



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 500**

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: **06792077 .7**

96 Fecha de presentación : **13.09.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1926398**

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

54 Título: **Productos aireados con formación de crema reducida.**

30 Prioridad: **23.09.2005 EP 05255944**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73 Titular/es: **UNILEVER plc.**
Unilever House 100 Victoria Embankment
London EC4Y 0DY, GB
UNILEVER N.V.

72 Inventor/es: **Aldred, Deborah, Lynne;**
Cox, Andrew, Richard y
Stoyanov, Simeon, Dobrev

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 500 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

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones, tales como productos alimentarios, que incluyen hidrofobinas, y que presentan una reducción de la formación de crema.

5 Antecedentes de la invención

10 Existe una amplia variedad de alimentos que contienen un gas introducido, como aire, nitrógeno, dióxido de carbono u óxido nitroso. Normalmente, las espumas de alimentos son inestables por encima de períodos de tiempo que superan unos cuantos días (es decir, las burbujas crecen y la espuma se descompone) a menos que el producto esté congelado (helados, por ejemplo) o que la fase continua del producto esté gelificada (por ejemplo, una *mousse*).

15 En la actualidad, es difícil preparar un producto aireado donde la espuma sea estable durante un tiempo de almacenamiento de varias semanas que, con cierta agitación en caso necesario, será fluido. Hay dos aspectos que deben tenerse en cuenta: (a) la estabilidad de las burbujas durante varias semanas, y (b) la prevención de la aparición de burbujas de aire en la superficie debido a la diferencia de flotabilidad entre las dos fases (la llamada formación de crema). La formación de crema puede dar lugar a una mala apariencia de un producto y a la pérdida de rendimiento. Por ejemplo, si una espuma forma una crema entonces las burbujas pueden llegar a ser menos estables y se puede perder el aire. Por otra parte, un producto de "fases separadas" puede parecer mucho menos deseable para el consumidor.

20 Lo ideal sería que ese producto aireado contuviera una espuma donde las burbujas se mantienen estables para crecer y formar una crema, pero con la aplicación de una cantidad relativamente pequeña de agitación (por ejemplo, batido, agitación, o succión), el producto será fluido.

25 Hay una serie de mecanismos que degradan la calidad de un producto aireado: la desproporción y la coalescencia dan lugar al crecimiento de la burbuja, cambiando las propiedades del producto, tales como su textura y apariencia física. La formación de crema (debido a la flotabilidad de las burbujas de aire) da lugar a la separación vertical de las fases en el recipiente que resulta en una gran acumulación de burbujas cerca de la superficie superior y la desaparición de las burbujas en la parte inferior. Hay productos alimentarios aireados en los que la formación de crema es deseable, por ejemplo, la espuma de la superficie de la cerveza. Sin embargo, para los productos que requieren un tiempo de vida de la espuma por encima de unos minutos u horas (por ejemplo, los que requieren un tiempo de almacenamiento), la formación de crema da lugar a un aspecto no deseado. También puede dar lugar a la pérdida de aire posterior, debido a la aglomeración más próxima de las burbujas en la espuma y la descomposición de la espuma que pudieran ocasionarse a causa de ello.

30 Para diseñar un producto en el que se previene la formación de crema y las burbujas en la espuma se mantienen estables durante un periodo de almacenamiento prolongado (de 1 semana a, al menos, 3 o más semanas en frío), hay dos requisitos previos: La fase continua requiere un límite de fluencia aparente o debe ser visco-elástica para evitar la aparición de burbujas debido a la flotabilidad. Las burbujas en la espuma deben ser estables a la desproporción y la coalescencia durante toda la vida útil del producto.

Resumen de la invención

40 En nuestra solicitud WO 06/010425 en tramitación, los inventores han encontrado que una proteína fúngica denominada hidrofobina permite la producción de espuma con una excelente estabilidad a la desproporción y a la coalescencia. La hidrofobina es un agente de aireación que los inventores han encontrado que proporciona una excelente estabilidad a la espuma debido a su naturaleza de superficie activa. La hidrofobina también parece conferir un carácter altamente viscoelástico a la superficie de las burbujas de aire. Esto da lugar a una buena estabilidad a la desproporción y la coalescencia.

45 Ahora los inventores han encontrado que el uso de hidrofobina en combinación con estabilizantes que proporcionan un límite de fluencia aparente a la fase continua da lugar a productos aireados que también presentan una buena estabilidad a la formación de crema por encima de las 3 semanas, cuando se conservan a temperaturas de refrigeración. Por el contrario, una combinación de estabilizantes con otros agentes de superficie activa, tales como el caseinato de sodio, en lugar de hidrofobina no dio lugar a una espuma estable.

50 Para reducir la velocidad de formación de crema en una espuma producida utilizando hidrofobina como agente tensioactivo de aireación, una fase continua tiene que estar diseñada con una viscosidad o un límite de fluencia. Lo anterior sólo reducirá la velocidad de formación de crema (por la ley de Stoke), incluso si la viscosidad se hace muy alta. El uso de una fase continua con un límite de fluencia, sin embargo, puede llevar a una situación en la que se previene la formación de crema, pero con una cantidad relativamente pequeña de

agitación, el producto fluidificará por cizallamiento y será fluido.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición aireada capaz de fluir que comprende hidrofobina y un agente de límite de fluencia, la composición que tiene una viscosidad de la fase continua, medida a una velocidad de cizallamiento de 10 s^{-1} , de 0,01 a 2000 Pa·s, y un límite de fluencia aparente de la fase continua de al menos 4 Pa.

En una forma de realización, la hidrofobina se encuentra en una forma sustancialmente aislada.

Preferiblemente, la hidrofobina está presente en una cantidad de al menos el 0,001% en peso, preferiblemente al menos el 0,01% en peso e inferior al 1% en peso.

Preferiblemente, la hidrofobina es una hidrofobina de clase II.

En una forma de realización preferida, el agente de límite de fluencia es un polisacárido, preferiblemente un polisacárido bacteriano, como xantano y/o gelano.

En una forma de realización, la composición aireada comprende un espesante.

En una forma de realización preferida, la composición aireada es vertible.

Preferiblemente, la composición aireada es un producto alimentario aireado, tal como productos alimentarios refrigerados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una hidrofobina y un agente de límite de fluencia para inhibir la formación de crema en una composición aireada fluida.

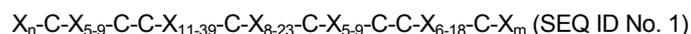
En un aspecto relacionado la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la formación de crema en una composición aireada, el procedimiento que comprende la adición de hidrofobina y un agente de límite de fluencia a la composición antes y/o durante la aireación de la composición.

Descripción detallada de la invención

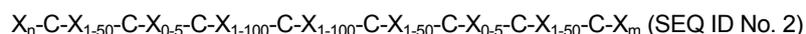
A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la materia (por ejemplo, en la producción de confitería refrigerada/confitería congelada, química y biotecnología). Las definiciones y descripciones de diversos términos y las técnicas utilizadas en la producción de confitería refrigerada o congelada se encuentran en Ice Cream, 4th Edition, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York, NY. Las técnicas estándar utilizadas para los procedimientos moleculares y bioquímicos se pueden encontrar en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. - y la versión completa titulada Current Protocols in Molecular Biology).

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 en una interfaz hidrófoba/hidrófila, y que tienen una secuencia conservada:



en la que X representa cualquier aminoácido, y n y m representan independientemente un número entero. Normalmente, una hidrofobina tiene una longitud de hasta 125 aminoácidos. Los residuos de cisteína (C) en la secuencia conservada forman parte de los puentes disulfuro. En el contexto de la presente invención, el término hidrofobina tiene un significado más amplio que incluye proteínas funcionalmente equivalentes que siguen presentando la característica de auto-ensamblaje en una interfaz hidrófoba-hidrófila que resulta en una película de proteína, como las proteínas que comprenden la secuencia:



o sus partes, que siguen presentando la característica de auto-ensamblaje en una interfaz hidrófoba-hidrófila que resulta en una película de proteína. De acuerdo con la definición de la presente invención, el auto-ensamblaje se puede detectar mediante la adsorción de la proteína a teflón y el uso de dicroísmo circular para establecer la presencia de una estructura secundaria (en general, α -hélice) (De Vocht y col., 1998, Biophys J. 74: 2059-68).

La formación de una película se puede establecer incubando una lámina de teflón en la disolución de

proteína seguido de, al menos, tres lavados con agua o tampón (Wosten y col., 1994, EMBO. J. 13: 5848-54). La película de proteína puede ser visualizada mediante cualquier procedimiento adecuado, como el marcaje con un marcador fluorescente o mediante el uso de anticuerpos fluorescentes, como está bien establecido en la técnica. Normalmente m y n tienen valores que van de 0 a 2000, pero más habitualmente m y n en total son inferiores a 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 generalmente se clasifican como de clase I o de clase II. Ambos tipos han sido identificados en hongos como proteínas secretadas que se auto-ensamblan en interfaces hidrófobas-hidrófilas en películas anfipáticas. Los ensamblajes de hidrofobinas de clase I son relativamente insolubles, mientras que las hidrofobinas de clase II se disuelven fácilmente en una variedad de disolventes.

También han sido identificadas proteínas de tipo hidrofobina en bacterias filamentosas, tales como actinomicetos y *Streptomyces sp.* (documento WO 01/74864). Estas proteínas bacterianas, a diferencia de las hidrofobinas fúngicas, forman únicamente hasta un puente disulfuro, ya que sólo tienen dos residuos de cisteína. Estas proteínas son un ejemplo de equivalentes funcionales de las hidrofobinas que tienen las secuencias consenso que se muestran en las SEQ ID N° 1 y 2, y están dentro del ámbito de aplicación de la presente invención.

