

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 182**

51 Int. Cl.:

A23J 1/14 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014 PCT/EP2014/074939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014 E 14815249 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2022 EP 3071046**

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

30 Prioridad:

18.11.2013 EP 13193383

18.11.2013 EP 13193388

13.03.2014 BE 201400174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2022

73 Titular/es:

COSUCRA GROUPE WARCOING S.A. (100.0%)

Rue de la Sucrierie 1

7740 Warcoing, BE

72 Inventor/es:

BOURGEOIS, AUDREY;

LEBESGUE, JULIE;

MANSY, FRÉDÉRIC y

BOSLY, ERIC

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 912 182 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para extraer proteínas de guisante

5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

FAO Agricultural Services Bulletin (2000), 142:99-109 describe la fermentación de leguminosas de grano. Camacho *et al.* (1991), Alimentos, 19-5-11 describen los efectos nutricionales de la fermentación de la harina de leguminosas, tal como la harina de guisante. Schindler *et al.* (2012), Food Biotechnol, 26(1):58-75 describen la mejora del aroma de extractos de proteína de guisante mediante fermentación de ácido láctico.

EL documento FR2889416 describe un método para producir extractos de proteína de guisante por fraccionamiento de harina de guisante y precipitación isoeléctrica de proteínas de guisante.

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

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

Sumario de la invención

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

- (a) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación en presencia de bacterias del ácido láctico;
- (b) moler dichos guisantes;

- (c) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas; y
- (d) aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

5 Según la presente invención, la extracción de proteína de guisante implica la fermentación de los guisantes antes de moler los guisantes. Durante o después de la molienda, las proteínas de guisante se separan y aíslan. También se prevén etapas de purificación posteriores.

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

- fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende separar al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes del resto del guisante, preferentemente en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción, y/o fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente de al menos 7, lo más preferentemente a un pH de al menos 8 y como máximo de 9; y
- aislar proteínas de guisante de dicha fracción que comprende proteínas de la etapa (d), comprende al menos una etapa de precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.

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

25 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de extractos de proteína de guisante según el segundo aspecto de la invención en piensos o productos alimenticios, preferentemente, en productos lácteos, productos de confitería, bebidas, productos cárnicos, productos vegetarianos, suplementos alimenticios, productos nutricionales destinados al control de peso, alimentos deportivos, médicos y alimentos para ancianos, y en productos alimenticios de panadería.

30 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la fermentación de guisantes (*Pisum sativum*), preferentemente con o en presencia de bacterias del ácido láctico afecta beneficiosamente varios parámetros fisicoquímicos y asociados a la calidad de los extractos, concentrados o aislados de proteínas derivados de los mismos.

35 Cuando los guisantes enteros se someten a fermentación antes de la molienda, ventajosamente eliminación de los microorganismos fermentadores, así como los subproductos de fermentación, tales como ácido láctico, pero también compuestos secretados como enzimas, que puede afectar el procesamiento aguas abajo, se separan fácilmente y de manera rentable de los guisantes después de la fermentación. Además, inesperadamente, al fermentar guisantes enteros, el contenido de mono, di y/u oligosacáridos de los guisantes, y en particular los azúcares mono y diméricos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y/o azúcares flatulentos, tales como rafinosa, estaquiosa y verbascosa, todos los cuales están dentro de los guisantes se reducen drásticamente, lo cual es aún más sorprendente cuando se tiene en cuenta la duración limitada de la fermentación en algunas realizaciones. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que la fermentación, además del consumo de azúcar, acelera la difusión del azúcar fuera de los guisantes. Tener ventajosamente cantidades reducidas de mono, di y oligosacáridos, permite minimizar la cantidad de, por ejemplo, consumo de agua y energía en los procesos posteriores, tal como una purificación adicional. Esto proporciona, por lo tanto, una ventaja económica.

45 Además, ventajosamente se ha encontrado que la fermentación hasta que se alcanza un nivel específico de hidratación, y/o hasta que se alcanza un pH específico en los guisantes, como se detalla a continuación da como resultado extractos, concentrados y aislados de proteínas de guisante con características fisicoquímicas y/u organolépticas particulares que tienen un efecto beneficioso sobre la calidad de la proteína. Por ejemplo, el color y la viscosidad del extracto de proteína final se ven afectados de manera beneficiosa por el método descrito en el presente documento. En particular, la viscosidad de los extractos de proteínas de guisante purificada se reduce si se implementa la etapa de fermentación como se describe en el presente documento de acuerdo con la invención, en comparación con extractos de proteína que no se han preparado según con los métodos descritos en el presente documento. Además, la concentración de determinados minerales en dichos extractos (tales como potasio y magnesio, cuya concentración es menor en los extractos de proteínas preparados según los métodos según la invención en comparación con los extractos de proteínas que no se han preparado según los métodos descritos en el presente documento) se ve afectada beneficiosamente por los métodos descritos en el presente documento. También, se ha encontrado que los extractos de proteínas preparados a partir de guisantes que se han fermentado según los métodos de la invención descritos en el presente documento tienen un sabor menos amargo y astringente en comparación con los extractos de proteínas que no se han preparado según los métodos descritos en el presente documento.

60 Además, la presencia de bacterias tales como las bacterias del ácido láctico, durante la hidratación de los guisantes limita el desarrollo de microorganismos perjudiciales (debido al efecto bacteriostático del ácido láctico).

65 Otra gran ventaja de realizar la fermentación de los guisantes antes de la molienda es que después de la fermentación,

los productos de la fermentación, así como los microorganismos en fermentación se pueden eliminar y separar fácilmente de los guisantes enteros.

Además, se ha descubierto ventajosa e inesperadamente que las características del proceso asociado a la extracción y purificación de proteínas se ven afectadas por el método descrito en el presente documento. Se ha encontrado, por ejemplo, que el pH cae, y en particular el pH final en los guisantes, después la fermentación, como se define a continuación, reduce la acumulación de presión indeseable en el equipo posterior (con los riesgos asociados de daño al equipo). También, el ensuciamiento de los intercambiadores de calor posteriores que implementan el tratamiento térmico posterior, se minimiza, de manera que se reduce la frecuencia de limpieza.

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

Breve descripción de las figuras

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

La Figura 2 representa un gráfico que representa la concentración de azúcar/materia seca en % en función del tiempo de fermentación de los guisantes fermentados.

La figura 3 representa un gráfico que representa el pH de los guisantes desvainados y el pH de la solución acuosa (zumo) en función del tiempo de fermentación.

La figura 4 representa un gráfico que representa la acidez de los guisantes desvainados y la acidez de la solución acuosa (zumo) en función del tiempo de fermentación.

La figura 5 representa un gráfico que representa la concentración de bacterias del ácido láctico de la solución acuosa (zumo) contenida en los primeros tanques de fermentación de una serie de experimentos en función del tiempo de fermentación.

La Figura 6 representa un gráfico que representa el perfil de viscosidad de los extractos de proteína de guisante en función del pH.

La Figura 7 representa un gráfico que representa la concentración de azúcar/materia seca en % en función del tiempo de fermentación de los guisantes fermentados con *Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus crispatus* LMG 8151 o *Lactobacillus acidophilus* LMG 12005).

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

La Figura 9 representa un gráfico que representa la acidez de los guisantes desvainados (9A) fermentados con *Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus crispatus* LMG 8151 o *Lactobacillus acidophilus* LMG 12005 y la acidez de la solución acuosa (zumo) (9B) en función del tiempo de fermentación.

La Figura 10 representa un gráfico que representa las bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus fermentum* LMG 18026, *Lactobacillus fermentum* LMG 6902, *Lactobacillus acidophilus* LMG 8151, o *Lactobacillus crispatus* LMG 12005), la concentración de la solución acuosa (zumo) en función del tiempo de fermentación.

Descripción detallada de la invención

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

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

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

y "comprendido de" tal como se usan en el presente documento comprenden las expresiones "que consiste en", "consiste" y "consiste en", así como las expresiones "que consisten esencialmente en", "consiste esencialmente" y "consiste esencialmente en".

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

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

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

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

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

30 La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una realización" o "realización" significa que un rasgo particular, estructura o característica particular descrita junto con la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las expresiones "en una realización" o "en la realización" en diversos lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente a la misma realización, pero puede. Además, los rasgos particulares, las estructuras o características pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como sería evidente para una persona experta en la técnica a partir de la presente divulgación, en una o más realizaciones.

40 En un aspecto, la invención se refiere a un método para extraer proteínas de guisante, que comprende las etapas, en el siguiente orden, de:

- (a) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación;
- (b) moler dichos guisantes; obteniendo así guisantes molidos;
- (c) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas; y
- (d) aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

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

- (a) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación en presencia de bacterias del ácido láctico antes de la molienda;
- (b) moler dichos guisantes; obteniendo así guisantes molidos;
- (c) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas; y
- (d) aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

55 En determinadas realizaciones, dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación hasta que el pH en dichos guisantes sea como máximo de 5,5, preferentemente como máximo de 5,0, más preferentemente, que varía de pH 3,5 a pH 5, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua.

60 En determinadas realizaciones, dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación hasta que el pH en dichos guisantes se reduce en al menos 1 unidad de pH, preferentemente en al menos 1,5 unidades de pH, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua.

65 En determinadas realizaciones, la etapa (a) comprende añadir guisantes secos y/o guisantes desvainados a una solución acuosa, preferentemente añadir guisantes secos que tienen un contenido de materia seca que varía del 80 % al 95 % basándose en el peso total de los guisantes secos.

- En determinadas realizaciones, la etapa (a) comprende fermentar dichos guisantes hasta que tengan un contenido en materia seca que varíe del 35 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
- 5 En determinadas realizaciones, dichos guisantes después de la etapa (a) y antes de la etapa (b) tienen un contenido de materia seca que varía del 35 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
- En determinadas realizaciones, dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación durante al menos 3h, preferentemente durante al menos 3 h y como máximo 24 h.
- 10 En determinadas realizaciones, dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación a una temperatura que varía de 30 °C a 50 °C, que preferentemente varía de 35 °C a 45 °C.
- En determinadas realizaciones, la etapa (a) comprende fermentar dichos guisantes en presencia de una o más *Lactobacillus* sp.
- 15 En determinadas realizaciones, dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación en presencia de al menos 10^2 ufc a 10^{10} ufc de bacterias del ácido láctico por ml de dicha composición acuosa que comprende guisantes.
- 20 En determinadas realizaciones, fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende separar al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes del resto del guisante, preferentemente en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción.
- 25 En determinadas realizaciones, fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente al menos 7, lo más preferentemente a un pH de al menos 8 y como máximo de 9. Este ajuste de pH se puede realizar utilizando cualquier base adecuada, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.
- 30 En determinadas realizaciones, fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende someter dichos guisantes molidos a una o más etapas de separación, preferentemente una o más etapas de decantación, preferentemente, una o más etapas de decantación centrífuga.
- 35 En determinadas realizaciones, aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas de la etapa (d), comprende concentrar dichas proteínas de guisante.
- 40 En determinadas realizaciones, aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas en la etapa (d), comprende al menos una etapa seleccionada de precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.
- En un aspecto, la invención se refiere a un extracto de proteína de guisante que se puede obtener por el método para extraer proteínas de guisante según la invención.
- 45 En un aspecto, la invención se refiere al uso de un extracto de proteína de guisante que se puede obtener mediante el método para extraer proteínas de guisante según la invención en piensos o productos alimenticios, preferentemente, en productos lácteos, productos de confitería, bebidas, productos cárnicos, productos vegetarianos, suplementos alimenticios, productos nutricionales destinados al control de peso, alimentos deportivos, médicos y alimentos para ancianos, y productos alimenticios de panadería.
- 50 En determinadas realizaciones, la etapa (a) comprende poner en contacto guisantes desvainados con una solución acuosa.
- 55 En determinadas realizaciones, la etapa (a) comprende poner en contacto guisantes desvainados secos con una solución acuosa, preferentemente guisantes desvainados secos que tienen un contenido de materia seca que varía del 80 % al 95 % basándose en el peso total del guisante desvainado seco.
- 60 En determinadas realizaciones, la etapa (a) comprende fermentar dichos guisantes hasta que tengan un contenido en materia seca que varía del 40 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
- 65 En determinadas realizaciones, dichos guisantes después de la etapa (a) y antes de la etapa (b) tienen un contenido de materia seca que varía del 40 % al 50 % basándose en el peso total de los guisantes.
- En determinadas realizaciones, antes, durante y/o después de la etapa de molienda (b) se añade una solución acuosa, preferentemente agua, preferentemente tal como para obtener una composición acuosa que comprende los guisantes molidos, comprendiendo dicha composición del 15 % al 35 % de materia seca basándose en el peso total de la

composición, que comprende preferentemente del 15 % al 35 %, preferentemente del 18 % al 33 %, por ejemplo del 20 % al 30 %, tal como al menos el 20 %, por ejemplo al menos el 21 %, por ejemplo al menos el 22 %, por ejemplo al menos el 23 %, por ejemplo al menos el 24 %, por ejemplo al menos el 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, por ejemplo, como máximo, el 30%, por ejemplo, como máximo, el 35 %.

5 En determinadas realizaciones, dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación durante un máximo de 24h, por ejemplo, durante un máximo de 20h, por ejemplo, durante un máximo de 18h, por ejemplo, durante un máximo de 12h, por ejemplo, durante un máximo de 10h.

10 En determinadas realizaciones, al final de la etapa (a) dichos guisantes tienen una acidez que varía de 25 a 250 mEq OH⁻ por g de guisantes.

15 En determinadas realizaciones, al final de la etapa (a) dichos guisantes tienen un contenido de azúcar de como máximo 6,0 % en peso basándose en la materia seca total de dichos guisantes, en donde el contenido de azúcar es la cantidad total de glucosa, fructosa, sacarosa, verbascosa, rafinosa, estaquiosa y galactosa; preferentemente, como máximo, el 5,5 %, por ejemplo, como máximo, el 5,0 %, por ejemplo, como máximo el 4,5 % por ejemplo, como máximo el 4,0 %.

