



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 032**

51 Int. Cl.:

A23L 2/66 (2006.01)	A23L 2/54 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)	A23L 1/054 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01)	A23C 9/154 (2006.01)
A23C 11/06 (2006.01)	A23G 1/44 (2006.01)
A23G 3/44 (2006.01)	A23G 9/38 (2006.01)
A23G 3/52 (2006.01)	A23G 3/42 (2006.01)
A23G 1/52 (2006.01)	A23G 1/42 (2006.01)
A23G 9/34 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06805732 .2**

96 Fecha de presentación : **13.09.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1926399**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

54 Título: **Procedimiento para producir una composición aireada congelada.**

30 Prioridad: **23.09.2005 EP 05255944**
10.11.2005 EP 05256960

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2009

73 Titular/es: **Unilever N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Cox, Andrew, Richard;**
Homan, Jennifer, Elizabeth y
Russell, Andrew, Baxter

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 032 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

Procedimiento para producir una composición aireada congelada.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para producir composiciones aireadas congeladas, en concreto, a procedimientos que comprenden las etapas de aireación de una mezcla acuosa para formar una espuma, seguida por la congelación quiescente de la espuma.

10 Antecedentes de la invención

Las composiciones aireadas congeladas, por ejemplo, el helado, el sorbete y el yogur congelado, se producen convencionalmente mediante un procedimiento en el que la aireación y la congelación tienen lugar simultáneamente. Para realizar la aireación, se debe aplicar una cizalla o una agitación a la composición durante la congelación. Esto requiere un equipo de procesamiento complejo y costoso, tal como un intercambiador de calor de superficie raspada, lo que limita su uso; por ejemplo, generalmente, tal equipo no se encuentra disponible en las cocinas de los consumidores.

Un enfoque alternativo consiste en separar las etapas de aireación y de congelación, i.e., formar una mezcla aireada (i.e., una espuma) y luego congelar esta espuma en una etapa posterior del procedimiento. La etapa de congelación puede ser, por tanto, quiescente, sin cizalla ni agitación, pues la aireación ya se ha realizado. El documento US 6 187 365 describe un procedimiento para la producción de una barra congelada aireada moldeada mediante la preparación de una mezcla de ingredientes adecuada para una barra aireada congelada, el batido de la mezcla hasta obtener una mezcla aireada que tiene un esponjamiento de entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 250%, el moldeado de la mezcla aireada hasta proporcionar una mezcla aireada moldeada y la congelación de la mezcla aireada moldeada para producir la barra aireada congelada moldeada.

Este enfoque presenta dos problemas. En primer lugar, las espumas descongeladas son inestables durante períodos de tiempo prolongados. La desproporción y la coalescencia conducen a un crecimiento de las burbujas, y la sedimentación inversa (debido a la flotación de las burbujas de aire) conduce a la separación de la fase vertical dando como resultado una gran proporción de burbujas cerca de la superficie superior y una disminución de las burbujas en el fondo. Esto significa normalmente que la etapa de congelación debe seguir a la etapa de aireación casi inmediatamente para minimizar el efecto de esta inestabilidad sobre el producto final. En segundo lugar, puede producirse una pérdida significativa del gas durante la congelación quiescente, pues los cristales de hielo en crecimiento empujan físicamente a las burbujas de gas fuera de la mezcla. Este efecto es más pronunciado para las burbujas de gas de gran tamaño, porque los cristales de hielo son menos capaces de crecer alrededor de las mismas. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento barato y simple de producción de composiciones aireadas congeladas.

40 Resumen de la invención

En nuestra solicitud en tramitación WO 06/010425, hemos descubierto que una proteína micótica denominada hidrofobina permite la producción de espuma con una estabilidad excelente frente a la desproporción y a la coalescencia. La hidrofobina es activa superficialmente y actúa como un agente aireante, mientras que además parece conferir una naturaleza muy viscoelástica a la superficie de las burbujas de aire.

Ahora hemos descubierto que, cuando se usa hidrofobina, es posible conservar el gas durante un procedimiento que comprende una etapa de aireación seguida por una etapa de congelación quiescente. La hidrofobina estabiliza las burbujas de gas tanto durante el almacenamiento entre las etapas de aireación y congelación, como durante la congelación. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una composición aireada congelada, procedimiento que comprende airear una mezcla acuosa, siguiendo con la congelación quiescente de la mezcla aireada, caracterizado porque la mezcla comprende hidrofobina.

Preferiblemente, la hidrofobina está presente en una cantidad del al menos 0,001% en peso, más preferiblemente, del al menos 0,01% en peso.

Preferiblemente, la hidrofobina está en una forma sustancialmente aislada.

Preferiblemente, la hidrofobina es una hidrofobina de clase II.

Preferiblemente, la composición aireada congelada tiene un esponjamiento del al menos 25%.

Preferiblemente, la composición aireada congelada es un producto alimenticio. Más preferiblemente, el producto alimenticio es un producto de confitería congelado. Más preferiblemente, el producto de confitería congelado es un helado.