Las hidrofobinas se pueden obtener por extracción de las fuentes nativas, como los hongos filamentosos, por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, las hidrofobinas se pueden obtener mediante el cultivo de hongos filamentosos que secretan la hidrofobina en el medio de cultivo o por extracción de los micelios de los hongos con el 60% de etanol. Particularmente, se prefiere aislar las hidrofobinas de los organismos hospedadores que secretan hidrofobinas naturalmente. Los hospedadores preferidos son hifomicetos (por ejemplo, *Trichoderma*), basidiomicetos y ascomicetos. Hospedadores particularmente preferidos son los organismos de calidad alimentaria, tales como la *Cryphonectria parasitica* que segrega una hidrofobina denominada criparina (MacCabe y Van Alfen, 1999, App. Environ. Microbiol 65: 5431-5435).

Por otra parte, las hidrofobinas se pueden obtener mediante el uso de tecnología recombinante. Por ejemplo, las células hospedadoras, por lo general microorganismos, se pueden modificar para expresar las hidrofobinas, y las hidrofobinas se pueden aislar y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. Las técnicas para la introducción de construcciones de ácidos nucleicos que codifican hidrofobinas en las células hospedadoras son muy conocidas en la técnica. Se han clonado más de 34 genes que codifican para hidrofobinas, procedentes de 16 especies de hongos (véase por ejemplo, el documento WO96/41882 que da la secuencia de hidrofobinas identificadas en *Agaricus bisporus*, y Wosten, 2001, Annu Rev. Microbiol. 55: 625-646). También se puede utilizar tecnología recombinante para modificar las secuencias de la hidrofobina o para sintetizar nuevas hidrofobinas que tengan propiedades deseadas/mejoradas.

Normalmente, una célula u organismo hospedador apropiado se transforma con una construcción de ácidos nucleicos que codifica la hidrofobina deseada. La secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido se puede insertar en un vector de expresión adecuado que codifica los elementos necesarios para la transcripción y la traducción, y de tal manera que se expresará en las condiciones adecuadas (por ejemplo, en la orientación adecuada y en el marco de lectura correcto y con secuencias diana y de expresión adecuadas). Los procedimientos necesarios para construir estos vectores de expresión son muy conocidos por los expertos en la materia.

Se pueden utilizar una serie de sistemas de expresión para expresar la secuencia codificante del polipéptido. Estos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos (incluyendo levaduras), sistemas celulares de insectos, sistemas de cultivos celulares de plantas y todas las plantas transformadas con los vectores de expresión apropiados. Los hospedadores preferidos son aquellos que se consideran de calidad alimentaria – “generalmente considerados como seguros” (GRAS).

Especies de hongos adecuadas incluyen levaduras tales como (pero no limitadas a) las de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizo saccharomyces* y similares, y especies filamentosas, tales como (pero no limitadas a) las de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Neurospora*, *Fusarium*, y similares.

Las secuencias que codifican las hidrofobinas son preferiblemente al menos un 80% idénticas a nivel de aminoácidos a una hidrofobina identificada en la naturaleza, más preferiblemente al menos el 95% o 100% idénticas. Sin embargo, las personas expertas en la materia pueden hacer sustituciones conservativas u otros cambios de aminoácidos que no reduzcan la actividad biológica de la hidrofobina. A los efectos de la invención estas hidrofobinas que poseen este elevado nivel de identidad a una hidrofobina de origen natural también están incluidas en el término "hidrofobinas".

Las hidrofobinas se pueden purificar a partir de los medios de cultivo o de extractos celulares mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento WO 01/57076 que consiste en adsorber la presente hidrofobina en una disolución que contiene hidrofobina a la superficie y a continuación, la puesta en contacto de la superficie con un tensioactivo, como Tween 20, para eluir la hidrofobina de la superficie. Véase también Collen y col., 2002, *Biochim Biophys Acta*. 1569: 139-50; Calonje y col., 2002, *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-4; Askolin y col., 2001, *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 124-30; y De Vries y col., 1999, *Eur J Biochem.* 262: 377-85.

Composiciones y productos aireados fluidos

Con las expresiones "composición capaz de fluir" o "producto capaz de fluir", que se utilizan indistintamente en este documento, nos referimos a una composición donde la composición fluirá después de una cantidad relativamente pequeña de agitación (por ejemplo, batido, agitación, o succión), en oposición a un sólido o a una composición estable. Las composiciones capaces de fluir incluyen composiciones verticales y composiciones semi-estables. La temperatura a la que se considera la capacidad de fluir de la composición o el producto es la temperatura a la que normalmente se sirve el producto. Por ejemplo, la capacidad de fluir de un producto refrigerado normalmente se determina a 5°C mientras que la capacidad de fluir de un producto ambiente normalmente se determina a temperatura ambiente (20°C). La capacidad de fluir de productos que contienen hielo se suele determinar a -10°C. Las mediciones generalmente se llevan a cabo a una presión de 1 atm.

El término "aireado" significa que el gas se ha incorporado voluntariamente al producto, como por medios mecánicos. El gas puede ser cualquier gas, pero es preferible, sobre todo en el contexto de productos alimentarios, un gas de calidad alimentaria, tales como aire, nitrógeno o dióxido de carbono. El grado de aireación suele definirse en términos de "saturación". En el contexto de la presente invención, el % de saturación se define en términos de volumen como:

$$\text{((volumen del producto final aireado - volumen de la mezcla)/volumen de la mezcla) x 100}$$

La cantidad de aireación presente en el producto puede variar en función de las características del producto deseado. Por ejemplo, la cantidad de aireación en confitería, tales como *mousses* puede ser tan elevado como del 200 al 250%. La cantidad de aireación en algunos productos refrigerados, productos ambientales y productos calientes puede ser inferior, pero en general por encima del 10%, por ejemplo, el nivel de saturación en batidos normalmente es del 10 al 40%.

Preferentemente, la cantidad de aireación es de al menos un 10%, más preferiblemente de al menos un 25 o un 50%. Preferentemente, el nivel de saturación es inferior al 400%, más preferiblemente inferior al 300 ó 200%.

Preferiblemente, la espuma es sustancialmente homogénea.

Preferiblemente, una composición aireada de la invención mantendrá al menos el 50% de su volumen en la fase aérea original, más preferiblemente el 75%, durante un período de al menos 3 semanas, más preferiblemente de al menos un mes (normalmente medido después del almacenamiento a temperaturas de refrigeración (alrededor de 5°C)).

Preferiblemente, el diámetro medio de burbuja en la composición no cambiará sensiblemente en un período de 3 semanas (normalmente medido después del almacenamiento a temperaturas de refrigeración (alrededor de 5°C)) con respecto al tamaño medio, cuando se preparó inicialmente a tiempo $t = 0$. Preferiblemente, el diámetro medio de burbuja relativo (d_t) cambiará menos que un factor de 2,5 en un período de 3 semanas, y preferiblemente menos que un factor de 2. El diámetro de burbuja relativo (d_t) a tiempo t es como se determina en los ejemplos mediante la ecuación:

$$d_t = d_t/d_0$$

en la que d_0 es el diámetro medio inmediatamente después de su preparación, es decir, a $t = 0$, y d_t es el diámetro medio de burbuja a tiempo t .

Un procedimiento adecuado para medir los cambios en el tamaño de la burbuja y en el volumen de la espuma es el uso de una técnica de dispersión de la luz. Convenientemente se pueden utilizar el sistema de medición Turbiscan TLAB (Formulation, Francia), que analiza tanto la luz retrodispersada como la luz transmitida de la muestra aireada de interés.

La espuma a analizar está contenida en una celda de muestras cilíndrica (por ejemplo, con un diámetro de 25 mm rellena con 20 ml de espuma). Se utiliza una fuente de luz de una longitud de onda $\lambda = 880$ nm para suministrar la luz incidente, y dos sensores ópticos reciben la luz transmitida a través de la muestra

(180° de la luz incidente) y la luz retrodispersada (45° de la luz incidente) de la muestra. En el modo de barrido, los sensores ópticos barren la altura del tubo obteniendo los datos tanto de la luz transmitida como de la luz retrodispersada en función de la altura de la muestra y del tiempo. Por lo tanto, los fenómenos de migración (como la formación de crema) y los cambios en el tamaño de las partículas (como el tamaño de la burbuja) se pueden controlar con el tiempo. La teoría y ejemplos pertinentes de la utilización del sistema de medición Turbiscan se pueden encontrar en: Mengual y col., *Colloids and Surfaces A*, 1999, 152, 112-123; Rouimi y col., *Food Hydrocolloids*, 2005, 19, 467-478. Además, se pueden obtener notas de aplicación e información útil en la página web del fabricante: www.turbiscan.com

Experimentalmente, los cambios del tamaño medio de burbuja se observan mejor con las variaciones en la luz retrodispersada en una zona de la muestra donde no se están produciendo otros cambios (como la descomposición de la espuma o la formación de crema en las burbujas). Aquí, hemos utilizado las zonas centrales de la espuma. El nivel de retrodispersión (BS) está relacionado con la trayectoria libre media del transporte de fotones, λ^* , a través de la espuma por la relación:

$$BS = \frac{1}{(\lambda^*)^2}$$

λ^* depende de la fracción de volumen de gas, ϕ , y del diámetro medio de la burbuja d por:

$$\lambda^* = \frac{2d}{3\Phi(1-g)Q}$$

Q y g son dos parámetros ópticos de la teoría de Mie, donde Q es el factor de eficiencia de dispersión y g es un factor de asimetría. Para una espuma de fracción de aire en volumen conocida, el cambio en el diámetro medio de burbuja se puede controlar a lo largo del tiempo. Esto se calcula de forma automática mediante el *software* Turbiscan.