20 En determinadas realizaciones, fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas en la etapa (c) comprende ajustar el pH de la composición acuosa que comprende los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente al menos 7, preferentemente al menos 8, más preferentemente un pH de al menos 7,5 y de como máximo 9, preferentemente un pH de al menos 7,5 y de como máximo 8,5. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una
25 realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.

30 En determinadas realizaciones, dicha al menos una fracción que comprende proteínas se somete a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo de al menos 40 °C, por ejemplo de al menos 50 °C, por ejemplo de al menos 55 °C, por ejemplo, como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 50 °C y como máximo 80 °C, por ejemplo de al menos 53 °C y como máximo 78 °C, por ejemplo, de al menos 54 °C y, como máximo, 75 °C.

En determinadas realizaciones, dicha al menos una fracción que comprende proteínas se somete a pasteurización.

35 En determinadas realizaciones, comprendiendo dicha composición acuosa que comprende guisantes en la etapa (a), comprende una solución acuosa, preferentemente agua.

40 En determinadas realizaciones, la cantidad de guisantes en dicha composición acuosa que comprende guisantes en la etapa (a) varía preferentemente de 150 a 500 kg de guisantes por m³ de composición acuosa que comprende los guisantes.

45 En determinadas realizaciones, dicha composición acuosa que comprende guisantes antes o al comienzo de la fermentación de la etapa (a) tiene un pH de al menos 6, por ejemplo, al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,4, tal como se mide en la composición acuosa que comprende los guisantes, después de que dicha composición haya sido molida.

En determinadas realizaciones, dichas bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* y combinaciones de los mismos.

50 En determinadas realizaciones, las bacterias del ácido láctico son *Lactobacillus* sp, más preferentemente seleccionadas del grupo que comprende *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus casei* y mezclas de las mismas.

55 En determinadas realizaciones, las bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis* y mezclas de las mismas.

60 En determinadas realizaciones, las bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis* y mezclas de las mismas.

En determinadas realizaciones, dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus fermentum*, o *Lactobacillus crispatus*.

65 En determinadas realizaciones, dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, o *Lactobacillus plantarum*.

En determinadas realizaciones, dicha bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, o *Lactobacillus acidophilus*.

En determinadas realizaciones, dicha fermentación es fermentación anaeróbica.

5 En determinadas realizaciones, los guisantes secos antes del comienzo de la etapa (a) tienen un pH de al menos 6,0, preferentemente, un pH que varía de 6,0 a 7,0, tal como por ejemplo al menos 6,0, por ejemplo, al menos 6,1, por ejemplo, al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,3, por ejemplo, como máximo 6,9, por ejemplo, como máximo 7,0, preferentemente que varía de 6,25 a 6,75 medido a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han
10 molido con 95 g de agua.

En determinadas realizaciones, el método de extracción de proteínas de guisante según la invención comprende las etapas de:

- 15 (a) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación en presencia de bacterias del ácido láctico;
- (b) moler dichos guisantes en presencia de agua; obteniendo de este modo una composición acuosa que comprende guisantes molidos;
- 20 (c) fraccionar dicha composición acuosa que comprende guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas, preferentemente ajustando el pH de dicha composición acuosa a un pH de al menos 6; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en la composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de la composición se ajusta al contenido de
25 materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia;
- (d) aislar o concentrar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

En determinadas realizaciones, la etapa (c) comprende fraccionar dichos guisantes molidos en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción.

30 En determinadas realizaciones, aislar o concentrar proteínas de guisante a partir de dicha fracción que comprende proteínas en la etapa (d), comprende solamente una etapa de precipitación.

35 En determinadas realizaciones, el aislamiento o la concentración de proteínas de guisante a partir de dicha fracción que comprende proteínas en la etapa (d) se realiza mediante precipitación isoeléctrica.

En determinadas realizaciones, la etapa (d) comprende, además

- 40 (e) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa;
- (f) someter opcionalmente dicha suspensión acuosa a al menos un tratamiento térmico
- (g) opcionalmente secar dicha suspensión acuosa.

45 En determinadas realizaciones, la etapa (e) comprende además ajustar el pH de dicha suspensión acuosa a un pH de al menos 6,0, preferentemente, el pH se ajusta a un pH de al menos 6,5, preferentemente, que varía de pH 6,0 a 8,5, preferentemente, que varía de pH 6,5 a 8,5, preferentemente, que varía de pH 7,0 a 8,5.

50 En determinadas realizaciones, la etapa (f) comprende someter dicha suspensión acuosa a un tratamiento térmico durante al menos 0,01 segundo, preferentemente durante un tiempo que varía de 0,01 segundo a 20 minutos, preferentemente, que varía de 10 segundos a 10 minutos.

En determinadas realizaciones, dicho tratamiento térmico en la etapa (f) se realiza a una temperatura de al menos 70 °C, preferentemente a una temperatura que varía de 75 °C a 210 °C, preferentemente, que varía de 85 °C a 160 °C, por ejemplo, de 90 °C a 150 °C.

55 En determinadas realizaciones, dicho tratamiento térmico en la etapa (f) se realiza a una temperatura que varía de 115 °C a 210 °C durante un tiempo que varía de 15 s a 0,01 s; a una temperatura que varía de 95 °C a 115 °C durante un tiempo que varía de 5 min a 15 s; a una temperatura que varía de 75 °C a 95 °C durante un tiempo que varía de 15 min a 5 min; a una temperatura que varía de 75 °C a 110 °C durante un tiempo que varía de 10 min a 2 min; a una temperatura que varía de 80 °C a 100 °C durante un tiempo que varía de 8 min a 5 min; o a una temperatura que varía de 130 °C a 150 °C durante un tiempo que varía de 8 s a 1 s.

60 En determinadas realizaciones, el tiempo del tratamiento térmico en la etapa (f) disminuye cuando aumenta la temperatura del tratamiento térmico.

65 En determinadas realizaciones, antes de la etapa (a) dichos guisantes secos tienen un contenido de azúcar de al menos 6,2 % en peso basándose en la materia seca total de dichos guisantes, en donde el contenido de azúcar es la

cantidad total de glucosa, fructosa, sacarosa, verbascosa, rafinosa, estaquiosa y galactosa.

En determinadas realizaciones, la etapa (d) comprende aislar dichas proteínas de guisante como un extracto que comprende al menos el 60 % en peso, preferentemente al menos el 70 % en peso, más preferentemente al menos el 80 % en peso, por ejemplo, al menos el 85 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicho extracto.

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

- (a) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación en presencia de bacterias del ácido láctico antes de la molienda;
- (b) moler dichos guisantes;
- (c) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas;
- (d) aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

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

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

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

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

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

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

Según la invención, las etapas (a) a (d) del método como se especifica anteriormente se realizan preferentemente en el siguiente orden, es decir, la etapa (a) precede a la etapa (b), que a su vez precede a la etapa (c), que a su vez precede a la etapa (d). Sin embargo, también es posible según la invención que las etapas (b) y (c) se realicen simultáneamente, es decir, que la etapa de molienda y la etapa de fraccionamiento se realicen simultáneamente.

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición acuosa que comprende guisantes" utilizada en

la etapa (a) se refiere a una composición que comprende principalmente o que consiste exclusivamente en una solución acuosa tal como agua, aparte de los guisantes. En algunas realizaciones, la composición acuosa, por ejemplo, comprende una suspensión de guisantes en una solución acuosa. En una realización preferida, la solución acuosa es agua. En una realización, el agua puede ser agua potable o agua de pozo que se ha tratado para hacerla potable. El agua utilizada es preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano.

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

En una realización, la composición acuosa que comprende los guisantes al comienzo de la etapa (a) del método descrito en el presente documento, preferentemente al inicio de la fermentación, tiene un pH de al menos 6, preferentemente al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,4, tal como se mide en la composición acuosa que comprende los guisantes, después de que dicha composición haya sido molida.

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

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

Tal como se usa en el presente documento, "bacterias del ácido láctico" se refiere a una población de bacilos o cocos grampositivos, con bajo contenido en GC, tolerantes a los ácidos, generalmente no esporulantes, que no respiran que están asociados por sus características metabólicas y fisiológicas comunes y producen ácido láctico como el principal producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias, normalmente se pueden encontrar en productos lácticos y plantas en descomposición. Tal como se usa en el presente documento, las bacterias del ácido láctico pueden no ser patógenas en el sentido de que no causan daño o no llevan a efectos nocivos cuando se ingieren. Preferentemente, las bacterias del ácido láctico tal como se usan en el presente documento son uno o más géneros bacterianos seleccionados de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* y combinaciones de los mismos. Lo más preferentemente, las bacterias del ácido láctico son *Lactobacillus* sp, más preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckii*, y *Lactobacillus casei*, y mezclas de las mismas, por ejemplo del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acidophilus* y mezclas de las mismas, por ejemplo del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus pontis* y mezclas de las mismas, por ejemplo dicha bacteria es *Lactobacillus fermentum*, o *Lactobacillus crispatus*. En algunas realizaciones, la fermentación puede ser fermentación espontánea (es decir, en la cual no se agregan deliberadamente microorganismos fermentadores, pero la fermentación se efectúa por microorganismos, preferentemente bacterias del ácido láctico, que se dan en la naturaleza sobre/dentro de los guisantes y/o en el medio ambiente) o pueden ser fermentaciones inoculadas (es decir, en las cuales microorganismos fermentadores, preferentemente bacterias del ácido láctico, se añaden deliberadamente). La fermentación también se puede efectuar transfiriendo parte o la totalidad de la fracción acuosa de una etapa de fermentación a la siguiente fermentación que se iniciará, por ejemplo transfiriendo al menos 1/10 del primer volumen de fermentación a al menos una segunda etapa de fermentación. En una realización preferida, la fermentación es fermentación anaeróbica. En una realización preferida, dicha *Lactobacillus fermentum* es *Lactobacillus fermentum* LMG 6902 o LMG 18026. En una realización preferida, dicha *Lactobacillus Crispatus* es *Lactobacillus Crispatus* LMG 12005. En una realización preferida, dicha *Lactobacillus acidophilus* es *Lactobacillus acidophilus* LMG 8151.

En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente hasta que el pH en los guisantes sea como máximo de 5,5, preferentemente como máximo de 5,0, más preferentemente, que varíe de 3,5 a 5, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental. En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente hasta que el pH en los guisantes varía de 3,5 a 4,5, por ejemplo, de 4,0 a 5,0, preferentemente de 4,5 a 5,5, tal como por ejemplo al menos 3,5, por ejemplo, al menos 3,75, por ejemplo, al

menos 4,0, por ejemplo, al menos 4,25, por ejemplo, al menos 4,50, por ejemplo, al menos 4,75, por ejemplo, como máximo 5,0, por ejemplo, como máximo 5,25, por ejemplo, como máximo 5,5, preferentemente, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua, tal como se describe en la sección experimental.

5 En una realización, los guisantes secos tienen un pH de al menos 6,0, preferentemente de 6,0 a 7,10 antes de la fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente, tal como por ejemplo al menos 6,0, por ejemplo, al menos 6,1, por ejemplo, al menos 6,2, por ejemplo, al menos 6,3, por ejemplo, 6,4, por ejemplo, 6,5, por ejemplo, 6,6, por ejemplo, 6,7, por ejemplo, 6,8, por ejemplo, 6,9, por ejemplo, 7,10, preferentemente, que varía de 6,25 a 6,75, preferentemente como se mide a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han molido con 95 g de agua.

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

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

45 En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente a una temperatura que es óptima para el microorganismo fermentador, preferentemente, a una temperatura que es como máximo 5 °C más alta o más baja que la temperatura que es óptima para el microorganismo de fermentación. Las temperaturas óptimas para las bacterias y/o levaduras tal como se definen en el presente documento son conocidas en la técnica. Por medio de orientación adicional, y sin limitación, una temperatura óptima tal como se define en el presente documento se refiere a la temperatura a la cual se maximiza el crecimiento. En una realización adicional, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente a una temperatura de al menos 30 °C, por ejemplo, que varía de 30 °C a 50 °C, preferentemente, que varía de 35 °C a 45 °C. En otra realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente a una temperatura que varía de 30 °C a 40 °C, de 35 °C a 45 °C, o de 40 °C a 50 °C, preferentemente 40 °C, o aproximadamente 40 °C.

60 En una realización, la composición acuosa que comprende guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente en presencia de microorganismos fermentadores, tales como bacterias y/o levaduras, preferentemente, que comprenden una o más bacterias del ácido láctico, en donde, preferentemente, dichas bacterias del ácido láctico se seleccionan del grupo que comprende una o más *Lactobacillus* sp.. En una realización, la fermentación se realiza en presencia de uno o más de los microorganismos especificados anteriormente, preferentemente bacterias del ácido láctico, a una concentración que varía de 10² ufc/ml a 10¹⁰ ufc/ml de dicha composición acuosa que comprende los guisantes, tal como al menos 10² ufc/ml, por ejemplo, al menos 10⁵ ufc/ml, por ejemplo, al menos 10⁶ ufc/ml, por ejemplo, al menos 10⁷ ufc/ml, por ejemplo, al menos 10⁸ ufc/ml, por ejemplo, al menos 10⁹ ufc/ml de dicha composición acuosa que comprende los guisantes. Las "ufc" (unidades formadoras de

colonias) son bien conocidas en la materia y se pueden determinar, por ejemplo, mediante recuento de placas. Debe entenderse que "ufc/ml" se refiere a la cantidad de ufc por ml de la composición acuosa total que comprende guisantes, es decir, incluidos los guisantes.

5 En otra realización, la composición acuosa que comprende los guisantes se somete a fermentación en la etapa (a) del método descrito anteriormente en presencia de microorganismos fermentadores que comprenden una o más bacterias del ácido láctico, preferentemente que comprende una o más *Lactobacillus* sp., en donde los microorganismos, preferentemente bacterias del ácido láctico, se añaden a una concentración de al menos 10² ufc/ml de composición acuosa que comprende guisantes.