Preferiblemente, la etapa de airear se selecciona del grupo constituido por el batido continuo, el batido por lotes, la inyección de gas, la insuflación de gas, la generación de gas mediante una reacción química o bioquímica y la liberación del gas atrapado de una solución o un sólido.

Preferiblemente, la etapa de congelación se selecciona del grupo constituido por colocar un recipiente que contiene la mezcla acuosa en un ambiente frío; sumergir un molde que contiene la mezcla en un baño de refrigerante frío; colocar partes de la mezcla directamente en un baño de fluido criogénico; congelar en forma de película; y pulverizar pequeñas gotas de la mezcla en un ambiente frío.

Preferiblemente, la mezcla comprende además un agente de límite elástico. Preferiblemente, el agente de límite elástico es un polisacárido, más preferiblemente, un polisacárido bacteriano, tal como xantano y/o gellan.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una composición aireada congelada, procedimiento que comprende proporcionar una mezcla acuosa que comprende hidrofobina, airear la mezcla, siguiendo con la congelación quiescente de la mezcla aireada.

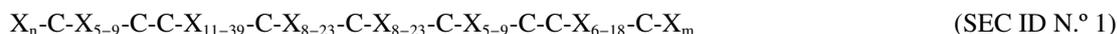
En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona el uso de una hidrofobina para estabilizar una composición aireada durante una congelación quiescente.

Descripción detallada de la invención

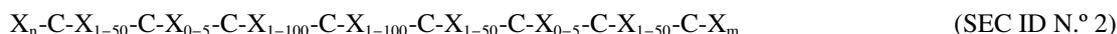
A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que cualquier experto habitual en la técnica comúnmente entiende (p. ej., en la fabricación, la química y la biotecnología de productos de confitería enfriados/de confitería congelados). En "Ice Cream", IV Edición, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York, NY, se encuentran definiciones y descripciones de diversos términos y técnicas usados en la fabricación de productos de confitería enfriados/congelados. En Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", III ed. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, "Short Protocols in Molecular Biology" (1999) IV Ed, John Wiley & Sons, Inc. (y la versión completa titulada "Current Protocols in Molecular Biology"), se pueden encontrar técnicas estándar para procedimientos moleculares y bioquímicos. Las fuentes de referencia útiles que describen polisacáridos y su comportamiento en disolución son: "Food polysaccharides and their applications", ed. A.M. Stephen, Marcel Dekker Inc., 2005; "Food Gels", ed. P. Harris, Elsevier, 1990.

Hidrofobinas

Las hidrofobinas son una clase bien definida de proteínas (Wessels, 1997, *Adv. Microb. Physio.* 38: 1-45; Wosten, 2001, *Annu Rev. Microbiol.* 55: 625-646) capaces de auto-ensamblarse a una interfase hidrófoba/hidrófila, y que tienen una secuencia conservada:



en la que X representa cualquier aminoácido, y n y m representan independientemente un número entero. Comúnmente, una hidrofobina tiene una longitud de hasta 125 aminoácidos. Los residuos de cisteína (C) de la secuencia conservada son parte de los puentes disulfuro. En el contexto de la presente invención, el término hidrofobina tiene un significado más amplio para incluir las proteínas funcionalmente equivalentes que todavía presentan la característica de auto-ensamblarse a una interfase hidrófoba/hidrófila dando como resultado una película de proteínas, tales como proteínas que comprenden la secuencia:



o partes de la misma que todavía presentan la característica de auto-ensamblarse a una interfase hidrófoba/hidrófila dando como resultado una película de proteínas. Según la definición de la presente invención, se puede detectar el auto-ensamblaje adsorbiendo la proteína hacia teflón y usando un difracción circular para establecer la presencia de una estructura secundaria (en general, una hélice α) De Vocht *et al.*, 1998, *Biophys. J.* 74: 2059-68).

Es posible establecer la formación de una película incubando una lámina de teflón en la solución de proteínas, siguiendo con al menos tres lavados con agua o tampón (Wosten *et al.*, 1994, *Embo. J.* 13: 5848-54). Se puede visualizar la película de proteínas mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como el marcaje con un marcador fluorescente o mediante el uso de anticuerpos fluorescentes, como está ampliamente extendido en la técnica. m y n tienen comúnmente valores que varían de 0 a 2.000, pero más habitualmente, m y n en total son menos de 100 ó 200. La definición de hidrofobina en el contexto de la presente invención incluye proteínas de fusión de una hidrofobina y otro polipéptido, así como conjugados de hidrofobina y otras moléculas tales como polisacáridos.

Las hidrofobinas identificadas hasta la fecha se clasifican en general bien dentro de la clase I o de la clase II. Ambos tipos han sido identificados en hongos como proteínas secretadas que se auto-ensamblan a interfases hidrófobas en películas anfipáticas. Los ensamblajes de las hidrofobinas de tipo I son relativamente insolubles, mientras que aquéllos de las hidrofobinas de clase II se disuelven fácilmente en una variedad de disolventes.