Los parámetros exactos de medición que se pueden utilizar están indicados en los Ejemplos.

La estabilidad de la espuma (volumen de espuma en función del tiempo) y el grado de formación de crema también se pueden determinar por un procedimiento visual con la observación de estos fenómenos en espumas de muestra en las probetas.

Preferiblemente, el grado de formación de crema es tal que después de su almacenamiento durante tres semanas a 5°C, la capa de suero visible que se extiende por debajo del líquido aireado que se forma en la parte inferior del contenedor del producto debido a la desaparición de las burbujas de aire en la región mediante la formación de crema no representa más del 25% de la altura total del producto dentro del contenedor. Más preferiblemente no representa más del 15 o el 20% de la altura total del producto dentro del contenedor. Esto se mide preferiblemente usando un procedimiento visual mediante la observación de este fenómeno en las espumas de muestra en las probetas.

Los productos alimentarios aireados de la invención normalmente están incluidos en uno de estos tres grupos - ambiente (es decir, productos almacenados y/o servidos a temperatura ambiente sin necesidad de refrigeración o congelación), refrigerados o parcialmente congelados (es decir, que normalmente contienen hielo). El término "alimento" incluye bebidas. Los productos alimentarios aireados refrigerados incluyen batidos y té. Productos alimentarios aireados parcialmente congelados incluyen bebidas que contienen hielo y otros productos que contienen hielo que son fluidos a -10°C (véase, por ejemplo, nuestra solicitud co-pendiente WO 06/010 426).

En una forma de realización, el producto alimentario es un producto de confitería.

Agentes de límite de fluencia

El límite de fluencia, la viscosidad y la naturaleza viscoelástica necesarios no sólo dependerán de la necesidad de prevenir la formación de crema, sino que también dependerá del tipo de producto aireado de interés. En una forma de realización, se trata de una espuma vertible que tendrá un límite de fluencia y una viscosidad por cizallamiento relativamente baja (es decir, fluidificación por cizallamiento). Por ejemplo, una viscosidad inferior a 1 Pa·s dentro del régimen de cizallamiento de 10 a 100 s⁻¹.

La formulación requiere un agente o agentes de límite de fluencia, que definimos en el presente documento como un principio o principios (molecular o particulado) que proporcionan un límite de fluencia aparente a la fase continua, retrasando o previniendo así la formación de crema de las burbujas de aire. Los

agentes de límite de fluencia también pueden aumentar la viscosidad a cizallamiento cero o durante el flujo. Con agitación suave (por ejemplo, batido o mezcla breve), sin embargo, el producto fluirá o se verterá debido a que la fase continua presenta un comportamiento de fluidificación por cizallamiento.

- 5 Las composiciones de la invención tendrán un límite de fluencia aparente de la fase continua de al menos 4 Pa, preferiblemente de al menos 4,2, 4,5 ó 5 Pa. En una forma de realización, el límite de fluencia aparente de la fase continua es inferior a 1 MPa, preferiblemente inferior a 100.000 Pa. El límite de fluencia aparente de la fase continua de una composición de la invención se puede determinar como se establece en los Ejemplos.
- 10 Las composiciones de la invención también tendrán una viscosidad de la fase continua, medida a una velocidad de cizallamiento de 10 s^{-1} , de 0,01 a 2.000 Pa·s, preferiblemente inferior a 1000 Pa·s, más preferiblemente inferior a 500, 200 ó 100 Pa·s. La viscosidad de la fase continua para una composición de la invención se puede determinar como se establece en los Ejemplos.
- 15 La temperatura a la que se considera la fluidez, el límite de fluencia aparente y la viscosidad de la composición o el producto es la temperatura a la que normalmente se sirve el producto. Por ejemplo, para un producto refrigerado estos parámetros normalmente se determinan a 5°C mientras que para un producto ambiente estos parámetros normalmente se determinan a temperatura ambiente (20°C) y para un producto que contiene hielo estos parámetros normalmente se determinan a -10°C. Las mediciones generalmente se llevan a cabo a una presión de 1 atm.
- 20 Los principios adecuados que pueden utilizarse como agentes de límite de fluencia, particularmente en sistemas alimentarios, incluyen polisacáridos gelificantes, de los cuales se resumen a continuación algunos ejemplos no limitantes:
- Biopolímeros gelificantes termorreversibles como la gelatina, iota y kappa-carragenano y agar.
 - Biopolímeros gelificantes químicamente rígidos cuya estructura de gel deriva de una interacción entre el polisacárido y un ion apropiado, tal como Ca^{2+} . Los ejemplos incluyen el alginato de sodio y la pectina.
 - Polisacáridos bacterianos tales como xantano o gelano que pueden adoptar un comportamiento de tipo gel débil que es interrumpido por el cizallamiento. Preferiblemente esos polisacáridos se añaden para dar una cantidad final de al menos el 0,4% en peso en la mezcla pre-aireada.
 - Polisacáridos de hongos como el esquizofilano.
 - Geles sinérgicos que comprenden dos o más biopolímeros que pueden ser individualmente no gelificantes, pero en la mezcla formarán un gel o un gel de un módulo superior. Algunos ejemplos incluyen: alginato de sodio con pectina, xantano con goma garrofín, agar con goma garrofín, y kappa-carragenano con goma garrofín.
- 30
- 35 Habitualmente se utilizan varios de los agentes de límite de fluencia descritos anteriormente para gelificar productos de tal manera que se vuelven rígidos, por ejemplo, gelatina. En el contexto de la presente invención, para garantizar que el producto resultante es fluido, por lo general se incluirán a niveles inferiores.
- Fuentes de referencia útiles que describen los 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.
- 40 Los polisacáridos gelificantes no son los únicos principios que se pueden utilizar como agentes de límite de fluencia en el contexto de esta invención. Se puede utilizar cualquier principio (molecular o partículas) que dé como resultado un límite de fluencia aparente de la fase continua. Otros ejemplos de agentes de límite de fluencia incluyen:
- Lipogeles. Estos incluyen, pero no se limitan a, los ésteres de poliglicerol de ácidos grasos saturados, y las mezclas de monoglicéridos de ácidos grasos con ésteres del ácido cítrico de ácidos grasos saturados, los ésteres del ácido láctico de ácidos grasos saturados, o ésteres del ácido diacetil-tartárico de ácidos grasos saturados. Normalmente, la cantidad del principio lipogel sería inferior al 2-5% en peso aproximadamente en la mezcla pre-aireada. Ejemplos de cómo producir lipogeles se pueden encontrar en Heertje y col., Food Science and Technology, 1998, 31, 387-396.
 - Proteínas de gelificación (térmica o químicamente), por ejemplo, proteína de suero.
 - Emulsiones de aceite en agua, donde las partículas de aceite dispersadas interactúan entre sí para proporcionar la fase continua con una naturaleza gelificada.
- 45
- 50

- Fibras, por ejemplo, de la fruta o de origen vegetal, celulosa modificada, etc.

Principios no gelificantes que aumentan la viscosidad de la fase continua (espesor)

5 Además de los agentes de límite de fluencia mencionados, también se pueden añadir espesantes para aumentar la viscosidad de la mezcla pre-aireada, lo que permite el control de las propiedades de flujo del producto aireado durante su uso. Estos no dan lugar a un límite de fluencia cuando se utilizan de forma individual, sino que contribuyen al espesor total y al comportamiento del flujo del producto. Sin embargo, se deben utilizar en combinación con un agente o agentes de límite de fluencia. Esos espesantes se podrían utilizar para aumentar el "cuerpo" de un batido de leche aireado al consumirlo, por ejemplo.

10 Ejemplos no limitantes de espesantes son: almidón no gelificante, proteína del suero, goma garrofín, goma guar, goma arábiga, o carboximetilcelulosa. El espesamiento o viscosificación de la mezcla pre-aireada también se puede conseguir con diversas otras vías de moléculas o partículas. Por ejemplo, la adición de pulpa de frutas o de vegetales, azúcares de alto peso molecular tales como jarabe de maíz, o el uso de proteínas, por ejemplo, proteína de suero. Para espesar también se pueden preparar algunos sistemas basados en una emulsión, por ejemplo: crema batida y natas. También se pueden utilizar lipogeles por debajo de la concentración requerida para formar un límite de fluencia.

15 El agente(s) de límite de fluencia, y los espesantes donde los haya, se seleccionan y se añaden en cantidades adecuadas para dar un producto, antes de la aireación, que tienen el límite de fluencia aparente y la viscosidad deseados, como se ha mencionado anteriormente.

20 Los productos alimentarios aireados opcionalmente pueden contener otros principios tales como uno o más de los siguientes: otras proteínas, como proteínas lácteas, ya sea como principios puros o como principios líquidos, por ejemplo, leche o nata; aceite o grasa, sobre todo en forma de fase emulsionada; azúcares; sales; colorantes y sabores; emulsionantes químicos, como monoglicéridos, té o café; purés/extractos/zumos de frutas o vegetales; estabilizantes o espesantes, como polisacáridos; conservantes; inclusiones, como frutos secos, frutas, caramelos.