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

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

35 En la etapa (b) del método de acuerdo con la invención o tal como se describe anteriormente, se muelen los guisantes que se han sometido a fermentación en la etapa (a). A este efecto, en una realización, los guisantes se eliminan de la composición acuosa después de la etapa (a) y después se someten a molienda. Preferentemente, los guisantes se lavan o enjuagan después de la etapa (a) y antes de la etapa (b). El lavado o enjuague se puede realizar con una solución acuosa, preferentemente agua, como agua del grifo o agua del pozo tratada, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano.

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

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

60 En una realización, antes, durante o después de moler los guisantes en la etapa (b) del método de acuerdo con la invención como se describe anteriormente, una solución acuosa, preferentemente agua, como agua del grifo o agua del pozo tratada, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano, se añade a los guisantes. En una realización adicional, se añade a los guisantes una cantidad de solución acuosa tal que se obtiene una composición acuosa que comprende los guisantes molidos, preferentemente en donde dicha composición del 15 % al 35 % de materia seca basándose en el peso total de la composición, que comprende preferentemente del 15 % al 35 %, preferentemente del 20 % al 30 %, tal como al menos el 19 %, tal como al menos el 20 %, tal como al

menos el 21 %, tal como al menos el 22 %, por ejemplo al menos el 23 %, por ejemplo al menos el 24 %, por ejemplo al menos el 25 %, por ejemplo al menos el 26 %, por ejemplo al menos el 27 %, por ejemplo al menos el 28 %, por ejemplo al menos el 29 %, por ejemplo, como máximo, el 30%, por ejemplo, como máximo, el 35 % de materia seca en función del peso total de la composición. En una realización preferida, el proceso de molienda es un proceso de molienda en húmedo, de tal manera que se añade una solución acuosa a los guisantes antes o durante la molienda.

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

El fraccionamiento de los guisantes molidos en una fracción que comprende proteínas se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica, como la adición de una base adecuada o una sal.

Preferentemente, los guisantes molidos se fraccionan aumentando el pH de los guisantes molidos. Preferentemente, la etapa de fraccionamiento (c) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente al menos 7, más preferentemente un pH de al menos 8 y como máximo 9. Preferentemente, la etapa de fraccionamiento (c) comprende aumentar el pH de una composición acuosa que comprende los guisantes molidos. En una realización preferida, el pH de la composición se ajusta a un pH de al menos 6, más preferentemente al menos 7. En otra realización preferida, el pH de la composición se ajusta a un valor que varía de pH 6 a pH 9, más preferentemente, de pH 7 a pH 9, tal como al menos 7,0, por ejemplo, al menos 7,1, por ejemplo, al menos 7,2, por ejemplo, al menos 7,3, por ejemplo, al menos 7,4, por ejemplo, al menos 7,5, por ejemplo, al menos 7,6, por ejemplo, al menos 7,7, por ejemplo, al menos 7,8, por ejemplo, al menos 7,9, por ejemplo, al menos 8,0, por ejemplo, al menos 8,1, por ejemplo, al menos 8,2, por ejemplo, al menos 8,3, por ejemplo, al menos 8,4, por ejemplo, como máximo 8,5, por ejemplo, como máximo 8,6, por ejemplo, como máximo 8,7, por ejemplo, como máximo 8,8, por ejemplo, como máximo 8,9, por ejemplo, como máximo 9,0, lo más preferentemente, que varía de pH 7,5 a pH 8,5, lo más preferentemente, pH 8 o aproximadamente pH 8. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia. Este ajuste de pH se puede realizar utilizando cualquier base adecuada, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido potásico y similares. En una realización preferida, el pH de las composiciones que contienen guisantes molidos se ajusta mediante la adición de hidróxido de sodio.

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

Como se indica en otra parte, la etapa (c) y la etapa (b) del método de acuerdo con la invención se pueden realizar simultáneamente o como alternativa, la etapa (c) se puede realizar posteriormente a la etapa (b).

Debe entenderse que la fracción que comprende proteínas también puede comprender constituyentes adicionales, notablemente aquellos que se vuelven solubles por o permanecen solubles por la etapa de fraccionamiento.

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

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

preferentemente, del 3,0 % al 15 % de materia seca, tal como del 3,0 % al 10 %.

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

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

En la etapa (d) del método de acuerdo con la invención como se describe anteriormente, las proteínas de guisante se aíslan de dicha fracción que comprende proteínas. Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" o "aislamiento" puede referirse a un proceso que separa las proteínas de dicha fracción que comprende proteínas. El término "concentración" también se puede usar indistintamente con "aislamiento".

Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, en la etapa (d) del método de acuerdo con la invención como se describe anteriormente, las proteínas de guisante se concentran a partir de dicha fracción que comprende proteínas. Preferentemente, dicha etapa de aislamiento o concentración se puede realizar usando precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía, o una combinación de los mismos.

En una realización, la etapa (d) del método de acuerdo con la invención como se describe anteriormente, comprende etapas de proceso adicionales posteriores para purificar adicionalmente la proteína de guisante y/o aumentar el rendimiento. Esencialmente, estas etapas adicionales pueden usarse para eliminar impurezas que se coaislan con las proteínas aisladas.

Una o más, preferentemente la totalidad, de las siguientes etapas a continuación se pueden implementar a este efecto.

En algunas realizaciones, las proteínas se aíslan o concentran a partir de dicha composición acuosa que comprende proteínas de guisante mediante precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía. Preferentemente, las proteínas se aíslan o concentran mediante precipitación isoelectrica o por ultrafiltración. En una realización preferida, aislar o concentrar proteínas de guisante a partir de dicha fracción que comprende proteínas en la etapa (d), comprende al menos una etapa de precipitación isoelectrica de dichas proteínas. En una realización preferida, aislar o concentrar proteínas de guisante a partir de dicha fracción que comprende proteínas en la etapa (d), comprende solamente una etapa de precipitación isoelectrica de dichas proteínas.

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

La separación de las proteínas precipitadas o agregadas se puede efectuar por decantación, preferentemente decantación centrífuga. En una realización preferida, el contenido de materia seca (en peso) después de la separación de las proteínas precipitadas o agregadas varía del 20 % al 40 %, tal como, por ejemplo, al menos el 25 %, por ejemplo al menos el 26 %, por ejemplo al menos el 27 %, por ejemplo al menos el 28 %, por ejemplo al menos el 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o el 35 %, preferentemente al menos el 27 % y como máximo el 38 % basándose en el peso total de las proteínas precipitadas o agregadas (también referida como suspensión acuosa). El contenido de materia seca se puede ajustar aún más, por ejemplo, mediante la adición de una solución acuosa a las proteínas precipitadas

- o agregadas, obteniendo así una composición de proteínas precipitadas. En una realización, dicha solución acuosa es preferentemente agua, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano. Preferentemente, el contenido de materia seca se puede ajustar para variar del 10 % al 25 %, preferentemente del 15 % al 20 %, tal como, por ejemplo, al menos el 15 %, por ejemplo, al menos el 16 %, preferentemente, al menos el 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, basándose en el peso total de la composición de proteínas precipitadas. Opcionalmente, la etapa de concentración de las proteínas se puede repetir al menos una vez más. Preferentemente, la etapa de concentrar las proteínas se realiza solo una vez.
- En una realización preferida, las proteínas precipitadas o agregadas se resuspenden preferentemente en una solución acuosa, preferentemente agua, preferentemente agua potable, es decir, agua apta para el consumo humano. El contenido de materia seca varía preferentemente del 10 % al 25 %, preferentemente del 15 % al 20 %, tal como, por ejemplo, al menos el 15 %, por ejemplo al menos el 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % de la composición de proteínas resuspendidas.
- En una realización, el pH de la composición de proteínas resuspendidas se ajusta a un pH de al menos 6,0, preferentemente, el pH se ajusta a un pH de al menos 6,5, preferentemente, que varía de pH 6,0 a 8,5, preferentemente, que varía de pH 6,5 a 8,5, preferentemente, que varía de pH 7,0 a 8,5, preferentemente, de pH 7,3 a 8,0, tal como, por ejemplo, al menos pH 7,2, por ejemplo, al menos 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0. A este efecto, por ejemplo, se puede usar hidróxido de sodio o cualquier base adecuada para ajustar el pH al nivel deseado. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende proteínas resuspendidas que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de la composición que comprende proteínas resuspendidas se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.
- En otra realización, el pH de la composición de proteínas resuspendidas se ajusta a un intervalo de pH de 4,0 a 5,8, preferentemente de pH 4,5 a 5,5, tal como, por ejemplo, pH 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5. A este efecto, por ejemplo, se puede usar hidróxido de sodio o ácido sulfúrico para ajustar el pH al nivel deseado. Preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende proteínas resuspendidas que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %. En una realización, el contenido de materia seca de la composición que comprende proteínas resuspendidas se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia.
- Opcionalmente, pero preferentemente, la composición de proteínas resuspendidas que tiene el pH fijado dentro del intervalo indicado anteriormente se somete además a al menos un tratamiento térmico, preferentemente un tratamiento térmico a una temperatura de al menos 70 °C, preferentemente al menos 75 °C, más preferentemente al menos 80 °C, aún más preferentemente, al menos 85 °C, aún más preferentemente, al menos 90 °C, por ejemplo, al menos 95 °C, preferentemente, como máximo 160 °C, aún más preferentemente como máximo 210 °C. Por ejemplo, dicho tratamiento térmico puede oscilar entre 70 °C y 210 °C, preferentemente, que varía de 85 °C a 160 °C, más preferentemente, que varía de 90 °C a 150 °C. El tratamiento térmico se puede efectuar ventajosamente por medio de uno o más intercambiadores de calor o por inyección directa o indirecta de vapor. En una realización, la duración del tratamiento térmico es de al menos 0,01 segundo, preferentemente, que varía de 0,01 segundo a 20 min, preferentemente, que varía de 10 segundos a 10 minutos. El experto en la materia apreciará que cuanto mayor sea la temperatura, menor será la duración del tratamiento térmico. Por ejemplo, el tratamiento térmico puede ser a una temperatura que varía entre 115 °C y 210 °C durante un tiempo que varía de 0,01 s a 15 s. Como alternativa, por ejemplo, el tratamiento térmico puede ser a una temperatura que varía de 95 °C a 115 °C durante un tiempo que varía de 15 s a 5 min. Como alternativa, por ejemplo, el tratamiento térmico puede ser a una temperatura que varía de 70 °C a 95 °C durante un tiempo que varía de 5 min a 15 min. En una realización preferida, el tratamiento térmico puede realizarse a una temperatura que varía de 95 °C a 110 °C durante un tiempo que varía de 2 min a 8 min. En otra realización preferida, el tratamiento térmico se realiza a una temperatura que varía entre 130 °C y 140 °C durante un tiempo que varía de 1 s a 8 s. Después del tratamiento térmico, las composiciones que comprenden proteínas se pueden mantener a una temperatura que varía de 70 °C a 90 °C, preferentemente, que varía de 70 °C a 85 °C, antes del secado.
- En una realización opcional, pero preferida, la composición de proteínas resuspendidas que tiene el pH establecido dentro del intervalo indicado anteriormente se somete además a al menos un tratamiento térmico a una temperatura que varía de 115 °C a 210 °C durante un tiempo que varía de 15 s a 0,01 s; a una temperatura que varía de 95 °C a 115 °C durante un tiempo que varía de 5 min a 15 s; a una temperatura que varía de 75 °C a 95 °C durante un tiempo que varía de 15 min a 5 min; a una temperatura que varía de 75 °C a 110 °C durante un tiempo que varía de 10 min a 2 min; a una temperatura que varía de 80 °C a 100 °C durante un tiempo que varía de 8 min a 5 min; o a una temperatura que varía de 130 °C a 150 °C durante un tiempo que varía de 8 s a 1 s. Preferentemente, el tiempo del tratamiento térmico disminuye cuando aumenta la temperatura del tratamiento térmico.
- En otra etapa adicional más, las composiciones que comprenden proteínas pueden someterse a secado, se haya sometido o no previamente a tratamiento térmico después del aislamiento/concentración, o se haya sometido

previamente o no a precipitación. El secado se puede realizar por cualquier medio en la técnica, tal como por aplicación de aire caliente, evaporación, liofilización, secado por contacto, secado al vapor, secado dieléctrico, secado de rodillos, secado instantáneo, etc. En una realización preferida, las proteínas se secan por nebulización. Opcionalmente, las composiciones que comprenden proteínas pueden someterse a granulación, mediante técnicas conocidas en la materia.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para extraer proteínas de guisante de *Pisum sativum* ssp., que comprende las etapas de:

- 10 (i) someter una composición acuosa que comprende guisantes secos y desvainados a fermentación en presencia de una o más bacterias del ácido láctico, preferentemente una o más *Lactobacillus* sp hasta que el pH en dichos guisantes varíe de 3,5 a 5,5, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua, preferentemente en donde el pH en los guisantes secos antes de la fermentación es al menos 6,0, tal como se mide a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han molido con 95 g de agua;
- 15 (ii) moler dichos guisantes;
- (iii) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas, opcionalmente de manera simultánea con la etapa (ii), ajustando el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6,0, por ejemplo, que varía de 6,0 a 9, preferentemente de 7 a 9; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente como máximo el 25 %; en una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia;
- 20 (iv) aislar o concentrar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para extraer proteínas de guisante de *Pisum sativum* ssp., que comprende las etapas de:

- 30 (i) someter una composición acuosa que comprende guisantes secos y desvainados a fermentación en presencia de una o más bacterias del ácido láctico, en donde dichos guisantes secos desvainados tienen un contenido de materia seca del 80 % al 95 % basándose en el peso total del guisante seco desvainado; preferentemente en presencia de al menos una o más *Lactobacillus* sp hasta que el pH en dichos guisantes varíe de 3,5 a 5,5, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua, preferentemente en donde el pH en los guisantes antes de la fermentación es de 6,0 a 7,0, tal como se mide a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han molido con 95 g de agua;
- 35 (ii) moler dichos guisantes;
- (iii) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas, opcionalmente de manera simultánea con la etapa (ii), ajustando el pH de dichos guisantes molidos a un pH de al menos 6,0, por ejemplo, que varía de 6,0 a 9,0, preferentemente de 7,0 a 9,0; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente como máximo el 25 %; en una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia;
- 40 (iv) aislar o concentrar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

En una realización mucho más preferida, la presente invención se refiere a un método para extraer proteínas de guisante de *Pisum sativum* ssp., que comprende las etapas de:

- 50 (i) someter una composición acuosa que comprende guisantes secos y desvainados a fermentación en presencia de una o más bacterias del ácido láctico a una temperatura que varía de 35 °C a 45 °C hasta que el pH en dichos guisantes varíe de 3,5 a 5,5, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua, en donde dichos guisantes secos desvainados tienen un contenido de materia seca del 80 % al 95 % basándose en el peso total del guisante seco desvainado; preferentemente en presencia de una o más *Lactobacillus* sp; preferentemente en donde el pH en los guisantes antes de la fermentación es de 6,0 a 7,0, tal como se mide a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han molido con 95 g de agua, tal como se mide en la composición acuosa que comprende los guisantes, después de que dicha composición se haya molido;
- 55 (ii) moler dichos guisantes;
- (iii) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas, opcionalmente de manera simultánea con la etapa (ii), ajustando el intervalo de pH de dichos guisantes molidos a un pH de al menos 6,0, por ejemplo, que varía de 6,0 a 9, preferentemente de 7 a 9; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente como máximo el 25 %; en una realización, el contenido
- 60
- 65

de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia;

(iv) aislar o concentrar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.