También se han identificado proteínas de tipo hidrofobina en bacterias filamentosas, tales como *Actinomycete* y *Streptomyces sp.* (WO 01/74864). Estas proteínas bacterianas, al contrario que las hidrofobinas micóticas, forman sólo

hasta un puente disulfuro, pues sólo tienen dos residuos de cisteína. Tales proteínas son un ejemplo de equivalentes funcionales de las hidrofobinas que tienen las secuencias consenso mostradas en la SEC ID N.º 1 y 2, y pertenecen al ámbito de la presente invención.

5 Las hidrofobinas se pueden obtener mediante la extracción de fuentes nativas, tales como hongos filamentosos, mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, se pueden obtener hidrofobinas mediante el cultivo de hongos filamentosos que segregan la hidrofobina en el medio de cultivo o mediante la extracción de micelios de hongos con etanol al 60%. Se prefiere particularmente aislar las hidrofobinas de los organismos huésped que segregan de manera natural las hidrofobinas. Los huéspedes preferidos son hifomicetos (p. ej., *trichoderma*), basidiomicetos y ascomicetos. Los huéspedes particularmente preferidos son organismos de calidad alimenticia, tales como *Cryphonectria parasitica*, que segregan una hidrofobina denominada criparina (MacCabe y Van Alfen, 1999, *App. Environ. Microbiol* 65: 5431-5435).

15 Alternativamente, se pueden obtener las hidrofobinas mediante el uso de tecnología recombinante. Por ejemplo, se pueden modificar células huésped, comúnmente, microorganismos para expresar hidrofobinas, y luego se pueden aislar las hidrofobinas y usarlas según la presente invención. Las técnicas para introducir constructos de ácido nucleico codificantes de hidrofobinas en las células huésped son conocidas en la técnica. Se han clonado más de 34 genes codificantes de hidrofobinas de más de 16 especies de hongos (véase, por ejemplo, el documento WO96/4188, que proporciona la secuencia de hidrofobinas identificadas en *Agaricus bisporus*; y Wosten, 2001, *Annu Rev. Microbiol.* 55: 625-646). También se puede usar la tecnología recombinante para modificar las secuencias de las hidrofobinas o sintetizar nuevas hidrofobinas que tengan las propiedades deseadas/mejoradas.

25 Comúnmente, se transforma una célula huésped o un organismo apropiado mediante un constructo de ácido nucleico que codifique la hidrofobina deseada. La secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido se puede insertar en un vector de expresión adecuado codificante de los elementos necesarios para la transcripción y la traducción, y de tal manera que sean expresados en condiciones apropiadas (p. ej., en el sentido apropiado y el marco de lectura correcto, y con las secuencias dirigidas y de expresión apropiadas). Los procedimientos necesarios para construir estos vectores de expresión son conocidos por los expertos en la técnica.

30 Se puede usar un número de sistemas de expresión para expresar la secuencia codificante del polipéptido. Éstos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos (incluyendo levadura), sistemas celulares de insectos, sistemas de cultivo de células vegetales y plantas, todos transformados con los vectores de expresión apropiados. Los huéspedes preferidos son aquéllos que se consideran de calidad alimenticia - “generalmente considerados como seguros” (GRAS).

35 Las especies de hongos adecuadas incluyen levaduras tales como (pero sin limitarse a) aquéllas del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizo Saccharomyces* y similares, y especies filamentosas tales como (pero sin limitarse a) aquéllas del género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Neurospora*, *Fusarium* y similares.

40 Las secuencias codificantes de las hidrofobinas son preferiblemente del al menos 80% idénticas a nivel de aminoácidos a una hidrofobina identificada en la naturaleza, más preferiblemente, al menos el 95% o el 100% idénticas. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden realizar sustituciones conservadoras u otros cambios de aminoácidos que no reduzcan la actividad biológica de la hidrofobina. A efectos de la invención, estas hidrofobinas que poseen este elevado nivel de identidad con una hidrofobina que tiene lugar de manera natural también quedan englobadas en el término de “hidrofobinas”.

45 Las hidrofobinas se pueden purificar desde medios de cultivo o desde extractos celulares mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento WO01/57076, que implica adsorber la hidrofobina presente en una solución que contiene hidrofobina hacia la superficie y luego poner en contacto la superficie con un tensioactivo, tal como Tween 20, para eluir la hidrofobina de la superficie. Véase también Collen *et al.*, 2002, *Biochim Biophys Acta.* 1569: 139-50; Calonje *et al.*, 2002, *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-4; Askolin *et al.*, 2001, *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 124-30; y De Vries *et al.*, 1999, *Eur J Biochem.* 262: 377-85.

55 Aireación

60 El término “aireado/a” significa que se ha incorporado intencionadamente gas en la mezcla para formar una espuma, por ejemplo, mediante procedimientos mecánicos. El gas puede ser cualquier gas, pero está preferiblemente, en concreto en el contexto de los productos alimenticios, un gas de calidad alimenticia tal como aire, nitrógeno o dióxido de carbono. El grado de aireación se define comúnmente en términos de “esponjamiento”. En el contexto de la presente invención, el % de esponjamiento se define en términos del volumen del producto aireado y el volumen de la mezcla desaireada de la que fue formado:

$$65 \text{ Esponjamiento} = \frac{\text{Volumen del producto aireado final} - \text{volumen de la mezcla desaireada}}{\text{Volumen de la mezcla desaireada}} \times 100$$

ES 2 321 032 T3

La cantidad de esponjamiento presente en el producto variará en función de las características del producto deseado. Preferiblemente, el nivel de esponjamiento es del al menos 10%, más preferiblemente, del al menos 25 ó 50%. Preferiblemente, el nivel de esponjamiento es menor del 400%, más preferiblemente, es menor del 300 ó 200%.

