida en albúmina	41	96.9	0.56	500
Fracción termizada enriquecida en albúmina	9.8	97.1	No realizado	1300
Composición de la proteína de guisante 75/25 según la invención	4	97.0	1	400



Estos ejemplos demuestran claramente la concentración de factores antitripticos en la fracción enriquecida en albúmina, lo que confirma, por tanto, la enseñanza general del campo técnico que indica que estas fracciones de bajo peso molecular e hidrosolubles, son ricas en factores antitripticos. Por lo tanto, con la intención de mejorar las PDCAAS de la fracción enriquecida en globulina, se habría disuadido a los expertos en la técnica a reutilizar esta fracción. En su lugar, habrían optado por usar fuentes complementarias tales como proteínas de trigo, como se enseña en la técnica anterior. El solicitante ha ido más allá de esta enseñanza y ha desarrollado una solución que permite obtener una proteína cuya PDCAAS es igual a 1 basándose únicamente en fracciones de proteínas derivadas del guisante.

Ejemplo 8: Producción de una bebida de tipo "lista para beber"

Las distintas composiciones se comparan en virtud de su uso en la formulación de bebidas denominadas "Listas para beber". En la siguiente tabla se resumen los diversos componentes:

	Control de leche al 100 %	Control de aislado conven cional	Inven ción 1	Invenci ón 2	Fuera de la invenci ón
agua	60				
Maltodextrin a GLUCIDEX® IT19 (ROQUETTE)	18.7 4	18.3 4	18.51	18.51	18.5 1
Proteína láctea MPI Prodiet 85b	10.8	5.53	5.53	5.53	5.53
Aislado de guisante Nutralys S85F	0	5.67	0	0	0
Composición de la proteína de guisante 75/25 según la invención	0	0	5.5	0	0

5	Composición de la proteína de guisante 80/20 según la invención	0	0	0	5.5	0
10	Composiciones de proteínas de guisante fuera de la invención, usando "fracciones tratadas enriquecidas en albúmina"	0	0	0	0	5.5
15	aceite de colza	3.78				
20	sacarosa	3.4				
20	aceite de girasol	2.52				
25	lecitina de soja	0.4				
25	aromatizante de vainilla	0.36				

El procedimiento de producción de bebidas es el siguiente:

- Mezclar en seco los polvos (proteínas, maltodextrinas y sacarosa),

- Calentar agua a 50°C, añadir los polvos, dispersar con un agitador Silverson durante 30 min a 50°C, 3500 rpm, añadir aromatizante de vainilla,
- Mezclar y fusionar por separado la lecitina de soja y el aceite a 50°C,
- Después de 30 minutos, añadir la mezcla de lecitina/aceite a la solución acuosa, mezclando con intensidad durante 5 minutos a 10000 rpm,
- Calentar a 75°C
- Homogeneizar en dos etapas a 200 bares (20000 kpa)
- Enfriar y conservar a 4 °C.

Para cuantificar la calidad de la emulsión en las bebidas, el tamaño de las partículas se mide con un analizador de tamaño de partícula 3000 de la compañía Malvern. Dmode representa el tamaño medio de las partículas emulsionadas.

en micrómetros	Leche al 100 % control	Aislado convencional control	Inven ción 1	Inven ción 2	Fuera de la invención
D10	0.186	0.565	0.203		3.61
D50	0.546	43.1	0.482		9.34
D90	1.66	105	6.2		103
D mode	0.577	69.1	0.444		6.19
D 4,3	3.48	47.9	3.08		35.1

Sólo las bebidas producidas con la invención permiten obtener partículas tan bien emulsionadas como las del control de leche al 100 % de referencia.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica

la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

5

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5 1. Una composición de proteínas de guisante que comprende globulinas y albúminas, caracterizada por que el extracto de sólidos de la composición:
- comprende al menos el 80 % en peso, preferentemente del 80 al 99 % en peso, más preferentemente del 85 al 98 %
10 en peso, del 90 al 97 % en peso, del 92 al 95 % en peso, de proteínas con respecto al peso del extracto de sólidos;
 - tiene una relación en masa de globulinas con respecto a albúminas de 65/35 a 85/15, preferentemente de 70/30 a 82/18, más preferentemente de 75/25 a 80/20.
- 15 2. La composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el extracto de sólidos de la composición tiene un contenido de factores antitripticos de 1 a 5 UIT/mg.
3. La composición según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que las albúminas tienen una actividad
20 emulsionante superior a 600, preferentemente superior a 800, más preferentemente superior a 1000 ml de aceite de maíz por gramo de albúminas.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que tiene una PDCAAS
25 igual a 1.
5. Un procedimiento para producir una composición de proteínas de guisante que comprende las siguientes etapas:
- a) extraer las globulinas y albúminas del guisante con el fin de obtener una fracción de proteínas;

- b) separar las globulinas de las albúminas con el fin de obtener una fracción enriquecida en globulina y una fracción enriquecida en albúmina;
- 5 c) reducir el contenido de factores antitripticos en la fracción enriquecida en albúmina con el fin de obtener una fracción tratada enriquecida en albúmina;
- d) ajustar el pH y después calentar la fracción tratada enriquecida en albúmina con el fin de obtener una fracción termizada enriquecida en albúmina;
- 10 e) mezclar la fracción enriquecida en globulina y la fracción termizada enriquecida en albúmina, de modo que el extracto de sólidos de la mezcla tenga una relación en masa de globulinas con respecto a albúminas de 65/35 a 85/15, preferentemente de 70/30 a 82/18, más
- 15 preferentemente de 75/25 a 80/20.

6. El procedimiento según la reivindicación 4 o 5, caracterizado por que, en la etapa b), las globulinas se separan de las albúminas con un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 20 b-i) flocular globulinas de la fracción de proteínas con el fin de obtener una fase sólida C suspendida en una fase líquida D; y
- b-ii) separar la fase líquida D, que contiene las albúminas, de la fase sólida C, que contiene las globulinas.

- 25 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por que, en la etapa c,) la fracción tratada enriquecida en albúmina tiene un contenido de factores antitripticos en el extracto de sólidos de 20 a 80 UIT/mg, preferentemente de 30 a 50 UIT/mg.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado por que, en la etapa d), el pH se ajusta a un valor entre 6.5 y 7.5.

9. El procedimiento según una cualquiera de las
5 reivindicaciones 4 a 8, caracterizado por que, en la etapa d), la fracción tratada enriquecida en albúmina se calienta a una temperatura entre 130°C y 150°C, preferentemente a 140°C, durante un período de entre 5 y 15 segundos, preferentemente
10 segundos.

10. El uso de la composición de proteínas de guisante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una composición alimenticia o farmacéutica.

15

20

25

30

RESUMEN

Composición de proteínas de guisante que tiene calidad
nutricional mejorada

5 La presente invención se refiere a una composición de
proteína de guisante de la que se mejora la calidad nutritiva,
y en particular su PDCAAS, así como al método de preparación
de la misma y al uso de esta composición en una composición
alimenticia o farmacéutica.

10

15

20

25

30