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

10 (i) someter una composición acuosa que comprende guisantes secos y desvainados a fermentación en presencia de una o más bacterias del ácido láctico a una temperatura que varía de 35 °C a 45 °C hasta que el pH en dichos guisantes varíe de 3,5 a 5,5, tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua, en donde dichos guisantes secos desvainados tienen un contenido de materia seca del 80 % al 95 % basándose en el peso total del guisante seco desvainado; preferentemente en presencia de una o más *Lactobacillus* sp; preferentemente en donde el pH en los guisantes antes de la fermentación es de 6,0 a 7,0, tal como se mide a temperatura ambiente en 5 g de guisantes secos que se han molido con 95 g de agua;

15 (ii) moler dichos guisantes;

20 (iii) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas, opcionalmente de manera simultánea con la etapa (ii), ajustando el intervalo de pH de dichos guisantes molidos a un pH de al menos 6,0, por ejemplo, que varía de 6,0 a 9,0, preferentemente de 7,0 a 9,0; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una composición acuosa que comprende guisantes molidos que tienen una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente como máximo el 25 %; en una realización, el contenido de materia seca de los guisantes molidos se ajusta al contenido de materia seca citado anteriormente mediante la adición de agua en consecuencia;

25 (iv) aislar o concentrar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas;

(v) obtener dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa;

(vi) someter opcionalmente dicha suspensión acuosa a al menos un tratamiento térmico.

30 En una realización preferida, las etapas (iii) a (vi) del método anterior comprenden las siguientes etapas:

(1) fraccionar dichos guisantes molidos separando una fracción que comprende proteínas de una fracción insoluble, preferentemente por decantación;

(2) someter la fracción que comprende proteínas a un tratamiento térmico a una temperatura que varía de 50 °C a 80 °C;

35 (3) precipitar las proteínas comprendidas en dicha fracción que comprende proteínas mediante precipitación isoeléctrica, preferentemente ajustando el pH de dicha fracción a un valor que varíe de 4,5 a 5,8; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una fracción acuosa que comprende proteínas que tiene una materia seca de al menos el 1 %, preferentemente que tiene una materia seca que varía del 3 al 10 %;

40 (4) aislar las proteínas precipitadas, preferentemente por decantación; obteniendo así dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa;

(5) ajustar el pH de la suspensión acuosa a un valor que varía de 6,0 a 8,0, o como alternativa, ajustar el pH de la suspensión acuosa a un valor que varía de 4,5 a 5,8; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una suspensión acuosa que tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua;

45 (6) someter opcionalmente la suspensión acuosa con el pH ajustado a un tratamiento térmico a una temperatura que varía al menos en 70 °C, preferentemente al menos 75 °C, preferentemente una temperatura que varía de 75 °C a 210 °C, preferentemente, que varía de 85 °C a 160 °C, por ejemplo, de 90 °C a 150 °C, por ejemplo, de 95 °C a 140 °C, preferentemente durante un tiempo que varía de 10 min a 0,01 s; y

50 (7) secar la suspensión acuosa.

En una realización preferida, las etapas (iii) a (vi) del método anterior comprenden las siguientes etapas:

55 (1) fraccionar dichos guisantes molidos separando una fracción que comprende proteínas de una fracción insoluble, preferentemente por decantación;

(2) someter la fracción que comprende proteínas a un tratamiento térmico a una temperatura que varía de 50 °C a 80 °C;

60 (3) precipitar las proteínas comprendidas en dicha fracción que comprende proteínas mediante precipitación isoeléctrica, preferentemente ajustando el pH de dicha fracción a un valor que varíe de 4,5 a 5,0; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una fracción acuosa que comprende proteínas que tiene una materia seca de al menos el 1 %, preferentemente que tiene una materia seca que varía del 3 al 10 %;

(4) aislar las proteínas precipitadas, preferentemente por decantación; obteniendo así dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa;

65 (5) ajustar el pH de la suspensión acuosa a un valor que varía de 6,0 a 8,0, preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una suspensión acuosa que tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua;

preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua;

(6) someter opcionalmente la suspensión acuosa con el pH ajustado a un tratamiento térmico a una temperatura que varía de 90 °C a 150 °C, preferentemente durante un tiempo que varía de 10 min a 0,01 s;

5 (7) secar la suspensión acuosa obteniendo así dichas proteínas de guisante.

En una realización preferida, las etapas (iii) a (vi) del método anterior comprenden las siguientes etapas:

10 (1) fraccionar dichos guisantes molidos separando una fracción que comprende proteínas de una fracción insoluble, preferentemente por decantación;

(2) someter la fracción que comprende proteínas a un tratamiento térmico a una temperatura que varía de 50 °C a 80 °C;

15 (3) precipitar las proteínas comprendidas en dicha fracción que comprende proteínas mediante precipitación isoeléctrica, preferentemente ajustando el pH de dicha fracción a un valor que varíe de 4,5 a 5,8; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una proteína acuosa que comprende al menos el 1,0 % de materia seca basándose en el peso total de la composición, preferentemente, al menos el 2,0 % de materia seca, más preferentemente, al menos el 3,0 % de materia seca, tal como, por ejemplo, al menos el 4,0 % de materia seca, tal como, por ejemplo, al menos el 5,0 % de materia seca; que comprende preferentemente del 1,0 % al 40 % de materia seca, preferentemente, del 2,0 % al 30 % de materia seca, más preferentemente, del 3,0 % al 20 % de materia seca, más preferentemente, del 3,0 % al 15 % de materia seca, tal como del 3,0 % al 10 %;

20 (4) aislar las proteínas precipitadas, preferentemente por decantación; obteniendo así dichas proteínas de guisante aisladas o concentradas como una suspensión acuosa;

25 (5) ajustar el pH de la suspensión acuosa a un valor que varía de 4,5 a 5,8; preferentemente, este ajuste de pH se realiza en una suspensión acuosa que tiene una materia seca de como máximo el 45 %, preferentemente, como máximo, el 40 %, preferentemente, como máximo, el 35 %, preferentemente, como máximo, el 30 %, preferentemente, como máximo, el 25 %, y en una realización la materia seca puede ajustarse en esta medida mediante dilución con agua;

30 (6) someter opcionalmente la suspensión acuosa con el pH ajustado a un tratamiento térmico a una temperatura que varía de 90 °C a 150 °C, preferentemente durante un tiempo que varía de 10 min a 10,0 segundos; y

(7) secar la suspensión acuosa, obteniendo así dichas proteínas de guisante.

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

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

45 El experto entenderá que cuando se refiere a "proteínas de guisante" en algunas realizaciones, de hecho se describe una composición, que predominantemente, pero no exclusivamente, comprende proteínas de guisante. Las impurezas residuales pueden estar presentes en tales composiciones. Dichas impurezas residuales pueden incluir, por ejemplo, minerales, azúcares, etc. Tal como se usa en el presente documento, el término proteínas de guisante se refiere preferentemente a un extracto de proteínas de guisante o una composición que comprende (basándose en materia seca) al menos un 70 % en peso de proteínas, preferentemente, al menos un 80 % en peso de proteínas, más preferentemente al menos un 85 % en peso. Preferentemente, la expresión proteínas de guisante se refiere a una composición que comprende (basándose en materia seca) del 70 % en peso al 98 % en peso de proteínas, preferentemente, del 80 % en peso al 98 % en peso de proteínas, más preferentemente, del 85 % en peso al 98 % en peso de proteínas, más preferentemente, del 88 % en peso al 98 % en peso de proteínas.

50 En el presente documento también se describe una composición que comprende proteínas de guisante obtenidas por, o que se pueden obtener por, los métodos de acuerdo con la invención, tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, dicha composición es una composición comestible. Tal como se usa en el presente documento, y como entenderá el experto en la materia, una composición "comestible" se refiere a una composición que es adecuada para consumo humano o animal. Preferentemente, dicha composición es un alimento o pienso, más preferentemente un producto lácteo, producto de confitería, bebida, producto cárnico, producto vegetariano, suplemento alimenticio, producto nutricional destinado al control de peso, alimentos deportivos, médicos y alimentos para ancianos, y un producto alimenticio de panadería. En una realización preferida, dicho producto alimenticio es una galleta, pan, pastel, gofre o dulce de leche.

60 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de extractos de proteínas de guisante como se describe en el presente documento, en particular, a extractos de proteínas de guisante obtenidos, o que se pueden, obtener de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, en productos alimentos o piensos. 65 En una realización preferida, los productos alimenticios se seleccionan del grupo que comprende productos lácteos, productos de confitería, bebidas, productos cárnicos, productos vegetarianos, suplementos alimenticios, productos

nutricionales destinados al control de peso, alimentos deportivos, médicos y alimentos para ancianos, y productos alimenticios de panadería. En una realización preferida, los productos alimenticios son productos alimenticios de panadería o productos alimenticios de confitería. Las proteínas de guisante tal como se describe en el presente documento pueden, por ejemplo, reemplazar parcial o completamente otras proteínas en piensos o productos alimenticios, tal como, por ejemplo, proteínas de origen animal, tales como las proteínas lácteas. Las aplicaciones particularmente adecuadas de las proteínas de guisante como se describe en el presente documento pueden implicar, por ejemplo, aplicaciones en las que está implicada la reacción de Maillard, es decir, reacciones de pardeamiento o glaseado, tal como la que se encuentra normalmente en procesos para preparar productos alimenticios de panadería o productos de confitería.

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

Ejemplos

15 Protocolos

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

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

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

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

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

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

Medición de pH en extracto de proteína en polvo

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

Medición del pH de productos alimenticios

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

Enumeración de bacterias del ácido láctico

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

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

Los guisantes o la suspensión de guisantes se molieron con un molinillo, Magic Bullet, Homeland Housewares.

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

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

15 **Determinación de materia seca**

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

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

$$25 \text{ Materia seca (\%)} = (m3 - m1)/(m2 - m1) \times 100$$

m1 = peso del plato de aluminio seco (en g)

30 m2 = peso del plato de aluminio con la muestra antes del secado (en g)

m3 = peso del plato de aluminio con la muestra después del secado (en g)

35 **Determinación de materia seca de productos alimenticios**

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

40 **Determinación del contenido de proteínas por el método Dumas**

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

50 Los resultados se expresan como un porcentaje de proteína (% N*6,25):

% de nitrógeno = g de nitrógeno por 100 g de muestra

55 % de proteína = % de nitrógeno x 6,25

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

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

reducen a N molecular, que se determina cuantitativamente por un detector de conductividad térmica. El contenido de nitrógeno se calculó después mediante un microprocesador.

Los resultados se expresaron como un porcentaje de nitrógeno:

5

% de nitrógeno = g de nitrógeno por 100 g de muestra

Determinación del índice de solubilidad de nitrógeno (ISN)

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

15

Se introdujeron 9,0 g de muestra en un vaso de precipitados de 400 ml y se hicieron hasta 300 g (balanza Ohaus ARC120, sensibilidad 0,01 g, capacidad 3100 g) con agua desmineralizada a temperatura ambiente. La suspensión se homogeneizó con una cuchara y luego se agitó durante 5 minutos en una placa de agitación (Stuart US151) a intensidad 4. Se recogieron 10 ml de la suspensión de partida y se analizó el contenido de nitrógeno en un analizador de proteínas Leco FP 2000. La suspensión se dividió en dos vasos de precipitados de 150 ml, el pH se elevó en uno y disminuyó en el otro. El pH de la suspensión se ajustó a pH 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7 y 8 con HCl 1N o NaOH 1N (pHmetro WTW pH/Cond 340i/SET). Para cada ajuste de pH, el valor del pH se registró una vez estabilizado y se recogieron 10 ml de la suspensión en un tubo de centrifuga de 10 ml. Las alícuotas de la suspensión a diferente pH se centrifugaron 15 min a 6000 rpm (centrifuga ALC 4239 R). Los diferentes sobrenadantes se recogieron y analizaron para determinar el contenido de nitrógeno en un analizador de proteínas Leco FP 2000. Para cada pH probado, se calculó el índice de solubilidad de nitrógeno de acuerdo con la siguiente expresión:

20

25

% de índice de solubilidad de nitrógeno = % de nitrógeno en el sobrenadante / % de nitrógeno en la solución de partida x 100

30

Determinación del pH isoelectrico de la proteína que comprende la fracción

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

35

40

45

% de índice de solubilidad de nitrógeno = % de nitrógeno en el sobrenadante / % de nitrógeno en la solución de partida x 100

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

Determinación de azúcares

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

50

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

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

55

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

60

65

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

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

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

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

Medición de acidez

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

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

25 Cuando se midió la acidez del "zumo de guisante", se tomó una muestra (A) directamente del recipiente de fermentación. Se pesó la muestra (A). Se añadió lentamente 1 mol/l de solución de hidróxido de sodio (C) (n.º 1.09137.1000 TitriPURR; Densidad = d = 1,04 kg/l) hasta que el pH de la muestra se estabilizó a pH 7 durante al menos dos minutos. Luego se calculó la masa de hidróxido de sodio (B).