5 Preferiblemente, la espuma es sustancialmente homogénea.

La etapa de aireación se puede realizar mediante cualquier procedimiento adecuado. Los procedimientos de aireación incluyen (pero no se limitan a):

- 10 - el batido continuo en un dispositivo de rotor-estator tal como un mezclador Oakes (ET. Oakes Corp), un mezclador Megatron (Kinematica AG) o un mezclador Mondomix (Haas-Mondomix BV);
- un batido por lotes en un dispositivo que implique la insuflación superficial de gas, tal como una batidora mezcladora Hobart o un tanque agitado;
- 15 - la inyección de gas, por ejemplo, a través de un rociador, mezclador de chorro o un dispositivo microflúidico;
- la inyección de gas seguida por el mezclado y la dispersión en un dispositivo de flujo continuo tal como un intercambiador de calor de superficie raspada, un mezclador estático o una bomba;
- 20 - la inyección de gas a presión elevada, en la que el gas es disuelto bajo presión y luego forma una fase de gas dispersa al reducir la presión. Esto podría producirse tras dispensarlo desde un recipiente de aerosol;
- 25 - la insuflación de gas, por ejemplo, por una válvula Venturi;
- la generación de gas por medio de una reacción química o bioquímica, por ejemplo, la reacción entre un ácido y un carbonato;
- 30 - la liberación del gas atrapado de una solución o de un sólido, por ejemplo, un material vítreo (según lo descrito en el documento EP1206193) o un hidrato de clatrato.

Período entre las etapas de aireación y de congelación

35 La presente invención permite la separación de las etapas de aireación y de congelación. Por lo tanto, las composiciones aireadas congeladas se pueden producir de varios modos diferentes. Por ejemplo, las etapas de aireación y de congelación pueden tener lugar las dos en una fábrica tal que la composición aireada congelada sea producida en la fábrica, y el consumidor adquiera la composición aireada congelada en su forma final. Alternativamente, sólo se realiza la etapa de aireación en una fábrica, tal que los consumidores adquieren una mezcla pre-aireada descongela-
40 da que luego ellos congelan en casa. Una tercera posibilidad es que el consumidor compre una mezcla desaireada descongela-
da que sea tanto aireada como congelada en casa.

Concretamente en el segundo de estos casos (pero también potencialmente en el resto de los casos), transcurre un período de tiempo significativo entre las etapas de aireación y de congelación. En tales casos, cuando las composiciones aireadas se almacenan antes de su congelación, o incluso cuando el procedimiento de congelación lleva mucho tiempo, es necesario que las espumas sean estables ante tanto la desproporción como la coalescencia, así como también ante la sedimentación inversa producida durante este tiempo. Las hidrofobinas aportan a la espuma una buena estabilidad con respecto a la desproporción y a la coalescencia. La sedimentación inversa (que se debe a la flotación de las burbujas de aire) puede conducir a la separación de la fase vertical dando como resultado una gran proporción de burbujas cerca de la superficie superior y la disminución de las burbujas en el fondo. La sedimentación inversa también puede conducir a la posterior pérdida de aire debido al empaquetamiento más estrecho de las burbujas de la espuma y al desmoronamiento de la espuma que se puede producir como consecuencia del mismo. La sedimentación inversa se inhibe cuando la fase continua de la espuma tiene un límite elástico aparente.

55 Por consiguiente, en una realización, la mezcla comprende además un agente o unos agentes de límite elástico que confieren propiedades reológicas adecuadas a la fase continua, inhibiendo así la sedimentación inversa de las burbujas de aire tal que la espuma permanece homogénea durante un período de tiempo prolongado. Agentes de límite elástico se definen en la presente memoria como un ingrediente o ingredientes (moléculas o partículas) que proporcionan un límite elástico aparente a la fase continua.

Los ingredientes adecuados que se pueden usar como agentes de límite elástico, particularmente en los sistemas alimenticios, incluyen agentes gelificantes, estando algunos de sus ejemplos no restrictivos resumidos a continuación:

- 65 - Biopolímeros gelificantes termorreversibles tales como el carragenano iota y kappa, y el agar.
- Biopolímeros gelificantes fijados químicamente cuya estructura de gel deriva de una interacción entre el polisacárido y un ión apropiado tal como Ca^{2+} . Los ejemplos incluyen alginato de sodio y pectina.