25 Para los productos no alimentarios aireados, además de hidrofobina y de un agente espesante apropiado, se pueden incluir otros principios para crear el tipo de producto específico. Estos incluyen, pero no se limitan a:

- Tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos.
- Ácidos grasos como el ácido esteárico y palmítico y ácidos grasos de mono-/di- o tri-glicéridos.
- 30 - Ácidos o bases, como ácido clorhídrico e hidróxido sódico
- Conservantes, por ejemplo, ácido benzoico
- Alcoholes de azúcares, por ejemplo, glicerol y sorbitol
- Polímeros como el PEG y el carbómero

35 La cantidad de hidrofobina presente en el producto por lo general varía dependiendo de la formulación del producto y el volumen de la fase aérea. Normalmente, el producto contendrá al menos el 0,001% en peso, de hidrofobina, más preferiblemente al menos el 0,005 o el 0,01% en peso. Normalmente el producto contiene menos del 1% en peso de hidrofobina. La hidrofobina puede proceder de una sola fuente o de una pluralidad de fuentes, por ejemplo, la hidrofobina puede ser una mezcla de dos o más polipéptidos de hidrofobina diferentes.

40 Preferiblemente, la hidrofobina es una hidrofobina de clase II.

45 La presente invención también incluye composiciones para la producción de un producto aireado, por lo general un producto alimentario, de la invención, cuya composición comprende una hidrofobina y un agente de límite de fluencia. Dichas composiciones incluyen premezclas líquidas, por ejemplo, premezclas utilizadas en la producción de productos de confitería refrigerados o parcialmente congelados, y mezclas secas, por ejemplo polvos, a los que se les añade un líquido acuoso, como leche o agua, antes o durante la aireación.

50 Las composiciones para la producción de un producto refrigerado o parcialmente congelado de la invención comprenderán otros principios, además de la hidrofobina y el agente de límite de fluencia, que normalmente están incluidos en el producto, por ejemplo, en el caso de productos alimentarios, azúcar, grasa, emulsionantes, aromatizantes, etc. Las composiciones pueden incluir todos los demás principios necesarios para preparar el producto de tal manera que la composición esté lista para ser procesada, es decir, aireada, para formar un producto aireado de la invención.

Las composiciones secas para la producción de un producto aireado de la invención también incluirán otros principios, además de la hidrofobina y el agente de límite de fluencia, que normalmente están incluidos en el producto, por ejemplo, en el caso de productos alimentarios, azúcar, grasa, emulsionantes, aromatizantes, etc. Las composiciones pueden incluir todos los demás principios no líquidos necesarios para preparar el producto de tal manera que todo lo que el usuario necesita es añadir un líquido acuoso, tal como agua o leche, y la composición está lista para ser procesada para formar un producto aireado de la invención. Estas composiciones secas, de las que son ejemplos los polvos y granulados, se pueden diseñar para uso industrial y para venta al por menor, y se pueden beneficiar de un volumen reducido y una vida de almacenamiento más larga.

10 La hidrofobina se añade en una forma y en una cantidad tales que esté disponible para estabilizar la fase aérea. Con el término "añadir", queremos decir que la hidrofobina se introduce deliberadamente en el producto con el fin de aprovechar las propiedades estabilizantes de la espuma. Por consiguiente, cuando hay principios presentes o añadidos que contienen hongos contaminantes que puedan contener polipéptidos de hidrofobina, esto no constituye la adición de hidrofobina en el contexto de la presente invención.

15 Normalmente, la hidrofobina se añade al producto en una forma tal que es capaz de auto-ensamblarse en una superficie aire-líquido.

20 Normalmente, la hidrofobina se añade al producto o a las composiciones de la invención en una forma aislada, por lo general, al menos parcialmente purificada, tal como al menos un 10% pura, basado en el peso de los sólidos. Por "se añade en forma aislada", queremos decir que la hidrofobina no se añade como parte de un organismo de origen natural, tal como un hongo, que expresa hidrofobinas de forma natural. En cambio, la hidrofobina normalmente se extrae de una fuente de origen natural o se obtiene por la expresión recombinante en un organismo hospedador.

25 En una forma de realización, la hidrofobina se añade al producto en forma de monómero, dímero y/o oligómero (es decir, que consta de 10 unidades monoméricas o menos). Preferentemente 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 normalmente experimentará el ensamblaje en la interfase aire/líquido y por tanto se espera que disminuya la cantidad de monómero, dímero y oligómero.

En una forma de realización, la hidrofobina se añade a la composición aireada de la invención en una forma aislada, por lo general, al menos parcialmente purificada.

30 La combinación de hidrofobina y uno o más agentes de límite de fluencia se puede utilizar tanto para estabilizar la fase aérea en una composición fluida aireada (por lo general inhibiendo el engrosamiento de las burbujas, es decir, se ha encontrado que las hidrofobinas no sólo estabilizan el volumen de la espuma, sino también el tamaño de las burbujas dentro de la espuma) como para inhibir la formación de crema en la composición confiriendo propiedades reológicas adecuadas a la fase continua.

35 En otro aspecto, la invención se puede aplicar a composiciones aireadas congeladas o rígidas, donde la formación de crema es un problema en el momento requerido para que el producto se endurezca o se congele. En consecuencia, la presente invención también proporciona un procedimiento para inhibir la formación de crema en una composición aireada congelada o rígida antes del endurecimiento o la congelación de la composición, el procedimiento que comprende la adición de hidrofobina y un agente de límite de fluencia a la composición antes o durante el endurecimiento o la congelación del producto. Preferiblemente, el tiempo necesario para que el producto se congele o se endurezca es superior a 1 hora. En una forma de realización preferida, el producto, inmediatamente después de la aireación, tiene una viscosidad de la fase continua inferior a 100 Pa.

45 La presente invención se describe con más detalle con referencia a los ejemplos siguientes, que son sólo ilustrativos y no limitantes.

Descripción de las figuras

Figura 1: Viscosidad en función del esfuerzo de cizallamiento para disoluciones que contienen el 0,1% de hidrofobina de clase II (HFB II) y el 0,3, 0,4, y 0,5% de xantano.

50 Figura 2: Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento para disoluciones que contienen el 0,1% de HFB II y el 0,3, 0,4, y 0,5% de xantano.

Figura 3. Diámetro de burbuja medio con respecto al del tiempo $t = 0$ en función del tiempo para el caseinato de sodio (Na Cas), leche desnatada en polvo (LDP), ésteres de poliglicerol (PGE) y espumas de HFB II estabilizadas.

Figura 4. Estabilidad de la espuma con respecto a la formación de crema para espumas estabilizadas por un agente tensioactivo con un 0,5% de xantano en la fase acuosa.

Figura 5: Diámetro de burbuja medio con respecto al del tiempo $t = 0$ en función del tiempo para espumas preparadas utilizando HFB II con diferentes concentraciones de goma xantano.

5 Figura 6. Estabilidad con respecto a la formación de crema para espumas de HFB II con xantano en la fase continua.

Figura 7: Imágenes de espumas que contienen el 0,1% de HFB II (izquierda) con el 0,3% de xantano después de 5 meses de almacenamiento (centro) el 0,4% de xantano después de 6 semanas de almacenamiento (derecha) el 0,5% de xantano después de 5 meses de almacenamiento a 5°C.

10 Figura 8: Imágenes de la espuma que contiene el 0,1% de HFB II y el 0,5% de xantano después de 5 meses de almacenamiento a 5°C. Espuma en una probeta de 100 ml (izquierda) y de cerca (derecha) que muestra un grado de separación de fases (formación de crema) muy pequeño (<5% en volumen).

15 Figura 9: Imágenes de un producto de batido lácteo aireado que contiene el 0,1% de HFB II y el 0,41% de xantano recién preparado (izquierda) y después de 3 semanas de almacenamiento a 5°C (derecha) que presenta poca formación de crema o crecimiento de burbujas.

Figura 10: Imágenes de un producto batido de frutas aireado que contiene el 0,1% de HFB II y el 0,41% de xantano recién preparado (izquierda) y después de 3 semanas de almacenamiento a 5°C (derecha) que presenta poca formación de crema o crecimiento de burbujas.

EJEMPLOS

20 Metodologías experimentales

Aquí los inventores describen los fundamentos de los procedimientos experimentales utilizados para medir las propiedades de la espuma y la reología en disolución de los productos incluidos en esta invención. Los parámetros experimentales exactos elegidos para la medición se describen en el Ejemplo.

Mediciones de la estabilidad de la espuma, tamaño de la burbuja, y formación de crema

25 El procedimiento principal de los inventores para medir los cambios en el tamaño de burbuja y el grado de formación de crema en muestras de espuma fue utilizando una técnica de dispersión de la luz. Se utilizó el sistema de medición Turbiscan TLab (Formulacion, Francia), que analiza tanto la luz retrodispersada como la luz transmitida de la muestra aireada de interés. Esto se describe con mayor detalle más arriba.

30 También observaron los inventores la estabilidad de la espuma (volumen de espuma en función del tiempo) y el grado de formación de crema por un procedimiento visual observando estos fenómenos en muestras de espuma en probetas.

Medición de la viscosidad de la fase continua y del límite de fluencia aparente

35 Se determinó una medida de la viscosidad de la fase continua y el límite de fluencia aparente de las mezclas sin airear con el uso de la reología. Los detalles experimentales exactos se resumen en los Ejemplos. Para determinar una medida del límite de fluencia aparente y una viscosidad de cizallamiento cero de las mezclas a partir del log del esfuerzo de cizallamiento frente al log de los datos de viscosidad, el régimen de fluidificación por cizallamiento de las curvas se ajustó a un modelo de Herschel-Bulkley. Los inventores consideran que la viscosidad de fluencia aparente es el esfuerzo de cizallamiento mínimo que provoca la aparición de la fluidificación por cizallamiento. Éste es un procedimiento común utilizado por los expertos en la materia. Referencias útiles que describen este comportamiento se pueden encontrar en Stokes y Telford (Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2004, 124, 137-146) y Barnes, Hutton, y Walters (An Introduction to Rheology, Rheology Series 3, Elsevier Science, 1989).