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

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

35 Se pesó una cantidad exacta de la suspensión de guisantes (A'). Se añadió lentamente 1 mol/l de solución de hidróxido de sodio (C) (n.º 1.09137.1000 TitriPURR; Densidad = d = 1,04 kg/l) hasta que el pH de la suspensión se estabilizó a pH 7 durante al menos dos minutos. Luego se calculó la masa de hidróxido de sodio (B').

$$\text{Acidez (mEq/kg)} = (B' \cdot (C'/d)/(A'10)) \cdot 1000$$

40 Determinación de cenizas

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

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

$$\text{Ceniza (\%)} = (m3 - m1)/(m2 - m1) \times 100$$

m1 = peso del crisol (en g)

55 m2 = peso del crisol con muestra (en g)

m3 = peso del crisol con cenizas (en g)

Determinación del contenido de potasio mediante ICP-AES

La determinación de potasio se realizó por ionización de la muestra en plasma de gas inerte. El aparato ICP-AES (por sus siglas en inglés, espectrometría de emisión atómica de plasma acoplada inductivamente) se calibró con cloruro de potasio comercializado por Merck con la referencia 104938. Los pesos de cloruro de potasio utilizados para la calibración se adaptaron de acuerdo con el contenido de potasio de la muestra. Se prepararon 2 g de cenizas a partir de la muestra según el método de determinación de cenizas. Las cenizas se diluyeron en agua desmineralizada para estar en el intervalo de lectura del aparato. La solución se filtró sobre papel Whatman 595 1/2 185 mm. La muestra filtrada se ionizó por inyección en el ICP - AES. Los resultados se expresan en mg/kg o ppm (mg de potasio por kg de muestra).

Determinación del contenido de magnesio mediante ICP-AES

La determinación de magnesio se realizó por ionización de la muestra en plasma de gas inerte. El aparato ICP-AES (espectrometría de emisión atómica de plasma acoplada inductivamente) se calibró con el patrón de ICP de magnesio comercializado por Merck con la referencia 170331 (1000 mg/l) o 170379 (10000 mg/l). Los pesos del patrón de ICP de magnesio utilizados para la calibración se adaptaron de acuerdo con el contenido de magnesio de la muestra. Se prepararon 2 g de cenizas a partir de la muestra según el método de determinación de cenizas. Las cenizas se diluyeron en agua desmineralizada para estar en el intervalo de lectura del aparato. La solución se filtró sobre papel Whatman 595 1/2 185 mm. La muestra filtrada se ionizó por inyección en el ICP - AES. Los resultados se expresan en mg/kg o ppm (mg de magnesio por kg de muestra).

Determinación de la viscosidad con el viscosímetro Brookfield DVII

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

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

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

50 Medición de color

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

55 Aparato:

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

60 Procedimiento: Preparación de la muestra

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

65 Método

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

Resultados

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

Análisis sensorial para proteínas en solución

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

15 Actividad del agua

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

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

25 Análisis sensorial para productos horneados

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

Dureza de las galletas:

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

Aparato:

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

Procedimiento:

- 45 - Colocar el límite superior de la cruceta de modo que la cuchilla Warner Bratzler esté 1 mm por encima de la superficie de la muestra
 - Configuración de TA-XT2i:
 o Medir la fuerza en la compresión - Regresar al inicio
 50 o Velocidad previa a la prueba: 3 mm/s
 o Velocidad de ensayo: 2 mm/s
 o Velocidad posterior a la prueba: 10 mm/s
 o Distancia de penetración: 5 mm
 o Tipo de disparador: Auto - 3 g
 55 - Comienza la prueba de penetración. Los resultados fueron registrados por Texture Analyzer y representados en un gráfico

Resultados

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

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

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

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

5 Los guisantes fueron luego sometidos a fermentación con bacterias del ácido láctico (con *Lactobacillus fermentum*). Hasta aquí, los guisantes se remojaron en agua potable de manera discontinua. En lotes posteriores, parte del medio de fermentación (fase acuosa excluyendo guisantes) de un lote anterior se usó como un inóculo para efectuar la fermentación posterior. Los guisantes fueron sometidos a fermentación en presencia de aproximadamente 10^8 ufc de bacterias del ácido láctico por ml de composición acuosa que comprende guisantes. 400 kg de guisantes por m^3 del volumen total de composición acuosa que comprende guisantes se colocaron en un recipiente. La fermentación se realizó anaeróticamente en un recipiente cerrado sin desgasificar a una temperatura de aproximadamente 40 °C, hasta que se alcanzó un pH en los guisantes de 4,4. Durante la fermentación, la fase acuosa en el recipiente de fermentación se recirculó a aproximadamente 20 m^3 /hora. Los guisantes se fermentaron durante una duración de 480 min. Al final de la fermentación, los guisantes habían absorbido agua en una cantidad de aproximadamente su masa inicial antes de la fermentación y tenían un contenido de materia seca de aproximadamente el 43 % (basado en el peso).

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

25 Después de la molienda y el ajuste del pH, la pasta de guisantes molida se sometió a decantación centrífuga. El sobrenadante que contenía proteínas e impurezas solubles tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 4 % (en peso).

30 La fracción proteica acuosa se sometió posteriormente a un tratamiento térmico a 75 °C durante 15 segundos en un intercambiador de calor de placas.

35 Posteriormente, las proteínas de guisante se aislaron por precipitación isoelectrica. Para esto, el pH de la fracción que contenía proteínas de guisante se ajustó a 4,7 con ácido sulfúrico. La separación de las proteínas precipitadas/agregadas se realizó por decantación centrífuga. La fracción resultante que contenía proteínas de guisante (suspensión acuosa) tenía un contenido de materia seca de aproximadamente el 25 % (basado en el peso). Se añadió agua potable hasta alcanzar un contenido de materia seca del 14 % (basado en el peso).

40 A continuación, el pH de la suspensión acuosa se ajustó a 7,6 con hidróxido de sodio. La suspensión se sometió luego a tratamiento térmico calentándola a aproximadamente 90 °C por medio de un intercambiador de calor de placas y manteniendo la suspensión a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante 7 min.

Por último, la suspensión se secó por pulverización. La temperatura de entrada del secador por pulverización fue de aproximadamente 150 °C y la temperatura de salida fue de aproximadamente 70 °C.

45 **Ejemplo 2: Evolución del contenido de azúcar y pH/acidez en los guisantes durante la etapa de fermentación de un método según una realización de la invención**

Este ejemplo se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. El experimento se repitió aproximadamente 65 veces con diferente duración de la fermentación.

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

55 Los guisantes fueron luego sometidos a fermentación con bacterias del ácido láctico (con *Lactobacillus fermentum*). Hasta aquí, los guisantes se remojaron en agua potable de manera discontinua. En lotes posteriores, parte del medio de fermentación (fase acuosa excluyendo guisantes) de un lote anterior se usó como un inóculo para efectuar la fermentación posterior. Los guisantes se sometieron a fermentación en presencia de 10^8 ufc de bacterias del ácido láctico por ml de composición acuosa que comprende guisantes. 400 kg de guisantes por m^3 del volumen total de composición acuosa que comprende guisantes se colocaron en un recipiente. La fermentación se realizó anaeróticamente en un recipiente cerrado sin desgasificar a una temperatura de aproximadamente 40 °C. Durante la fermentación, la fase acuosa en el recipiente de fermentación se recirculó a aproximadamente 20 m^3 /hora. Los guisantes se fermentaron durante diferentes duraciones como se resume en la figura 2. Después de la fermentación, los guisantes se eliminaron del medio de fermentación y se sometieron a diferentes análisis.

El contenido de azúcar en guisantes secos desvainados antes de la fermentación se calculó en 20 muestras de guisantes y fue un promedio de 8 % en peso (en materia seca) con un mínimo de 6,4 % en peso y un máximo de 9 % en peso. El contenido de azúcar se basó en la concentración total de glucosa, fructosa, sacarosa, verbascosa, rafinosa, estaquiosa y galactosa.

5 La evolución del contenido de azúcar en los guisantes a lo largo del tiempo de fermentación se muestra en la figura 2.

10 El pH y la acidez del medio de fermentación, así como el pH y la acidez de los guisantes, se evaluaron a lo largo del tiempo de fermentación. Las figuras 3 y 4 ilustran la evolución del pH y la acidez, respectivamente, tanto dentro de los guisantes como en el medio de fermentación (también referido como zumo).

Ejemplo 3: Evolución del crecimiento bacteriano durante la etapa de fermentación espontánea de un método según una realización de la invención

15 Este ejemplo se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación. El experimento se repitió 7 veces.

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

25 Los guisantes se sometieron a continuación a una fermentación espontánea con bacterias del ácido láctico. Hasta aquí, los guisantes se remojaron en agua potable de manera discontinua. No se usó inóculo para realizar la fermentación. 400 kg de guisantes por m³ del volumen total de composición acuosa que comprende guisantes se colocaron en un recipiente. La fermentación se realizó anaeróbicamente en un recipiente cerrado sin desgasificar a una temperatura de aproximadamente 40 °C para los experimentos 1 a 6 y a una temperatura de aproximadamente 45 °C para el experimento 7 (cinética de laboratorio). Durante la fermentación, se recirculó la fase acuosa en el recipiente de fermentación. Los guisantes se sometieron a fermentación durante un período que varió de 100 min a 900 min, como se muestra en la figura 5.

30 La figura 5 representa un gráfico que representa la concentración de bacterias del ácido láctico de la composición acuosa que incluye los guisantes contenidos en los primeros tanques de fermentación de una serie de experimentos en función del tiempo de fermentación.

35 Ejemplo 4: Medida del pH de diferentes aguas, con o sin adición de guisantes secos triturados y desvainados

Todos los valores de pH se midieron a temperatura ambiente con un medidor de pH calibrado el día de las mediciones antes de su uso.

40 La tabla 1 ilustra el pH de los diferentes tipos de agua utilizados: agua del grifo, agua desionizada y agua de pozo tratada. El agua del pozo se trató para ser segura para el consumo humano de acuerdo con la directiva europea 98/83/CE (también denominada en el presente documento agua potable).

Tabla 1

Agua	pH
Agua del grifo	7,54
Agua desionizada	7,75
Agua de pozo tratada	7,52

45 La tabla 2 ilustra el pH de suspensiones de guisantes secos triturados y desvainados que contienen un contenido de materia seca del 25 % en peso. El pH se determinó después de suspender guisantes molidos en diferentes tipos de agua durante 1 min con agitación magnética (200 rpm).

50 Tabla 2

Agua	pH
Agua del grifo	6,43
Agua desionizada	6,38
Agua de pozo tratada	6,49

55 La tabla 3 ilustra el pH de suspensiones de guisantes secos triturados y desvainados en agua de pozo tratada que contienen concentraciones crecientes de contenido de materia seca. El pH se determinó después de suspender guisantes molidos en agua durante 1 min con agitación magnética (200 rpm).

Tabla 3

% en peso de materia seca de las suspensiones	pH
5	6,86
15	6,57
25	6,49
35	6,36
45	6,35

La tabla 4 ilustra el pH de las fases acuosas (excluyendo los guisantes) de suspensiones de guisantes secos enteros desvainados (270 g de guisantes + 520 g de agua) en los tipos de agua indicados que posteriormente se homogeneizaron durante 5 segundos. El pH se midió inmediatamente después de la homogeneización de los guisantes y el agua.

Tabla 4

Agua	pH
Agua del grifo	6,69
Agua desionizada	6,4
Agua de pozo tratada	7,01

10 Ejemplo 5: Comparación de métodos de extracción de proteínas con fermentación (según una realización de la invención) o sin fermentación (ejemplo comparativo)

El extracto proteico 3 (producto 3) se preparó (según la invención) como se describe en el ejemplo 1 a partir de guisantes desvainados secos utilizando un método que comprende una etapa de fermentación (fermentación durante 8 h a 40 °C en presencia de *Lactobacillus fermentum*). El experimento se repitió usando condiciones idénticas y se obtuvo el producto 4.

El extracto proteico 1 (producto 1) se preparó (no según la invención) a partir de guisantes desvainados secos que no se habían sometido a una etapa de fermentación sino solo a una etapa de hidratación (hidratación durante 40 minutos a 15 °C). El experimento se repitió usando condiciones idénticas y se obtuvo el producto 2.

En todos los casos los guisantes estaban hidratados, aunque en algo menor medida en el montaje sin fermentación con un contenido de materia seca de los guisantes del 67 % (en peso). Después de la hidratación y/o fermentación, los guisantes se eliminaron en todos los casos de la fase acuosa y se sometieron a molienda en húmedo en presencia de agua potable adicional de modo que la composición final tuviera un contenido de materia seca de aproximadamente el 24 %. Con la configuración sin fermentación el pH de los guisantes no bajó y fue aproximadamente de 6,5, mientras que para el montaje con fermentación el pH de los guisantes se redujo drásticamente y alcanzó un valor de 4,4. Después de la molienda el proceso de extracción fue similar en ambos casos hasta la etapa de secado y como se describe en el ejemplo 1. Se observó que la pureza de las proteínas después de la molienda fue menor en el montaje sin fermentación. También, la tendencia al ensuciamiento de los intercambiadores de calor durante el tratamiento térmico posterior aumentó en el montaje sin fermentación. Después de la molienda, la precipitación de proteínas, así como el contenido de materia seca resultante alcanzó una eficacia similar tanto en el montaje con como en el sin fermentación. En los extractos finales de proteínas de guisante, la pureza de las proteínas fue menor en el montaje sin fermentación. También, la cantidad total de azúcares en el extracto de proteínas de guisante final fue mayor en el montaje sin fermentación.