ES 2 321 032 T3

5 - Polisacáridos bacterianos tales como xantano o gellan que pueden configurar un comportamiento de tipo gel débil que se interrumpe mediante cizalla. Preferiblemente, tales polisacáridos se añaden hasta proporcionar una cantidad final del al menos 0,2% en peso a la mezcla aireada. Si se almacena la mezcla aireada durante mucho tiempo antes de la congelación, tal como durante un día o más, se añaden preferiblemente cantidades más elevadas del al menos 0,4% en peso.

- Polisacáridos micóticos tales como *schizophyllan*.

10 - Geles sinérgicos que están compuestos por dos o más biopolímeros que individualmente pueden no ser gelificantes, pero que al mezclarse formarán un gel o un gel de un módulo superior. Los ejemplos incluyen: alginato de sodio con pectina, xantano con goma garrofín, agar con goma garrofín y carragenano kappa con goma garrofín.

15 Hay un número de los agentes de límite elástico descritos anteriormente que se usa convencionalmente para los productos de gel tal que son fijos. Los polisacáridos gelificantes no son los únicos ingredientes que se pueden usar como agentes de límite elástico en el contexto de esta invención. Se puede usar cualquier ingrediente (molécula o partícula) que dé como resultado un límite elástico aparente de la fase continua. Otros ejemplos de agentes de límite elástico incluyen:

20 - Lipogeles. Éstos incluyen, pero no se limitan a, poliglicerolésteres de ácidos grasos saturados, y mezclas de monoglicéridos de ácidos grasos con ésteres de ácido cítrico de ácidos grasos saturados, ésteres de ácido láctico de ácidos grasos saturados, o ésteres de ácido diacetiltartárico de ácidos grasos saturados. Comúnmente, la cantidad de ingrediente de lipogel sería menor de aproximadamente 2-5% en peso en la mezcla pre- aireada. En Heertje *et al.*, "Food Science and Technology", 1998, 31, 387-396, se pueden encontrar ejemplos de cómo producir lipogeles.

25 - Proteínas gelificantes (térmica o químicamente), p. ej., proteína de suero, gelatina.

30 - Emulsiones de aceite en agua en las que las partículas de aceite dispersas interactúan entre sí tal que proporcionan la fase continua de una naturaliza gelificada.

35 - Fibras, p.ej., de origen frutícola o vegetal, celulosa modificada, etc.

Preferiblemente, las composiciones aireadas conservan al menos el 50% de su esponjamiento original, más preferiblemente, el 75%, durante un período de al menos una semana, más preferiblemente, de al menos un mes (comúnmente, medido tras su almacenamiento a temperaturas frías (aprox. 5°C)).

40 *Etapas de congelación quiescente*

La congelación quiescente (o estática) se refiere a cualquier procedimiento en el que se enfría un líquido acuoso (p. ej., una solución o una suspensión) por debajo de su punto de congelación, tal que se produce la solidificación parcial o total por medio de la formación de cristales de hielo, en ausencia de la imposición de un campo de cizalla. Por lo tanto, el líquido se congela sin ser agitado, mezclado ni movido deliberadamente durante la congelación. La etapa de congelación quiescente se puede realizar mediante un número de procedimientos que incluyen (pero no se limitan a):

50 - colocar un recipiente que contiene el líquido por ser congelado en un ambiente frío en el que la temperatura esté por debajo del punto de congelación del líquido (tal como un congelador doméstico, una cámara fría comercial o un túnel de congelación o un congelador de un establecimiento minorista) hasta que tiene lugar el grado deseado de solidificación.

55 - Llenar un molde con el líquido por ser congelado y sumergir el molde en un baño de un medio líquido frío (tal como salmuera, glicol o nitrógeno líquido) hasta que tiene lugar el grado deseado de solidificación.

- Colocar o dejar caer una parte del líquido por ser congelado directamente en el baño de fluido criogénico (tal como nitrógeno líquido) durante un tiempo suficiente para que solidifique antes de retirarlo.

60 - Congelar en forma de película, i.e., extender el líquido en una capa sobre una superficie fría, permitiendo que la capa se congele en ausencia de cizalla y luego raspar la capa congelada de la superficie fría. Los ejemplos de congeladores de películas incluyen congeladores de tambor y placas termodisipadoras giratorias.

65 - Pulverizar pequeñas gotas de líquido en un medio frío dentro de una cámara cerrada, tal que se produzca el grado necesario de solidificación en el momento en el que las pequeñas gotas caigan a la base de la cámara por gravedad. En este caso, aunque las gotas se estén moviendo, no se aplica un campo de cizalla sobre el líquido de la gota.

Composiciones

La cantidad de hidrofobina presente en la composición variará generalmente en función de la formulación y del volumen de la fase de aire. Comúnmente, la composición contendrá al menos un 0,001% en peso de hidrofobina, más preferiblemente, al menos un 0,005 ó 0,01% en peso. Comúnmente, la composición contendrá menos del 1% en peso de hidrofobina. La hidrofobina puede proceder de una sola fuente o de una pluralidad de fuentes, p. ej., la hidrofobina puede ser de una mezcla de dos o más polipéptidos de hidrofobina diferentes.