Ejemplo 1: Espumas estables fluidas con reducción de la formación de crema

45 Materiales y formulaciones

Se prepararon ejemplos de productos aireados refrigerados usando 3 tipos de proteína de superficie activa (de A a C) y un emulsionante que forma un lipogel (D):

A: Caseinato de sodio (Na Cas)

B: Leche desnatada en polvo (LDP)

C: Hidrofobina (HFB II) de *Trichoderma reesei*

D: Ésteres de poliglicerol de ácidos grasos saturados (PGE)

5

Los detalles de los materiales utilizados se resumen en la Tabla 1 y las formulaciones a partir de las que se prepararon cada una de las muestras de espuma refrigeradas se muestran en la Tabla 2. Las espumas se prepararon y almacenaron a temperaturas de refrigeración (5°C). Su estabilidad de la espuma, con respecto al tamaño de las burbujas y la formación de crema se controlaron a lo largo del tiempo utilizando el instrumento Turbiscan.

Tabla 1. Principios utilizados con la información del proveedor

Principio	Composición	Proveedor
Caseinato de sodio	88-90% de proteína, 1,5% de grasa, 6% de humedad	DMV International, Países Bajos
Leche desnatada en polvo	33-36% de proteína, 0,8% de grasa, 3,7% de humedad	United Milk, RU
Éster de poliglicerol (PGE 55)	100% de materia grasa	Danisco
HFB II	Purificada de <i>T. reesei</i> *	VTT Biotechnology, Finlandia
Goma xantano (Keltrol RD)	Polisacárido	CP Kelco

10

* Hidrofobina de clase II purificada a partir de *Trichoderma reesei* esencialmente como se describe en el documento WO 00/58342 y Linder y col., 2001, Biomacromoleculas 2: 511-517).

Tabla 2. Formulaciones

	Mezcla A	Mezcla B	Mezcla C	Mezcla D	Mezcla E	Mezcla F	Mezcla G
Principio	Concentración en % en peso						
Caseinato de sodio	3,4	0,5	--	--	--	--	--
Leche desnatada en polvo	--	--	10,4	--	--	--	--
PGE 55	--	--	--	--	--	--	0,5
HFB II	--	--	--	0,1	0,1	0,1	--
Goma xantano	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,5
Agua	96,9	99,0	89,1	99,4	99,5	99,6	99,0

Preparación y análisis de los productos aireados

Preparación de la mezcla

15

Todas las mezclas se prepararon en lotes de 100 g. Para las Mezclas A, B y C (que contiene caseinato de sodio y leche en polvo desnatada, respectivamente), se mezclaron la proteína y la goma xantano y se añadieron lentamente en agua agitada a temperatura ambiente. Las disoluciones se calentaron posteriormente (a 55°C para el Na Cas y 40°C para la LDP) para asegurarse de que las proteínas estuvieran adecuadamente hidratadas. Las mezclas se enfriaron y se almacenaron a 5°C hasta su uso posterior.

20

La Mezcla G se preparó mezclando el polvo de goma xantano y el polvo de PGE juntos, con la dispersión en agua fría desionizada y a continuación el calentamiento a 60°C con agitación durante 30 minutos. Esta disolución se enfrió y se almacenó a 5°C hasta su uso posterior.

Para las Mezclas D, E y F (que contienen HFB II), primero se dispersó el xantano en agua fría con agitación durante al menos 30 minutos. A continuación, se añadió la concentración requerida de HFB II a esto como una alícuota. La disolución se sometió a sonicación suave en un baño de ultrasonidos durante 30

segundos para disolver completamente la HFB II. La mezcla se enfrió y se almacenó a 5°C hasta su uso posterior.

Los altos niveles de caseinato de Na y de LDP seleccionados como las concentraciones de proteína son proporcionales a los niveles encontrados en bebidas de batidos lácteos disponibles comercialmente.

5 *Proceso de aireación*

80 ml de mezcla se sometieron a cizallamiento en recipiente agitado (refrigerado a 5°C) a una velocidad de 1200 rpm para una duración de tiempo que corresponde a la obtención del 100% de saturación.

10 Los tiempos de aireación para alcanzar el 100% de saturación se resumen en la Tabla 3. El recipiente agitado consiste en un recipiente cilíndrico, montado verticalmente, con camisa de acero inoxidable con unas medidas internas de 105 mm de altura y 72 mm de diámetro.

15 El rotor utilizado para someter a cizallamiento la muestra consiste en un impulsor rectangular de las proporciones correctas para raspar la superficie interna del recipiente a medida que gira (dimensiones de 72 mm x 41,5 mm). También conectados al rotor hay dos cuchillas semi-circulares (60 mm de diámetro) de alto cizallamiento colocadas en un ángulo de 45° con la unión rectangular. Después de la aireación, las muestras se almacenaron a 5°C en probetas de 100 ml o en viales Turbiscan normales antes de su posterior análisis.

Tabla 3. Tiempo de aireación y saturación para las mezclas A-G

Muestra	Tiempo de aireación/min	Saturación/%
Mezcla A	1	100
Mezcla B	1,16	100
Mezcla C	1	100
Mezcla D	2	100
Mezcla E	2	100
Mezcla F	2	100
Mezcla G	10	100

Medición de la viscosidad y del límite de fluencia aparente

20 Las mediciones reológicas se realizaron con un reómetro AR-G2 (TA Instruments Ltd, Crawley, Reino Unido). Se llevaron a cabo experimentos de flujo escalonados sobre las mezclas sin aireación para determinar la viscosidad frente al esfuerzo de cizallamiento y la viscosidad frente a las curvas de velocidad de cizallamiento. Todas las mediciones se realizaron a 5°C (con refrigeración controlada por Peltier). Se utilizó una geometría de cono y de placa. El cono estaba hecho de acero inoxidable y tenía 6 mm de diámetro con un ángulo de 2°. A partir de estos datos, se pudieron determinar las gráficas de la viscosidad en función del esfuerzo de cizallamiento y la viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento. Usando el modelo de Hershel Bulkley (que se ajusta a los datos en el límite del esfuerzo de alto cizallamiento de los datos), se puede determinar un límite de fluencia aparente.

25

Medición de la estabilidad de la espuma y de la burbuja y grado formación de crema de la espuma

30 La estabilidad de la espuma y de sus burbujas en ella se midió utilizando el Turbiscan TLab, cuyos detalles operativos se han discutido previamente. Esto permite la determinación de lo siguiente en función del tiempo: (1) El volumen de la espuma (es decir, la medición de la pérdida total de fase aérea). (2) El tamaño de burbuja medio. (3) El grado de la formación de crema en la espuma.

30

35 La espuma producida se dosificó en un tubo de muestras de vidrio Turbiscan hasta una altura de unos 42 mm, que corresponde a 20 ml de espuma aproximadamente. El equipo entonces analiza y mide tanto la luz retrodispersada como la luz transmitida entre una altura de 2 y 55 mm. Las mediciones se realizaron durante un período de varias semanas. Puesto que los datos se recogen sobre la altura total de la muestra, a partir de esto, los valores medios de los perfiles de retrodispersión entre límites definidos (altura inferior y superior) dan información específica con respecto a cambios en la muestra en esa área, por ejemplo, del tamaño de burbuja o de la formación de crema.

Tamaño de burbuja: De los datos de retrodispersión medidos entre 20 y 30 mm, se calculó de forma automática el tamaño medio de burbuja a partir de la luz retrodispersada. Los índices de refracción fueron considerados como los del agua y del aire. La fracción de volumen de la fase aérea de la espuma fue de 0,5. Aunque la fracción de volumen de la fase aérea de la espuma puede cambiar con el tiempo, sobre todo si no es estable y tiene lugar la formación de crema, encontramos que la toma de medidas entre una altura de 20 y 30 mm de la muestra dio datos de tamaño fiables, a menos que la espuma fuese muy inestable. Si la espuma era muy inestable, entonces los datos de tamaño deben ser tomados con cautela en un sentido cuantitativo, pero se pueden comparar con el de otras espumas.

Formación de crema de la espuma: El grado de formación de crema en la espuma se midió por dos procedimientos.

1. Dispersión de luz usando el Turbiscan: La cantidad de formación de crema en la espuma con el tiempo se determinó midiendo el cambio de luz retrodispersada a lo largo del tiempo entre una altura de la muestra de 0 a 10 mm. A medida que la espuma forma una crema, se espera que la intensidad de la retrodispersión entre estas alturas disminuya, ya que más luz será retrodispersada en presencia de burbujas de aire. Estos datos se obtuvieron principalmente para las espumas de HFB II porque la estabilidad de las burbujas significa que los cambios en la retrodispersión se pueden atribuir exclusivamente a cambios en el volumen de las burbujas de aire dentro de una región de la celda de muestra. Para espumas menos estables que presentan tanto un crecimiento de burbuja como una formación de crema rápidos, es más difícil desentrañar cuantitativamente los dos, ya que ambos procesos ocurren al mismo tiempo.

2. Observaciones visuales en una probeta. 100 ml de espuma producida se pusieron en una probeta de 100 ml y la parte superior se cubrió con papel film para evitar la desecación de la parte superior de la espuma. Se registraron la altura de la espuma y la altura del suero (fase continua) a medida que la espuma forma una crema con el tiempo. A pesar de que el crecimiento de la burbuja y la separación del suero (formación de crema) se producen al mismo tiempo, se puede establecer cuantitativamente el grado de formación de crema.