Las diferencias en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas extraídas con o sin fermentación se pueden resumir de la siguiente manera:

40 - la composición general era similar, aunque el extracto de proteínas obtenido sin la inclusión de la etapa de fermentación tuvo un mayor contenido de K⁺ (3x) y uno mayor de Mg²⁺ (x1,6) en comparación con el extracto de proteínas obtenido con la inclusión de la etapa de fermentación. La tabla 5 resume el contenido de potasio y magnesio (en base seca) expresado como ppm/materia seca (ppm/DM) de los productos 2 y 4.

Tabla 5

Productos	Potasio	Magnesio
Unidades	(ppm/DM)	(ppm/DM)
Producto 2	518	3500
Producto 4	315	1200

45 - la pureza de la proteína se redujo en un 1,5 % en los extractos de proteínas preparados sin etapa de fermentación (86,0 % de proteína sobre base seca) en comparación con los extractos de proteínas preparados con etapa de fermentación (87,3 % de proteína sobre base seca)

- el contenido de azúcares se incrementó unas 3 veces en los extractos de proteínas preparados sin la inclusión de la

etapa de fermentación (1,40 % de azúcares sobre base seca) en comparación con los extractos de proteínas preparados con la inclusión de la etapa de fermentación (0,45 % de azúcares sobre base seca). El contenido de azúcar se basó en la concentración total de glucosa, fructosa, sacarosa, verbascosa, rafinosa, estaquiosa y galactosa.

5 - la viscosidad se redujo aproximadamente 3,5 veces y 2,5 veces respectivamente a pH 7,8 y pH 6,4 en extractos de proteínas preparados con la etapa de fermentación en comparación con extractos de proteínas preparados sin etapa de fermentación (véase también la figura 6).

La viscosidad medida para cada extracto a diferente pH se da en la Tabla 6 y el perfil de viscosidad se muestra en la Figura 6.

10

Tabla 6

Producto	Viscosidad (cP)				
	pH 7,8	pH 6,4	pH 6,2	pH 6	pH 5,8
Producto 1	15813	21653	26133	33680	35667
Producto 2	13627	24507	28000	31653	33307
Producto 3	3931	9179	14738	23176	25748
Producto 4	4195	9020	13873	20800	27200

15 - el color del extracto de proteína seco fue ligeramente más rosa/naranja en los extractos preparados sin la etapa de fermentación en comparación con los extractos preparados con la etapa de fermentación basándose en la observación visual; también el color de los extractos de proteínas cuando se dispersaron (solución al 4 % en peso en agua) fue ligeramente más anaranjado en los extractos preparados sin la etapa de fermentación en comparación con los extractos preparados con la etapa de fermentación.

15

20 - se determinó que el sabor del extracto de proteína cuando se dispersó (solución al 4 % en peso en agua del grifo) era más amargo y astringente en los extractos preparados sin la etapa de fermentación en comparación con los extractos preparados con la etapa de fermentación.

20

Ejemplo 6: Productos alimenticios que comprenden proteínas de guisante según la invención

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

25

1. Galletas

Se prepararon masas para galletas. Las proteínas A de guisante se prepararon como se describe a continuación.

30

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

35

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

45

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

50

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

55

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

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

El contenido de materia seca de la suspensión acuosa se ajustó a aproximadamente el 16 % (en peso) después de la adición de agua; seguido de un ajuste del pH de la suspensión con hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de aproximadamente 7,4. Posteriormente, la suspensión se sometió a un tratamiento térmico a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante aproximadamente 7 minutos; y luego se secó por pulverización para obtener un polvo (proteínas de guisante A) que tiene un contenido de materia seca de aproximadamente 95 % (en peso).

La masa se preparó como se muestra en la Tabla 7

15

Tabla 7

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

Un análisis de la masa se da en la Tabla 8.

Tabla 8

	Masa 1
masa de pH	7,3
Proceso de observaciones	La textura de la masa era lo suficientemente suave, la laminación era suficiente
A _w en galletas (%) (actividad del agua)	15,5

20

2. Barras de dulce de leche

Las recetas de la barra de dulce de leche se muestran en la Tabla 9.

25

Tabla 9

Ingredientes	(g)
Jarabe de azúcar invertido	17,22
Proteínas de guisante A	15,00
Proteínas de la leche - Nutrilac DR-7015V	12,00
Jarabe de oligofruktosa - Fibrulosa L85	11,10
Jarabe de glucosa 38 DE	10,00
Caseinato de calcio - Protilight	5,00
Jarabe de sorbitol	3,00
Arándanos secos	3,00
Aceite de girasol	2,20
Glicerina	2,00
Grasas vegetales hidrogenadas	2,00
(continuación)	
Ingredientes	(g)
Citrato de calcio	1,6611

Maltodextrinas 18 DE	1,072
Citrato de magnesio	0,4672
Sal	0,15
Lecitina de soja	0,10
Aroma de frambuesa - Frambuesa 54428 A7	0,03
Chocolate negro (recubrimiento)	14,00
Total (g)	100

El proceso para preparar las barras fue el siguiente

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

El pH, la Aw (actividad del agua) y la dureza de las barras de dulce de leche con el tiempo (meses) se midieron y los resultados se ilustran respectivamente en las Tablas 10, 11 y 12.

Tabla 10

pH	
T0	6,19
Mes 1 (M1)	6,11
Mes 2 (M2)	nd
Mes 3 (M3)	6,34
Mes 6 (M6)	6,27
Mes 12 (M12)	nd

15

Tabla 11

Aw	
T0	0,654
M1	0,656
M2	0,655
M3	0,660
M6	0,647
M12	nd

Tabla 12

Dureza	
T0	1106
M1	1610
M2	1853
M3	1929
M6	2228
M12	3284

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

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

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

35

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

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

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

15 Las figuras 7-10 ilustran respectivamente la evolución del contenido de azúcar, pH, acidez y concentración de bacterias del ácido láctico en función del tiempo de fermentación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer proteínas de guisante, que comprende las etapas de:
 - (a) someter una composición acuosa que comprende guisantes a fermentación en presencia de bacterias del ácido láctico antes de la molienda;
 - (b) moler dichos guisantes;
 - (c) fraccionar dichos guisantes molidos para obtener al menos una fracción que comprende proteínas; y;
 - (d) aislar proteínas de guisante de dicha al menos una fracción que comprende proteínas.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación hasta que el pH en dichos guisantes sea como máximo de 5,5, preferentemente como máximo de 5,0, más preferentemente, que varíe de 3,5 a 5, preferentemente tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y suspendido en 9 g de agua.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación hasta que el pH en dichos guisantes se reduce en al menos 1 unidad de pH, preferentemente en al menos 1,5 unidades de pH, preferentemente tal como se mide a temperatura ambiente en 1 g de dichos guisantes que se han molido y luego suspendido en 9 g de agua.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa (a) comprende añadir guisantes secos y/o guisantes desvainados a una solución acuosa, preferentemente añadir guisantes secos que tienen un contenido de materia seca que varía del 80 % al 95 % basándose en el peso total de los guisantes secos.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa (a) comprende fermentar dichos guisantes hasta que tengan un contenido de materia seca que varíe del 35 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichos guisantes después de la etapa (a) y antes de la etapa (b) tienen un contenido de materia seca que varía del 35 % al 60 % basándose en el peso total de los guisantes.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación durante al menos 3 h, preferentemente durante al menos 3 h y como máximo 24 h.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación a una temperatura que varía de 30 °C a 50 °C, que preferentemente varía de 35 °C a 45 °C.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa (a) comprende fermentar dichos guisantes con una o más *Lactobacillus* sp.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dichos guisantes en la etapa (a) se someten a fermentación en presencia de al menos 10^2 ufc a 10^{10} ufc de bacterias del ácido láctico por ml de dicha composición acuosa que comprende guisantes.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende separar al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes del resto del guisante, preferentemente en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente de al menos 7, lo más preferentemente a un pH de al menos 8 y como máximo de 9.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende someter dichos guisantes molidos a una o más etapas de separación, preferentemente, una o más etapas de decantación centrífuga.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde aislar proteínas de guisante de dicha fracción que comprende proteínas de la etapa (d), comprende concentrar dichas proteínas de guisante.
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde aislar proteínas de guisante de dicha fracción que comprende proteínas de la etapa (d), comprende al menos una etapa de precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde:

- fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende separar al menos parte de las proteínas comprendidas en los guisantes del resto del guisante, preferentemente en una fracción que comprende al menos el 50 % en peso de proteína basándose en la materia seca total de dicha fracción, y/o fraccionar dichos guisantes molidos en la etapa (c) comprende ajustar el pH de los guisantes molidos a un pH de al menos 6, preferentemente de al menos 7, lo más preferentemente a un pH de al menos 8 y como máximo de 9; y

5 - aislar proteínas de guisante de dicha fracción que comprende proteínas de la etapa (d), comprende al menos una etapa de precipitación, floculación, filtración y/o cromatografía.

10 17. El extracto de proteína de guisante obtenible por el método de acuerdo con la reivindicación 16.

15 18. El uso del extracto de proteína de guisante de acuerdo con la reivindicación 17 en productos alimenticios o piensos, preferentemente, en productos lácteos, productos de confitería, bebidas, productos cárnicos, productos vegetarianos, suplementos alimenticios, productos nutricionales destinados al control de peso, alimentos deportivos, médicos y alimentos para ancianos, y productos alimenticios de panadería.