La hidrofobina se añade en una forma y en una cantidad tal que esté disponible para estabilizar la fase de aire. El término “añadida” pretende significar que la hidrofobina es introducida deliberadamente en la composición a efectos de aprovechar sus propiedades de estabilización de la espuma. Por consiguiente, cuando hay presentes o se añaden ingredientes que contienen contaminantes micóticos, que pueden contener polipéptidos de hidrofobina, esto no constituye añadir hidrofobina en el contexto de la presente invención. Comúnmente, la hidrofobina se añade a la composición en una forma tal que sea capaz de auto-ensamblarse a la superficie de aire-líquido.

Comúnmente, la hidrofobina se añade en una forma aislada, comúnmente, al menos parcialmente purificada, tal como al menos 10% pura, en base al peso de los sólidos. “Añadida en forma aislada” pretende significar que la hidrofobina no se añade como parte de un organismo natural, tal como un hongo, que exprese de forma natural hidrofobinas. En lugar de eso, la hidrofobina habrá sido, por lo común, bien extraída de una fuente natural u obtenida mediante la expresión recombinante en un organismo huésped.

En una realización, la hidrofobina se añade a la composición en forma monomérica, dimérica y/o oligomérica (i.e., constituida por 10 unidades monoméricas o menos). Preferiblemente, al menos el 50% en peso de la hidrofobina añadida está en al menos una de estas formas, más preferiblemente, al menos el 75, 80, 85 ó 90% en peso. Una vez añadida, la hidrofobina se ensamblará comúnmente a la interfase de aire/líquido y, por tanto, cabría esperar que la cantidad de monómero, dímero y oligómero disminuyera.

Los productos alimenticios aireados congelados pueden contener opcionalmente otros ingredientes tales como uno o más de los siguientes: otras proteínas tales como proteínas lácteas, bien como ingredientes puros o como ingredientes líquidos, p. ej., leche o nata; aceite o grasa, notablemente en forma de una fase emulsionada; azúcares; sales; colorantes y aromatizantes; emulsionantes químicos, tales como monoglicéridos; purés / extractos / zumo de frutas o verduras; estabilizadores o espesantes, tales como polisacáridos; conservantes; inclusiones tales como frutos secos, fruta, toffees.

Ahora se describirá la presente invención más detalladamente en referencia a los siguientes ejemplos, que son únicamente ilustrativos y no restrictivos.

Ejemplos

Se llevaron a cabo experimentos para comparar la retención de gas en las composiciones aireadas durante una congelación quiescente.

Ejemplo 1

Preparación de las mezclas

Se preparó una mezcla adecuada para producir una composición aireada congelada que contenía hidrofobina HFBII (ejemplo 1). También se preparó un ejemplo comparativo en el que se usó leche desnatada en polvo en lugar de hidrofobina. El ejemplo comparativo es representativo de una mezcla de la que se espera que muestre una buena estabilidad de la espuma debido a un alto nivel de proteína láctea. En la tabla 1, se ofrecen las composiciones de las mezclas. En la tabla 2, se ofrecen las fuentes de los ingredientes.

TABLA 1

Composición de las mezclas

Ingrediente	Concentración (% en peso)	
	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo
Sacarosa	10	10
Goma xantana	0,5	0,5
Leche desnatada en polvo	0	11
HFBII	0,1	0
Agua	89,4	78,5

ES 2 321 032 T3

TABLA 2

Fuentes de los ingredientes

Ingrediente	Información detallada	Proveedor
Sacarosa		Tate & Lyle, RU
Leche desnatada en polvo	Proteína al 33–36%; grasa al 0,8%; humedad al 3,7%	United Milk, RU
Goma xantana (Keltrol RD)	Dispersable frío	CP Kelco
HFBII	Purificada de <i>T. reesei</i>	VTT Biotechnology, Finlandia

La hidrofobina HFBII ha sido purificada de *Trichoderma reesei* esencialmente según lo descrito en el documento WO00/58342 y Linder *et al.*, 2001, “Biomacromoleculas” 2: 511-517. El xantano se incluyó para evitar la sedimentación inversa de la espuma durante su almacenamiento.

Las mezclas se prepararon en lotes de 100 g. Se mezclaron en seco la sacarosa, la goma xantana y la leche desnatada en polvo (en caso de usarla), y se añadieron lentamente en agua agitada a temperatura ambiente. Se calentaron las mezclas hasta 55°C y se agitaron durante alrededor de 30 minutos para garantizar la hidratación completa del xantano y de las proteínas lácteas (en caso de usarlas). Entonces se enfriaron las mezclas hasta la temperatura ambiente. Se añadió HFBII (en caso de usarla) a la mezcla como una alícuota de 5 mg/ml de solución para proporcionar la concentración final requerida. Entonces se agitaron las soluciones suavemente durante otro período.

Etapa de aireación

Se sometieron a un tratamiento suave de ultrasonidos 100 ml de cada mezcla en un baño sónico durante 30 segundos para dispersar completamente la HFBII (en caso de usarla), y se colocaron en un aparato con recipiente agitado que fue enfriado hasta 5°C.