Resultados y Discusión

Viscosidad y límite de fluencia de las mezclas

La viscosidad y el límite de fluencia de la mezcla es importante para prevenir o controlar la velocidad de formación de crema de la burbuja. Por lo tanto, en la formulación de productos aireados en la que se detiene la formación de crema, es conveniente hacer un análisis de la reología para ayudar en la capacidad de predicción. A continuación se describen algunas de las principales características reológicas de las Mezclas D, E y F, que contienen el 0,1% en peso de HFB II y el 0,5, 0,4, y 0,3% en peso de xantano en la disolución, respectivamente.

Las Figuras 1 y 2 muestran dos importantes condiciones reológicas para hacer posible las espumas vertibles. Los datos en la Figura 1 muestran el efecto de la concentración de xantano sobre el límite de fluencia aparente y sobre la viscosidad de la disolución. Usando el modelo de Hershel Bulkley (que se ajusta a los datos en el límite del esfuerzo de alto cizallamiento de los datos), se puede determinar un límite de fluencia aparente. De los datos, se calcula para:

0,3% en peso de la solución de xantano con el 0,1% de hidrofobina - límite de fluencia aparente = 2,8 Pa

0,4% en peso de la solución de xantano con el 0,1% de hidrofobina - límite de fluencia aparente = 4,5 Pa

0,5% en peso de la solución de xantano con el 0,1% de hidrofobina - límite de fluencia aparente = 5,5 Pa

El límite de fluencia aparente es el parámetro principal que regirá la velocidad y el grado de formación de crema. Los datos de la Figura 2 muestran el efecto de la concentración de xantano sobre la viscosidad de las mezclas a alta cizalla. Sugerimos que la viscosidad de la mezcla a velocidades de cizallamiento entre 10 y 100 s⁻¹ es comparable a la viscosidad que se experimentaría en el flujo o durante el consumo. Para cada una de las concentraciones de xantano, la viscosidad de la mezcla sobre el régimen de velocidad de cizallamiento de 10 a 100 s⁻¹ es inferior a 1 Pa·s.

Estabilidad de la burbuja

El cambio en el tamaño relativo medio de burbuja (d_r) en la espuma en función del tiempo se muestra

en la Figura 3. En el caso de la HFB II, las burbujas son muy estables y no se observan cambios en el tamaño medio después de varias semanas de almacenamiento en frío. El PGE al 0,5% también muestra una buena estabilidad, aunque el tamaño medio de burbuja se incrementa gradualmente. Además, el nivel de PGE utilizado (0,5% en peso) es superior al permitido normalmente en productos alimentarios. Cada una de las proteínas no HFB muestran poca estabilidad. El crecimiento rápido de la burbuja se produce en unas pocas horas para cada una de las mezclas aireadas. El engrosamiento de estas espumas se acelera a lo largo del corto tiempo de vida, dando lugar en última instancia a la descomposición completa de la espuma.

Formación de crema de la espuma

La Figura 4 muestra los cambios en la retrodispersión en función del tiempo en el intervalo de alturas de 0 a 10 mm en el vial de muestras. En el caso del PGE y la HFB II, donde se demostró que el tamaño de la burbuja permanece casi constante durante largos períodos de tiempo (en particular con la HFB II), es evidente que la retrodispersión tampoco cambia significativamente. Sólo se observa una pequeña cantidad de formación de crema en escalas de tiempo prolongadas (más de 1000 horas, lo que equivale a más de un mes).

En el caso de las espumas estabilizadas por las proteínas de los productos lácteos (LDP y Na Cas), la interpretación de los datos de la dispersión de luz es algo más compleja, ya que la formación de crema y el crecimiento de la burbuja se producirán al mismo tiempo. Sin embargo, se pueden hacer algunas observaciones de carácter general. Utilizando una concentración del 0,5% de xantano, a tiempo = 0 las burbujas son de un tamaño inicial comparable al de las compuestas con HFB II. Por lo tanto, esperamos que la formación de crema se inhiba en este punto. Sin embargo, se produce el crecimiento de la burbuja (debido a la desproporción y coalescencia) lo que da lugar a una disminución de la retrodispersión medida. En última instancia, las burbujas superarán un diámetro medio crítico y comenzarán a formar la crema a medida que la fuerza de flotabilidad exceda el límite de fluencia que mantiene a las burbujas en su lugar. Aunque la presencia de goma xantano proporciona un límite de fluencia al sistema que se espera que evite la formación de crema de burbujas pequeñas (aprox. < 200 μm de diámetro), con el tiempo las burbujas crecen por encima de este tamaño y el límite de fluencia no es suficiente para evitar la aparición de las burbujas. Este proceso, y el posterior crecimiento de la burbuja, dan lugar a un ritmo creciente de disminución de la retrodispersión con el tiempo.

La espuma estabilizada por la HFB II pone de manifiesto una estabilidad superior a cualquiera de los otros tensioactivos investigados en el presente documento.

Efecto de la concentración de xantano (efecto del límite de fluencia aparente)

Los datos presentados en las Figuras 5 y 6 muestran el efecto de la concentración de xantano, y por tanto del límite de fluencia, sobre el grado de formación de crema en una espuma formada por burbujas estables producidas usando el 0,1% de HFB II.

En la Figura 5, es claro que a una concentración de xantano del 0,5%, durante un período de más de 1000 horas, el tamaño de burbuja en el área de muestra medida cambia muy poco. La disminución de la concentración de xantano al 0,4% da lugar a una pequeña disminución en el tamaño de burbuja medido durante largos períodos de tiempo. Esto probablemente no es debido a la contracción de la burbuja, sino más bien debido a la formación de crema de las burbujas. Las burbujas más grandes salen de la zona de medición, dejando una mayor proporción de burbujas en la zona de medición. Esto da lugar a una aparente disminución en el tamaño medio de burbuja. Se observa el mismo efecto a una concentración de xantano del 0,3% en un período de tiempo más corto. El efecto es más rápido debido a un límite de fluencia más bajo. Cabe destacar, sin embargo, que los cambios observados a unas concentraciones de xantano del 0,4 y el 0,5% son relativamente pequeños.

Las conclusiones extraídas de la Figura 5 se demuestran posteriormente en la Figura 6. Esto muestra el grado de formación de crema a través de la retrodispersión medida en la parte inferior del vial de muestras (de 0 a 10 mm). Es evidente que, al 0,5% de xantano, se inhibe la formación de crema con sólo una pequeña cantidad de capa de suero visible evidente después de más de un mes de almacenamiento. La formación de crema tiene lugar con mayor rapidez y en mayor grado a medida que se reduce la cantidad de xantano y se reduce el límite de fluencia. Estos cambios ocurren al mismo tiempo que los cambios en el tamaño de burbuja observados en la Figura 5.

La apariencia visual de las espumas aireadas que contienen HFB II y xantano después del almacenamiento a 5°C se muestran en las Figuras 7 y 8. Está claro que después de un almacenamiento prolongado, usando el 0,5% de xantano como agente espesante, la formación de crema de la burbuja está casi completamente inhibida y sólo se puede observar una ligera separación de fases. Con el uso de un 0,4% de xantano, hay una mayor (aunque todavía pequeña) cantidad de formación de crema. Con el uso de un 0,3% de xantano, el límite de fluencia aparente no es lo suficientemente grande como para evitar la formación de crema

durante el tiempo de almacenamiento. Este producto en particular no sería aceptable (el nivel de separación de suero indicado en la parte inferior del vial supera el 10% después de 3 semanas), mientras que el uso del 0,4 y el 0,5% de xantano sería aceptable (el nivel de suero fue inferior al 10% después de 3 semanas).

5 En consecuencia, puesto que el límite de fluencia aparente de la fase continua calculado anteriormente para el 0,3, 0,4 y 0,5% de xantano es de 2,8, 4,5 y 5,5 Pa, respectivamente, hemos determinado que el límite de fluencia aparente mínimo debe ser de al menos unos 4 Pa.

Ejemplo 2: Batido de chocolate aireado

10 Se preparó un batido de leche aireado con sabor a chocolate de la manera siguiente. Se compró un batido de leche disponible comercialmente (Friji™ Thick Fresh Milkshake producido por Dairy Crest Ltd, Shropshire, Reino Unido). Este es un producto sin aireación y, de acuerdo con la lista de principios, contiene: leche desnatada, leche entera, azúcar, almidón de maíz modificado, grasa de cacao en polvo reducido, polvo de suero de leche y estabilizantes (carragenano y goma guar). La goma xantano se añadió lentamente al batido de leche con agitación a una concentración del 0,5% en peso. Esto se mezcló durante 20 minutos para permitir que la goma xantano se hidratase por completo. Un volumen conocido del 0,5% en peso de disolución de hidrofobina se aireó hasta una saturación del 400% utilizando un dispositivo de mano aerolatte™. Esto se añadió a la leche agitada para dar un producto batido aireado con una saturación del 100%, una concentración global de hidrofobina del 0,1% en peso y una concentración global de xantano del 0,41% en peso. El producto batido aireado se almacenó a 5°C y su estabilidad se controló durante un periodo de tres semanas. La Figura 9 muestra que después de 3 semanas, el producto batido aireado retenido en una fase aérea estable que no formó una crema o colapsó y no mostró un crecimiento significativo de la burbuja.