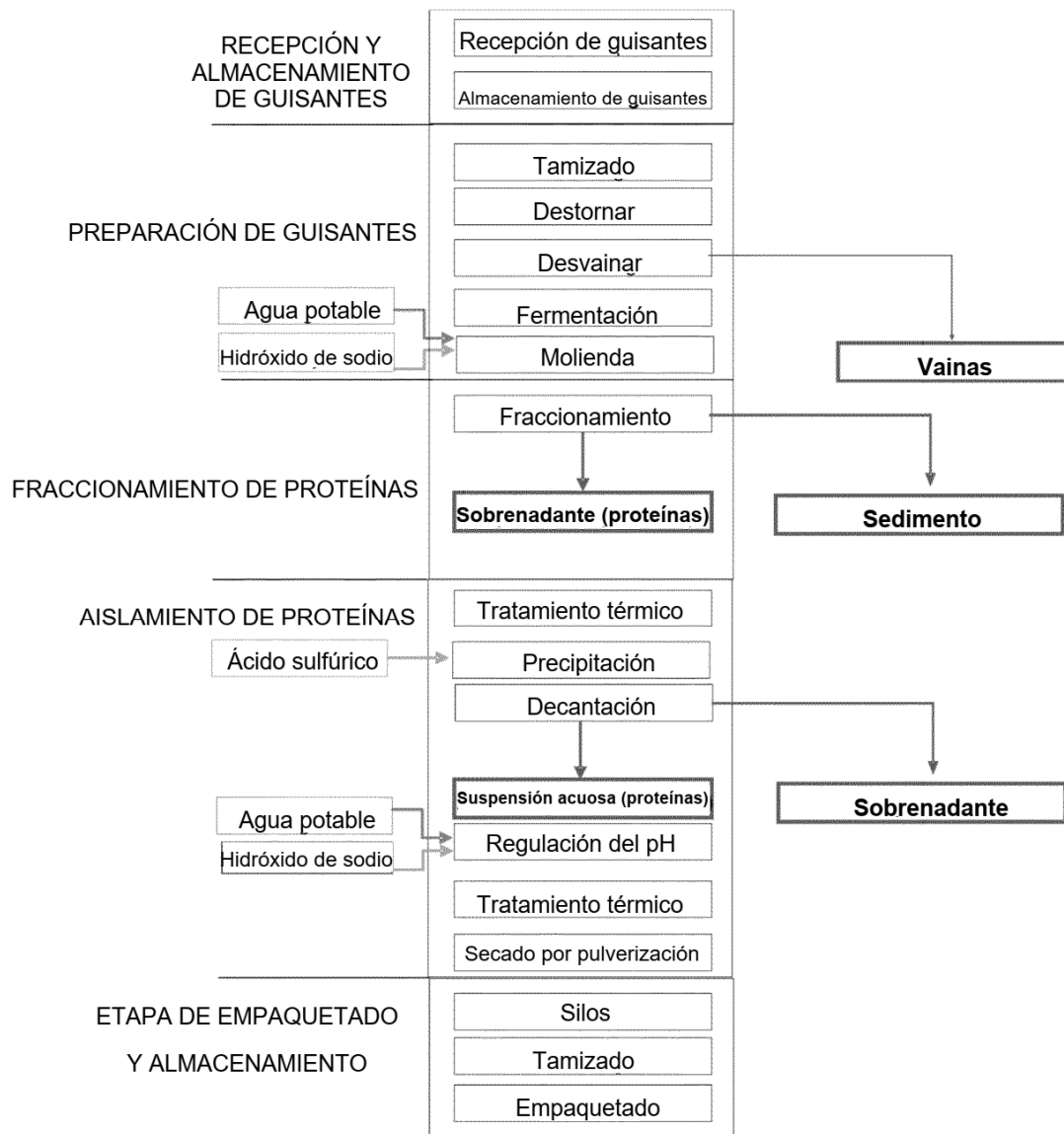


FIG. 1

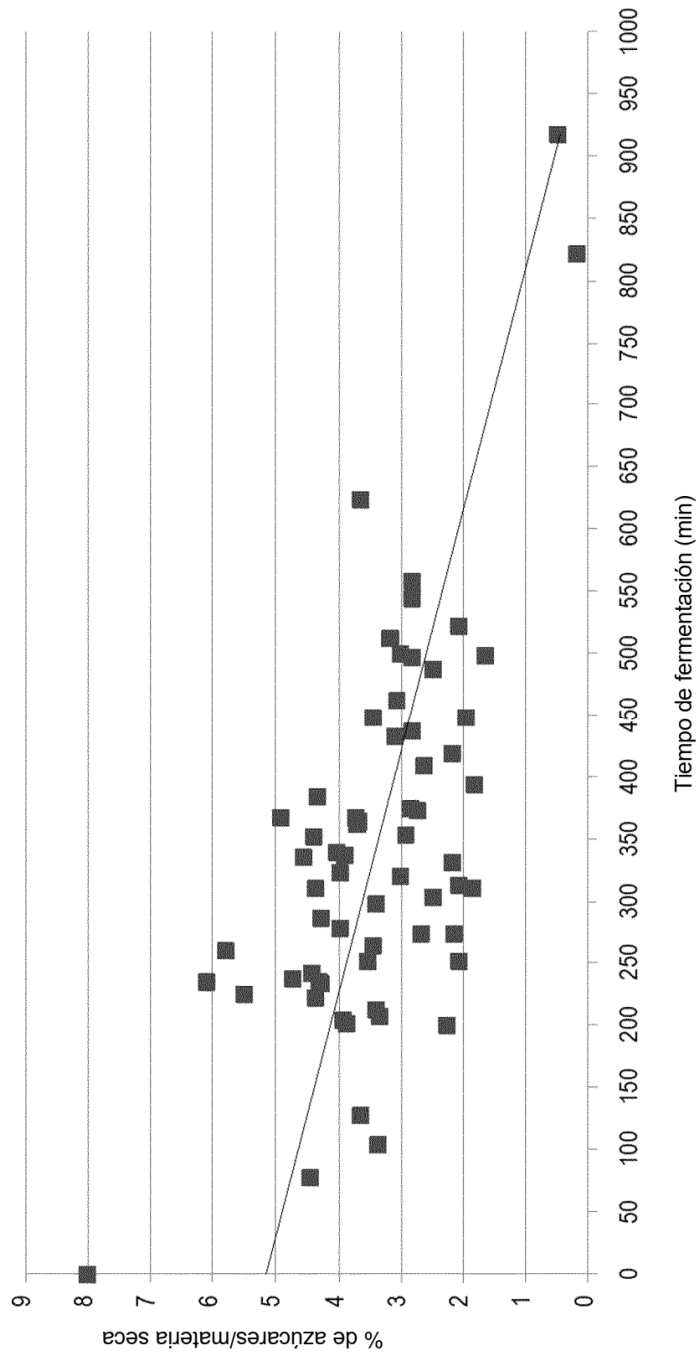


FIG. 2

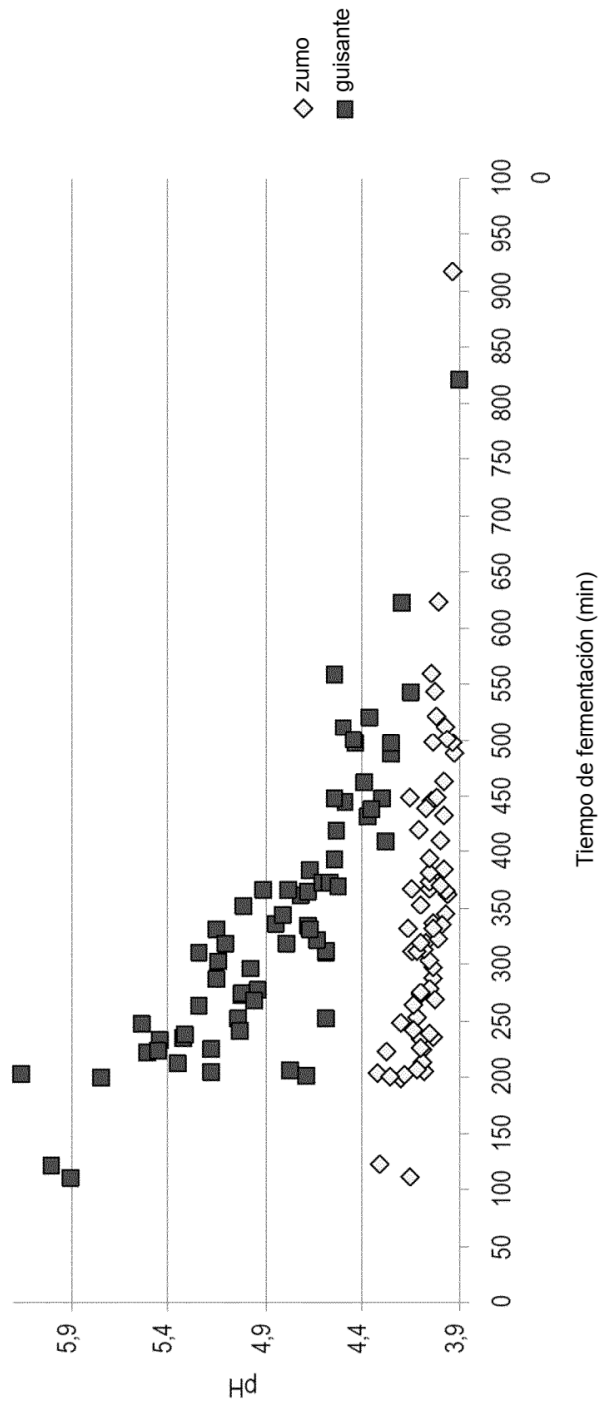


FIG. 3

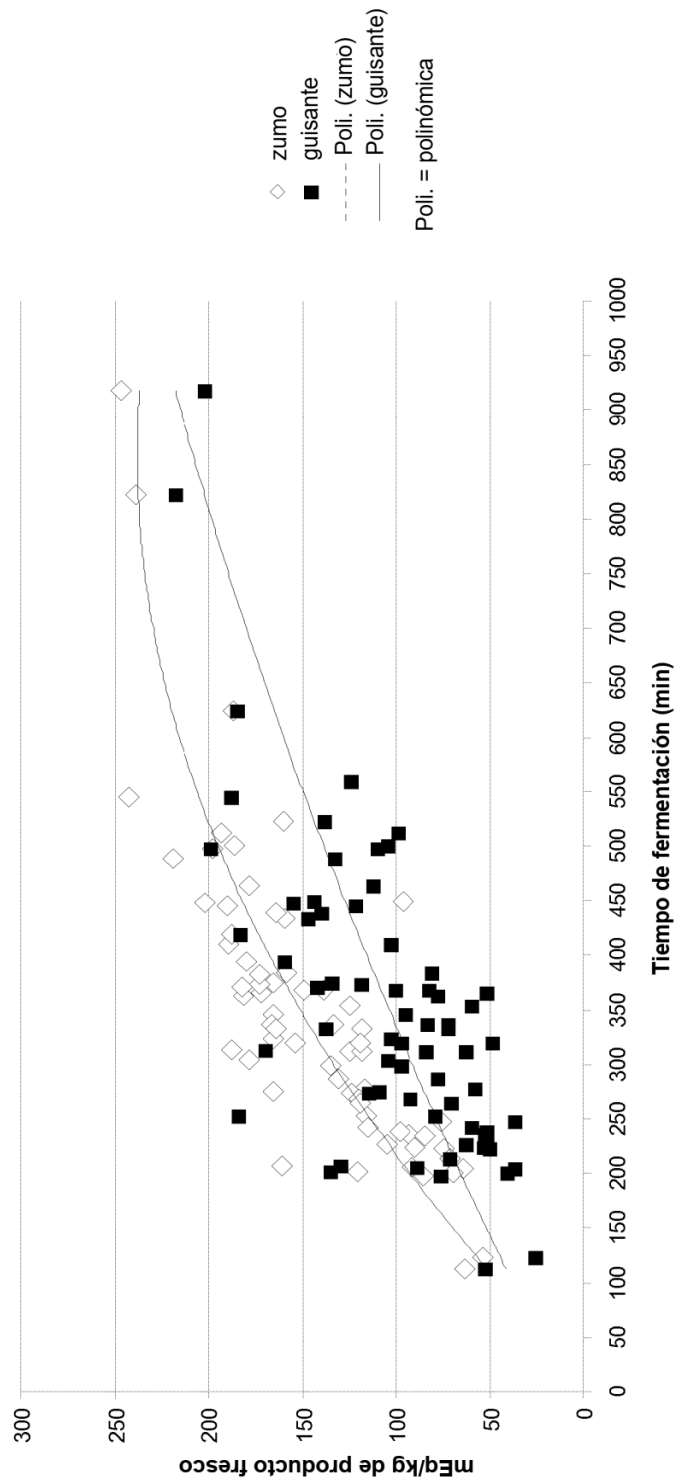


FIG. 4

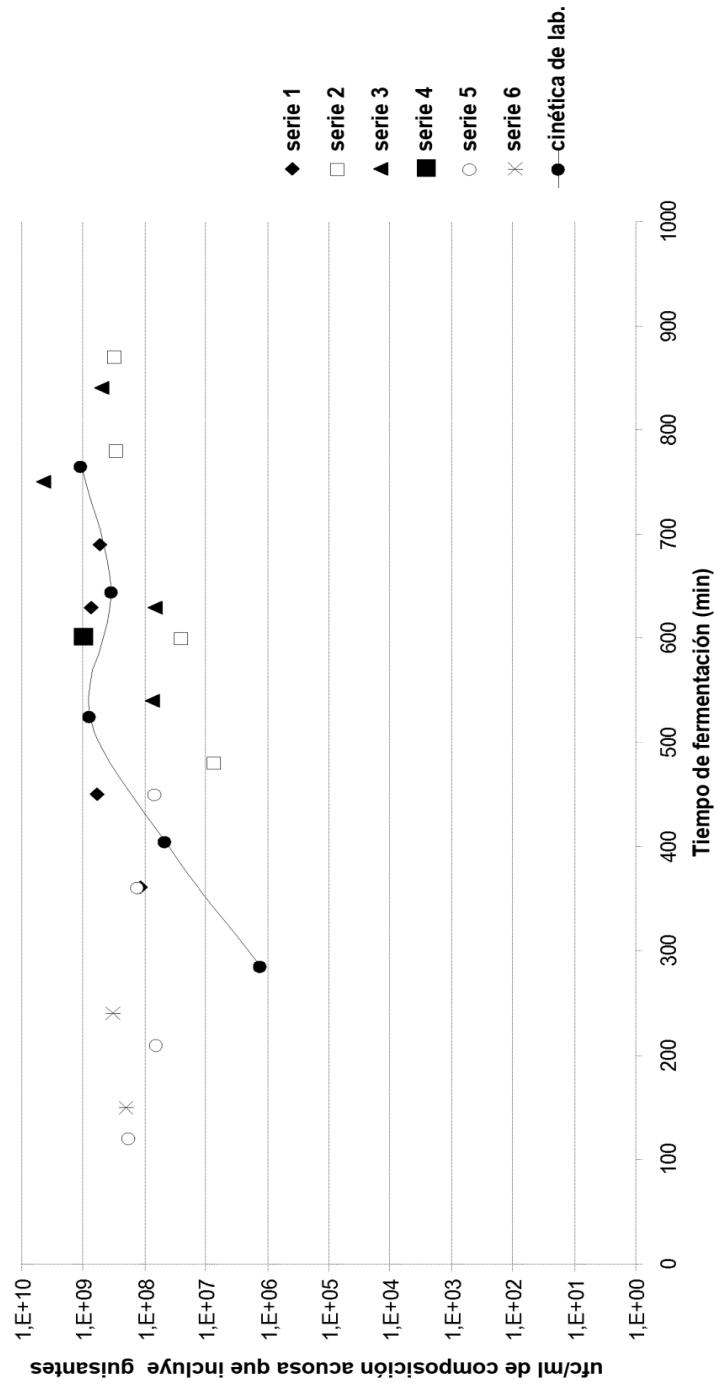


FIG. 5