El aparato constaba de un recipiente cilíndrico revestido de acero inoxidable montado verticalmente con dimensiones internas 105 mm de altura y 72 mm de diámetro, que contenía un agitador. El agitador constaba de un rodete rectangular (72 mm x 41,5 mm) que raspa la superficie interior del recipiente al girar y dos paletas semicirculares (diámetro de 60 mm) colocadas en un ángulo de 45° con respecto al rodete. Se aireó la mezcla girando el agitador a 1.200 rpm hasta alcanzar un esponjamiento del 100% (60 segundos para el ejemplo 1 y 120 segundos para el ejemplo comparativo).

Se midió el esponjamiento de las mezclas aireadas inmediatamente después de la preparación usando una técnica resumida a continuación. Entonces se almacenaron las mezclas aireadas en vasos de precipitados dentro de un refrigerador a 5°C durante siete días y se volvieron a medir los esponjamientos.

Etapa de congelación quiescente

Tras el almacenamiento de 7 días, se llenaron moldes rectangulares de caucho con muestras de cada mezcla aireada y se colocaron en un congelador a -25°C durante 24 horas. Entonces se colocaron las muestras en un congelador a -80°C durante 30 minutos para aumentar su dureza antes de medir sus esponjamientos. Se midieron tres muestras por cada mezcla. Se almacenó la cuarta muestra a -80°C antes de ser examinada mediante una microscopía de exploración electrónica (SEM) para estudiar la microestructura.

Medición del esponjamiento

Muestras aireadas: Se determinó el esponjamiento según lo siguiente para las muestras descongeladas aireadas. Primero se llenó un recipiente de plástico de un volumen conocido (30,7 ml) lentamente con la mezcla desaireada y se pesó en una balanza de laboratorio ($M_{\text{desaireada}}$). Luego se repitió el procedimiento con una muestra del mismo volumen de la mezcla aireada (M_{aireada}). El esponjamiento se determinó mediante la ecuación:

$$\text{Esponjamiento} = \frac{M_{\text{desaireada}} - M_{\text{aireada}}}{M_{\text{aireada}}} \times 100\%$$

ES 2 321 032 T3

(Esto equivale a la definición anterior de esponjamiento, cuando se usan muestras de un volumen fijo en lugar de muestras de una masa fija).

5 *Muestras aireadas congeladas:* Se determinó el esponjamiento según lo siguiente para la muestras aireadas congeladas. Se pesó la muestra aireada en los moldes para proporcionar muestras de una masa conocida (aprox. 5 g). Entonces se congelaron las muestras según lo descrito anteriormente. Tras la congelación, se retiraron las muestras de los moldes y se colocó cada una inmediatamente en un recipiente de plástico previamente enfriado. Se tapó el recipiente con una tapa de rosca que contenía dos orificios pequeños. El volumen del espacio interior de este recipiente había sido determinado previamente en 61,95 ml. Se llenó lentamente el recipiente con solución de sacarosa al 60%
10 en peso a -10°C por uno de los orificios pequeños usando una jeringa graduada. El segundo orificio de la tapa permitió la fuga del aire desplazado. El volumen de la solución de sacarosa inyectada necesario para llenar completamente el recipiente fue determinado a partir de las graduaciones de la jeringa. El volumen de la muestra de espuma congelada (V_{aireado}) fue proporcionado por la diferencia entre el volumen conocido del recipiente y el volumen medido de la solución inyectada. El análisis se completó en un minuto para evitar que la espuma congelada se licuara. Se repitió el procedimiento con muestras de mezcla desaireada congelada que tenían la misma masa ($V_{\text{desaireado}}$). El esponjamiento se determinó a partir de la ecuación (i.e., para muestras de masa fija):

$$20 \quad \text{Esponjamiento} = \frac{V_{\text{aireado}} - V_{\text{desaireado}}}{V_{\text{desaireado}}} \times 100\%$$

Microscopía de exploración electrónica

25 Se visualizó la microestructura de cada muestra mediante una microscopía de exploración electrónica (SEM) a baja temperatura. Para preparar las muestras para la microscopía, se enfrió la muestra hasta -80°C sobre hielo seco y se cortó una parte. Se colocó esta parte, de aproximadamente 5 mm x 5 mm x 10 mm de tamaño en un portamuestras usando un compuesto OCT™ de Tissue Tek: (PVA al 11%; Carbowax al 5% y componentes no reactivos al 85%). Se sumergió la muestra incluyendo el portamuestras en hielo viscoso de nitrógeno líquido y se transfirió a una cámara de preparación a baja temperatura (Oxford Instrument CT1500HF) sometida al vacío, a aproximadamente 0,01 kPa.
30 Se calentó la muestra hasta -90°C durante aproximadamente 60 a 90 segundos tal que el hielo se sublimó lentamente para revelar información detallada sobre la superficie. Entonces se enfrió hasta -110°C para finalizar la sublimación. A continuación se revistió la muestra con oro usando plasma de argón. Este procedimiento también tuvo lugar al vacío con una presión aplicada de 0,01 kPa y una corriente de 6 miliamperios durante 45 segundos. Entonces se transfirió la muestra a un microscopio de barrido electrónico convencional (JSM 5600) equipado de una fase fría a una temperatura de -160°C. Se formaron imágenes de la muestra y se capturaron las superficies de interés mediante un programa informático de adquisición de imágenes digitales.