Ejemplo 3: Batido de frutas aireado

25 Se preparó un batido de frutas aireado usando la bebida Vie Shots™, producida por Unilever UK como base de puré de frutas. La Vie Shot™ contiene: puré de plátano (28%), concentrado de zumo de naranja (26%), concentrado de zumo de zanahoria (23%), concentrado de zumo de calabaza (14%), pulpa de naranja (4%), concentrado de zumo de limón, concentrado de cereza acerola (1,5%), y pectina de manzana. El pH (a temperatura ambiente) era 4,17. La goma xantano se añadió lentamente al puré de frutas con agitación hasta una concentración del 0,5% en peso. Esto se mezcló durante 20 minutos para permitir que la goma xantano se hidratase por completo. Un volumen conocido del 0,5% en peso de disolución de hidrofobina se aireó hasta una saturación del 400% utilizando un dispositivo de mano aerolatte™. Esto se añadió al puré de frutas para dar un batido de frutas aireado con una saturación del 100% aproximadamente, una concentración global de hidrofobina del 0,1% en peso y una concentración global de xantano del 0,41% en peso. El producto batido de frutas aireado se almacenó a 5°C y su estabilidad se controló durante un periodo de tres semanas. La Figura 10 muestra que después de 3 semanas, el producto batido de frutas aireado retuvo una fase aérea estable y que no se produjo un crecimiento significativo de la burbuja o una formación de crema.

REIVINDICACIONES

1.- Una composición aireada capaz de fluir que comprende hidrofobina y un agente de límite de fluencia, la composición que tiene una viscosidad de fase continua, medida a una velocidad de cizallamiento de 10 s^{-1} , de entre 0,01 a 2000 Pa·s, y un límite de fluencia aparente de la fase continua de al menos 4 Pa.

5 2.- Una composición aireada según la reivindicación 1 que comprende al menos el 0,001% en peso y menos del 1% en peso de hidrofobina.

3.- Una composición aireada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que la hidrofobina se encuentra en forma aislada.

4.- Una composición aireada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la hidrofobina es una hidrofobina de clase II.

10 5.- Una composición aireada según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el agente de límite de fluencia es un polisacárido.

6.- Una composición aireada según la reivindicación 5 en la que el polisacárido es xantano y/o gelano.

7.- Una composición aireada según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un espesante.

15 8.- Una composición aireada según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es vertible.

9.- Una composición aireada según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un producto alimentario aireado.

20 10.- Un producto alimentario aireado según la reivindicación 9, que es un producto alimentario refrigerado.

11.- Uso de una hidrofobina y un agente de límite de fluencia para inhibir la formación de crema en una composición aireada capaz de fluir.

Fig.1.

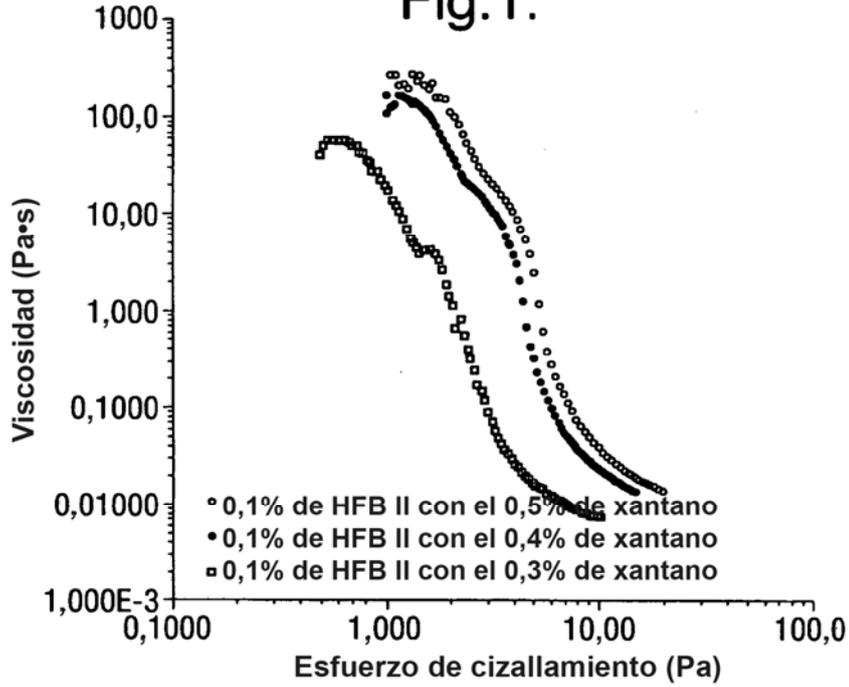


Fig.2.

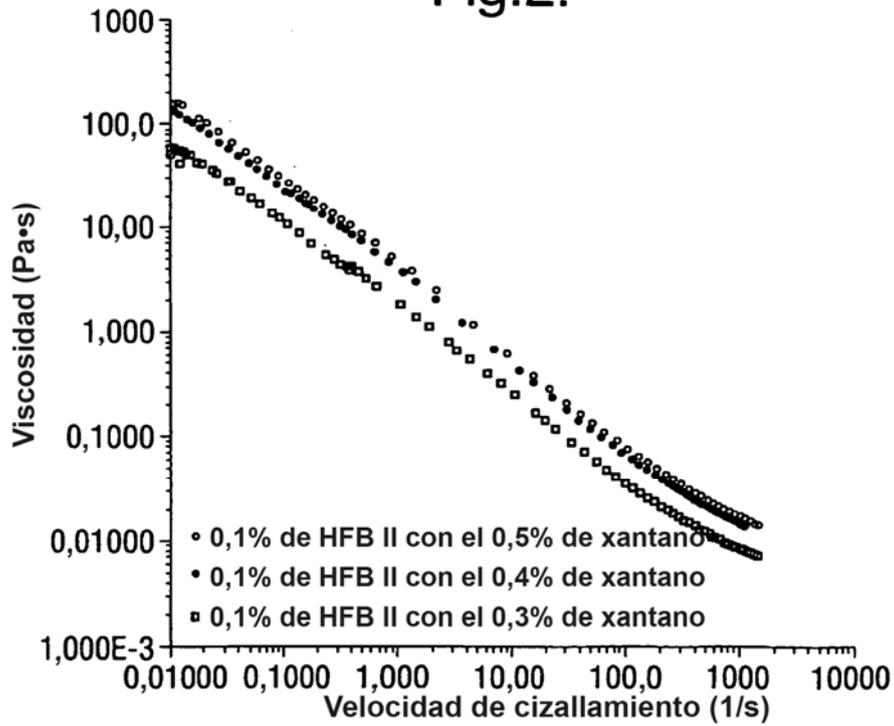


Fig.3.

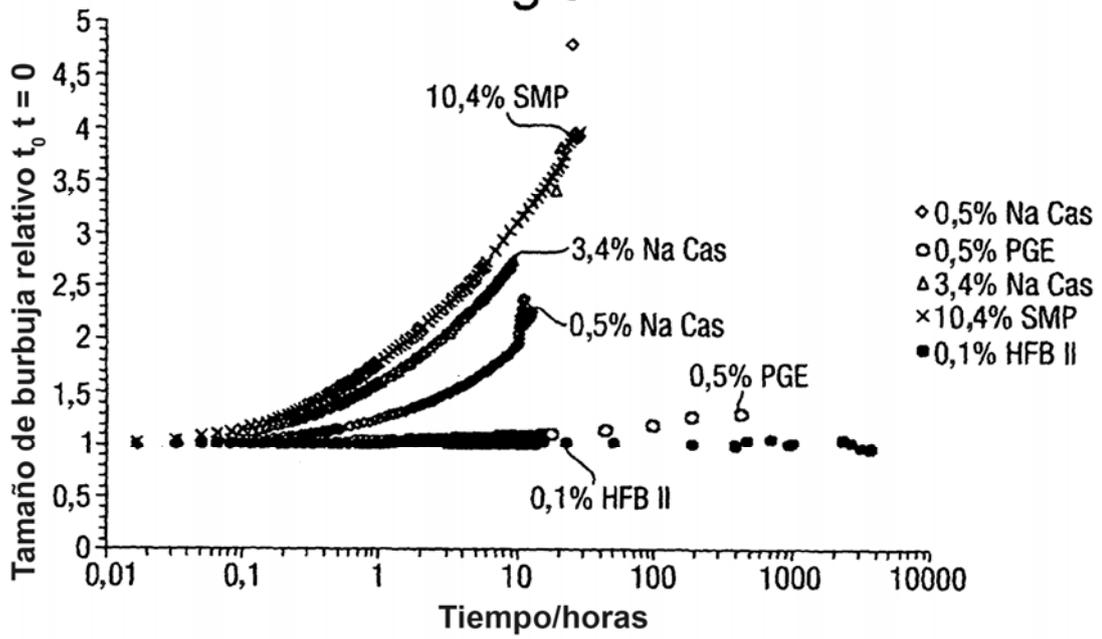
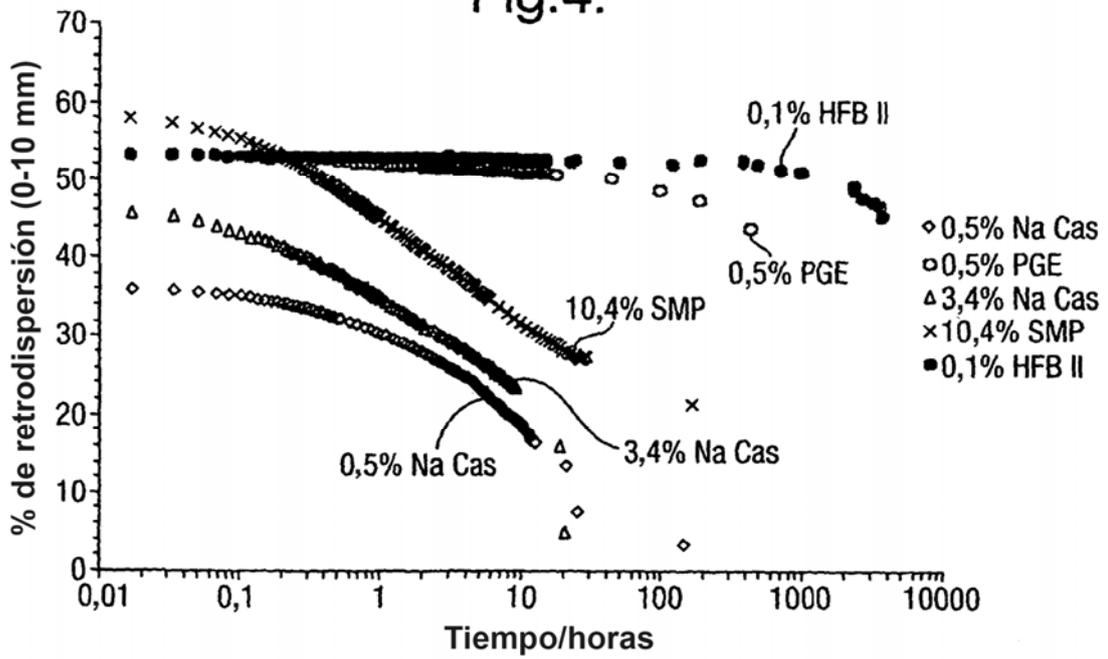


Fig.4.