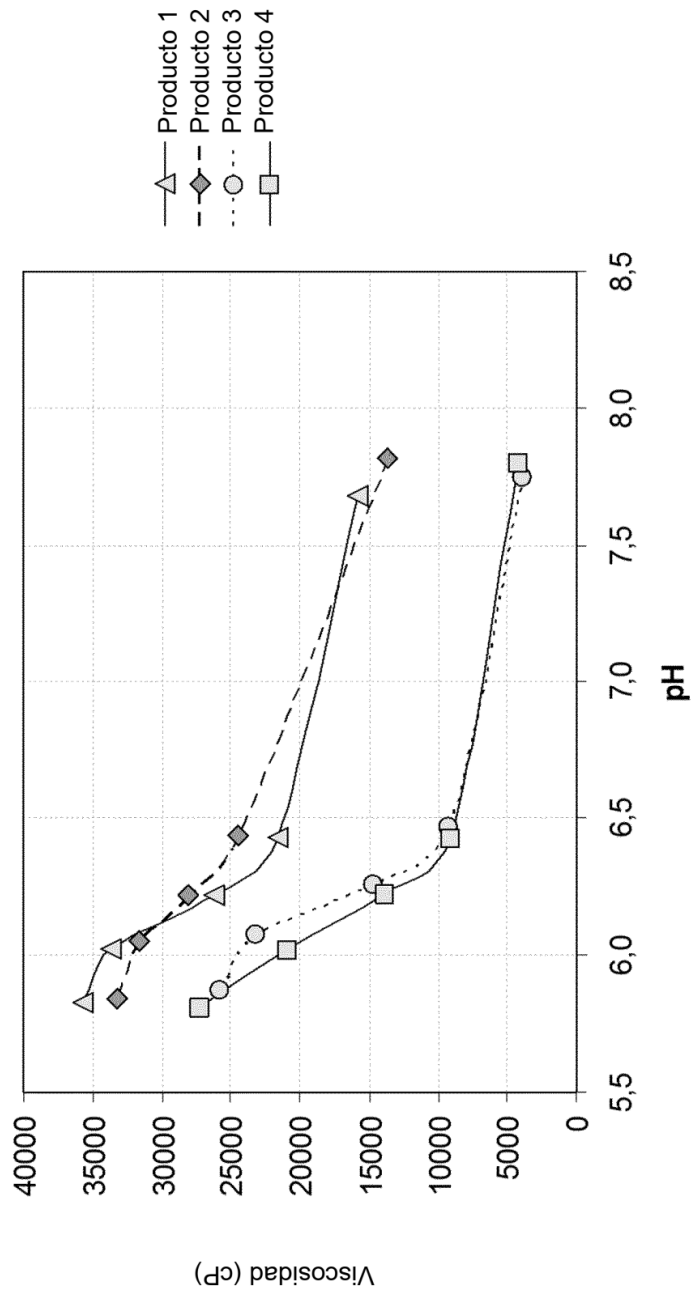


FIG. 6

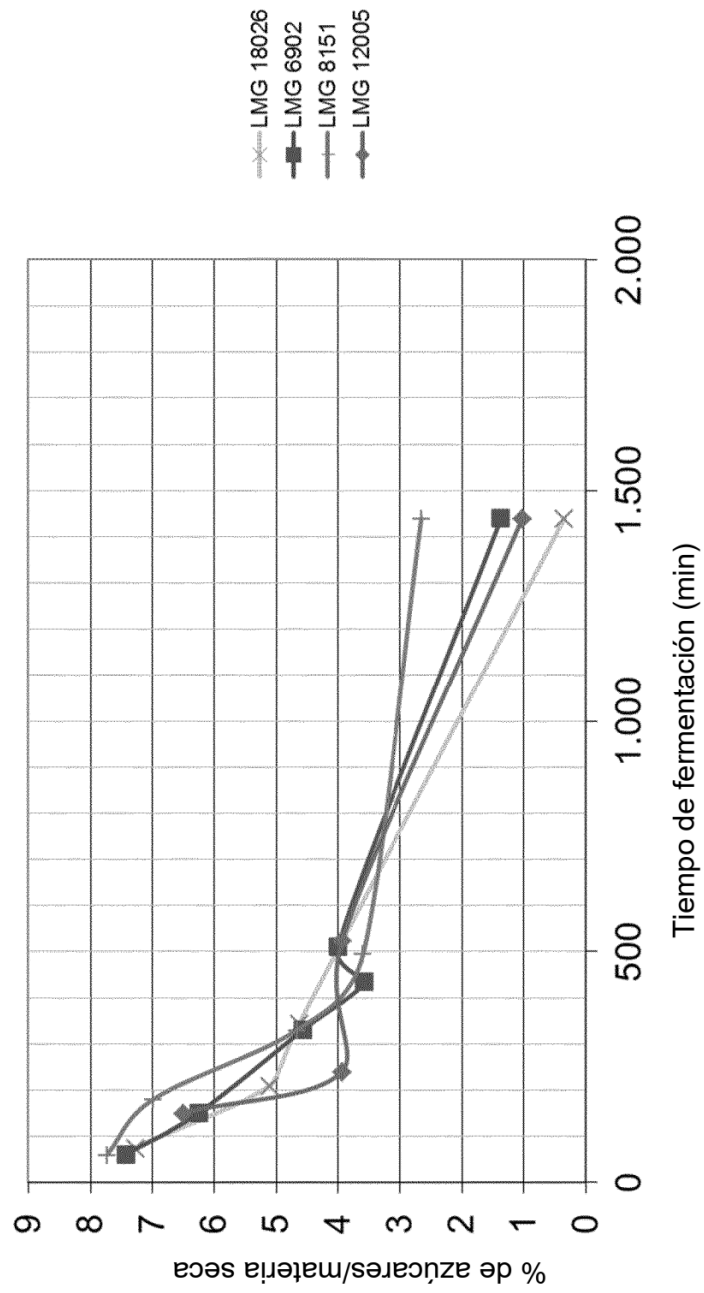


FIG. 7

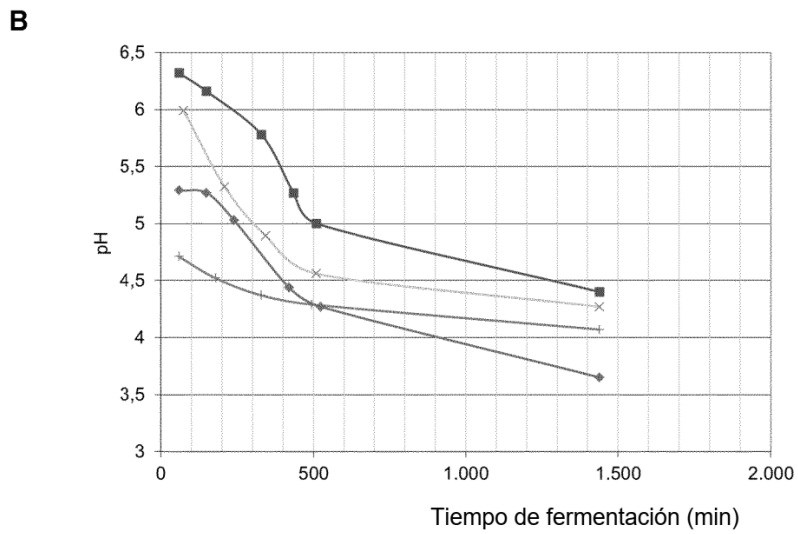
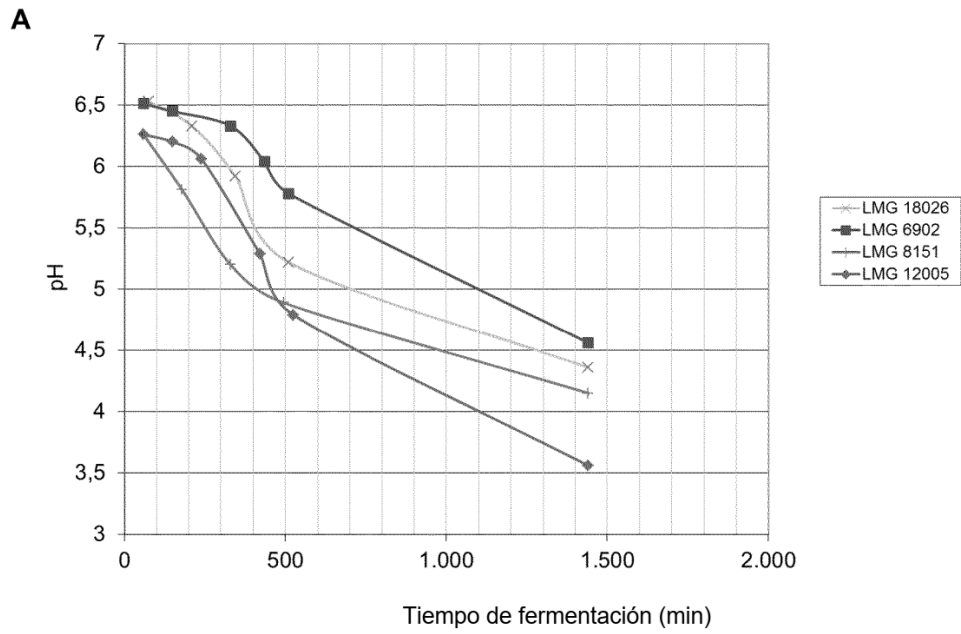


FIG. 8

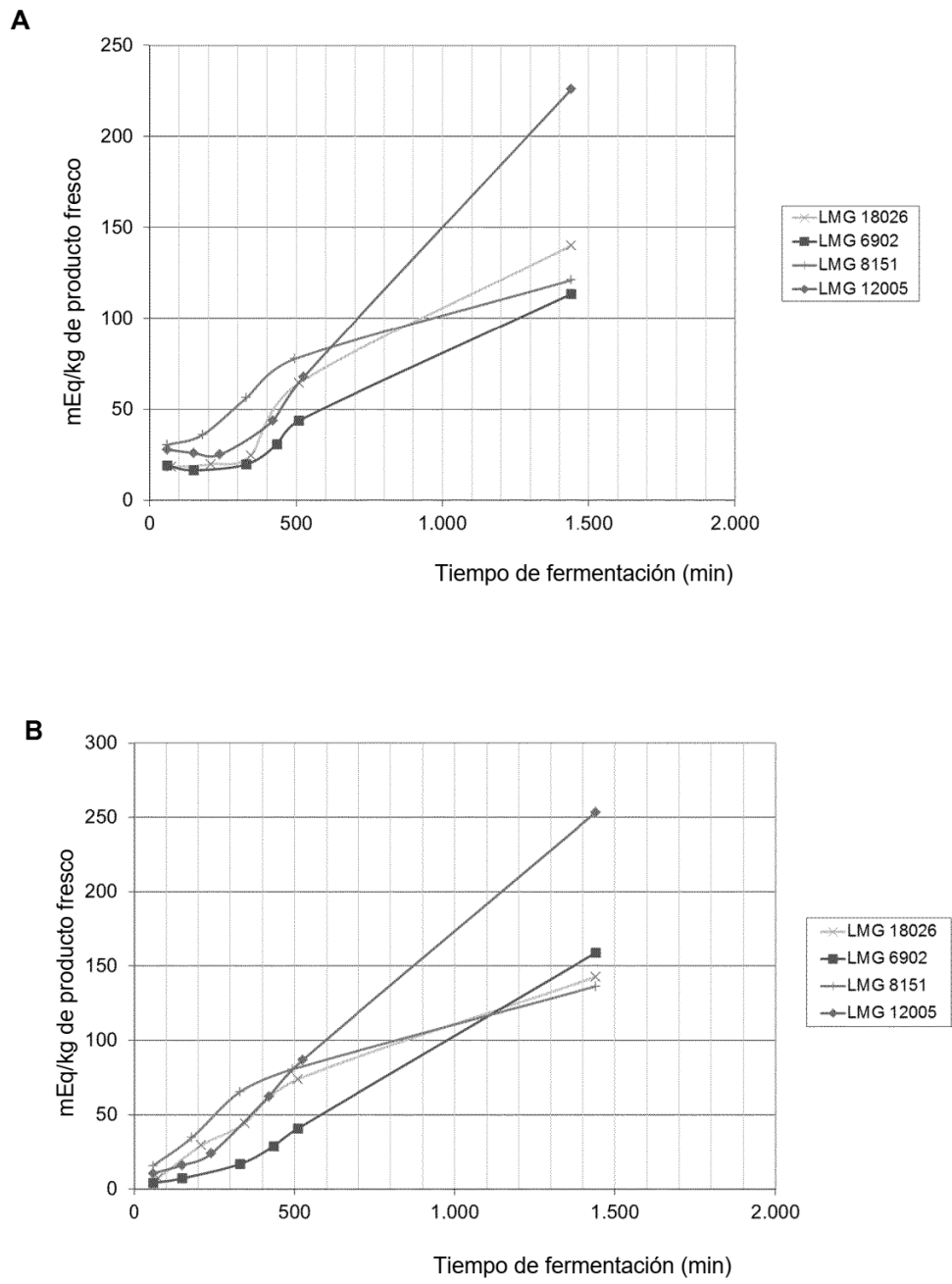


FIG. 9

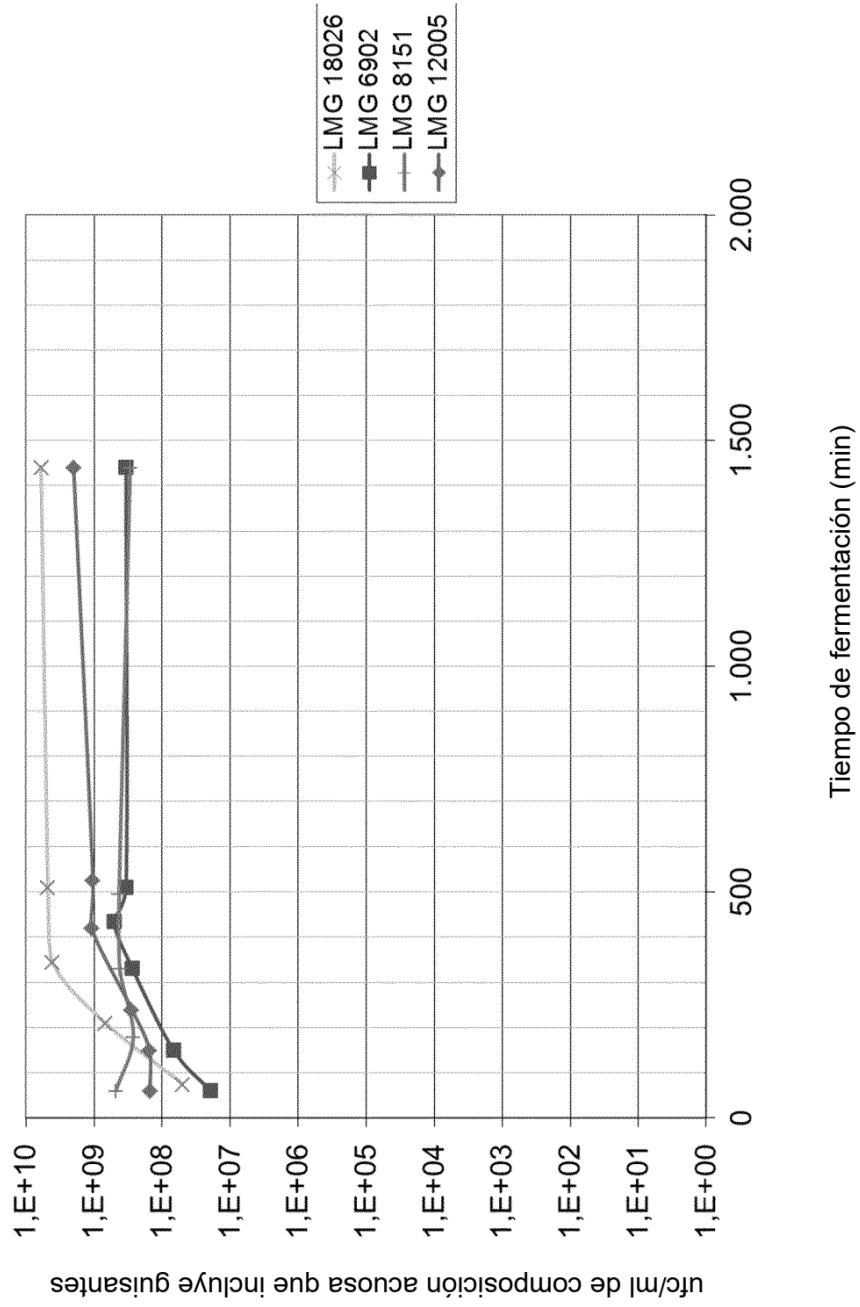


FIG. 10