Resultados

40 En la tabla 3, se muestran los esponjamientos tras la aireación, tras el almacenamiento y tras la congelación. En el ejemplo comparativo que contiene un nivel elevado de leche desnatada en polvo, hay una reducción significativa del esponjamiento tanto durante el almacenamiento y como tras la congelación. Sin embargo, el ejemplo 1 que contenía hidrofobina no mostró pérdida de esponjamiento durante su almacenamiento, mostrando una reducción mucho menor durante la congelación. (De hecho, al menos parte de esta disminución puede estar representada por el cambio de volumen del gas debido a la reducción de la temperatura, no siendo originada por la pérdida de gas de la muestra). Los resultados muestran que el uso de hidrofobina en lugar de proteínas lácteas mejora enormemente la retención de aire tanto durante el almacenamiento como durante la congelación de una solución espumosa.

50 TABLA 3

Esponjamientos (%)

	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo
Inmediatamente después de la aireación	119	130
Tras el almacenamiento de 7 días a 5°C	119	109
Tras la congelación durante 24 horas a -25°C	102	67,2

65 Las imágenes SEM de las muestras congeladas mostraron que el ejemplo 1 tenía una distribución uniforme de las burbujas de aire. El ejemplo comparativo sin hidrofobina pareció tener burbujas de gas distribuidas más desigualmente, y de acuerdo con las medidas de esponjamiento, parecía que había menos aire presente. Además, los cristales de hielo del ejemplo comparativo parecían más alargados y algo mayores que aquéllos del ejemplo 1.

ES 2 321 032 T3

Ejemplos 2 y 3

Se prepararon dos mezclas más según la misma formulación y usando el mismo procedimiento que en el ejemplo 1. Entonces se airearon las mezclas usando una batidora manual eléctrica Breville con la “cuchilla de batir” durante aproximadamente 1 minuto. Se midió el esponjamiento de las mezclas aireadas. Entonces se almacenaron las mezclas aireadas a 5°C durante 4 días y se volvió a medir el esponjamiento. Después se congelaron de forma quiescente las mezclas aireadas para generar el producto aireado congelado final mediante dos procedimientos diferentes, como se explica a continuación:

Ejemplo 2: Se colocó la mezcla aireada en un molde y luego se congeló en un baño de salmuera a -25°C durante 15 minutos. Se insertaron palos en el producto tras aproximadamente 30 segundos a 1 minuto de tiempo de congelación. Se sacaron los productos aireados congelados de los moldes sumergiendo brevemente los moldes en un baño de agua caliente. Entonces se envolvieron los productos con papel encerado.

Ejemplo 3: Se colocó la mezcla aireada en un recipiente y luego se congeló en un congelador doméstico a -18°C durante aproximadamente 6 horas.

En cada caso, se enfriaron más los productos aireados congelados durante 2 horas en un túnel de congelación a -35°C, tras lo que se midió su esponjamiento.

En la tabla 4, se muestran los esponjamientos tras el almacenamiento y tras la congelación. Sólo se perdieron pequeñas cantidades de esponjamiento durante la congelación quiescente, i.e., del 5 y 7% ($\pm 1\%$) para los ejemplos 2 y 3 respectivamente. Los datos vuelven a mostrar que la hidrofobina es eficaz en la estabilización de la espuma durante su congelación.

TABLA 4
Esponjamientos (%)

	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Tras el almacenamiento de 7 días a 5°C	104	107
Tras la congelación durante 24 horas a -25°C	99	100

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para producir una composición aireada congelada, procedimiento que comprende airear una mezcla acuosa, siguiendo con la congelación quiescente de la mezcla aireada, que se **caracteriza** porque la muestra comprende hidrofobina.

10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla comprende al menos el 0,001% en peso de hidrofobina.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la hidrofobina está en forma aislada.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1 a 3, en el que la hidrofobina es una hidrofobina de clase II.

15 5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición aireada congelada tiene un esponjamiento del al menos 25%.

20 6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición es un producto alimenticio.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que el producto alimenticio es un producto de confitería congelado.

25 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que el producto de confitería congelado es un helado.

9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de aireación se selecciona del grupo constituido por un batido continuo, un batido por lotes, una inyección de gas, una insuflación de gas, una generación de gas mediante una reacción química o bioquímica y una liberación del gas atrapado de una solución o un sólido.

30 10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de congelación se selecciona del grupo constituido por colocar un recipiente que contiene la mezcla acuosa en un medio frío; sumergir un molde que contiene la mezcla en un baño de refrigerante frío; colocar partes de la mezcla directamente en un baño de fluido criogénico; congelar en forma de película; y pulverizar pequeñas gotas de la mezcla en un medio frío.

35 11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla comprende además un agente de límite elástico.

40 12. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que el agente de límite elástico es xantano y/o gellan.

45 13. Uso de una hidrofobina para estabilizar una composición aireada durante una congelación quiescente.

50

55

60

65

70