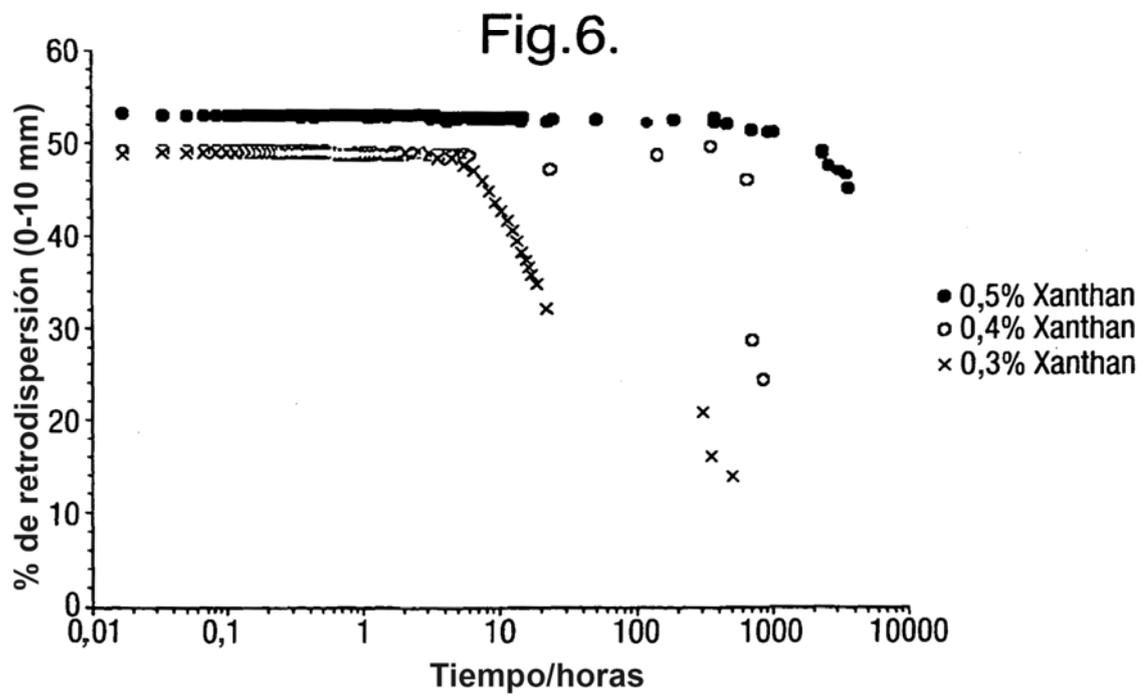
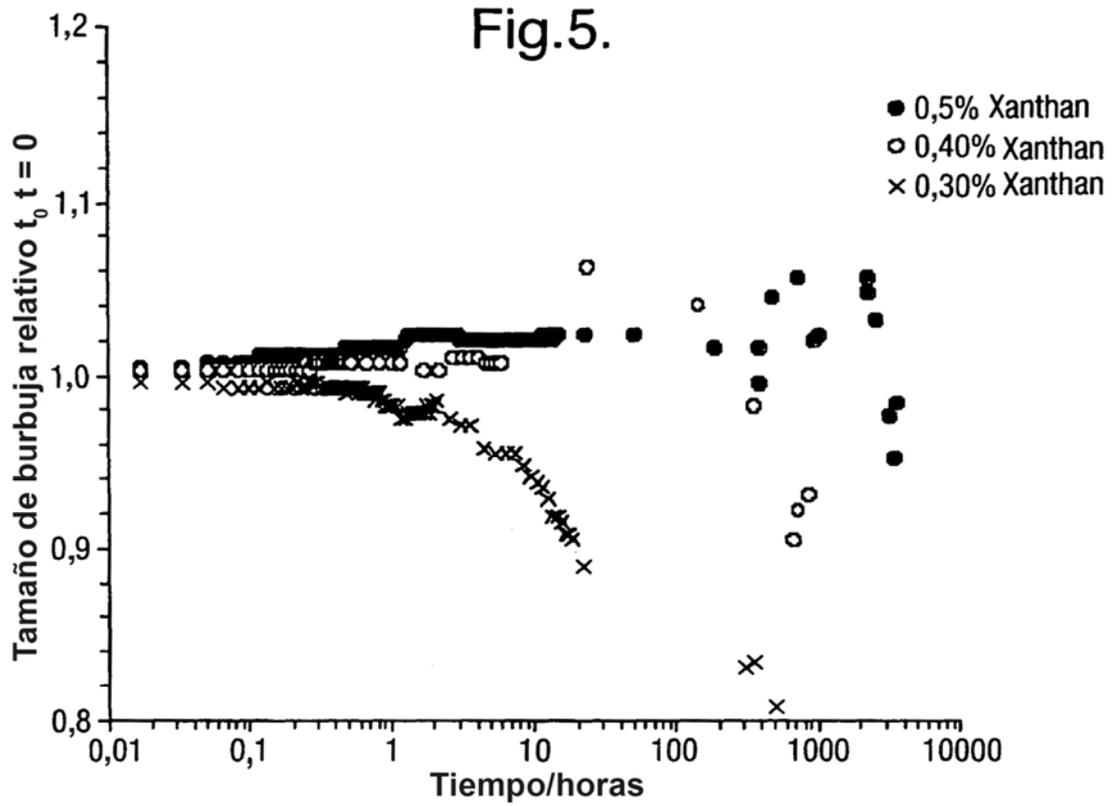


Fig.7.



Fig.8.

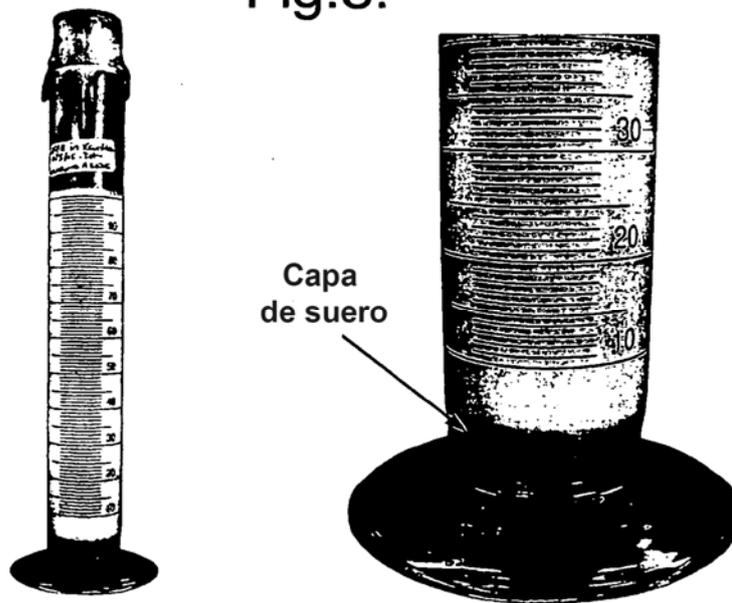
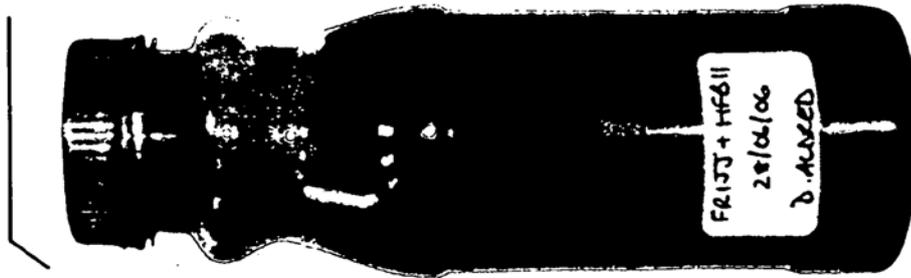


Fig.9.

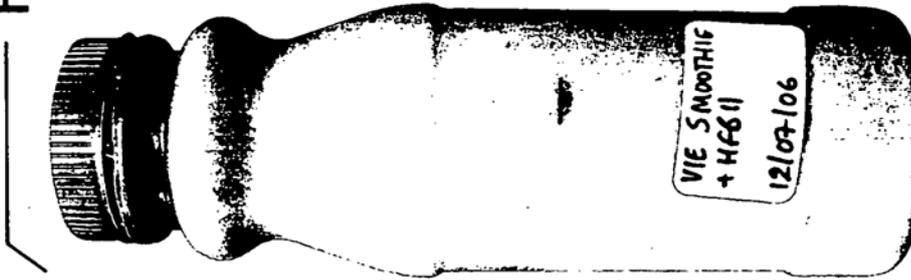


Tiempo = 0 días



Tiempo = 3 semanas

Fig.10.



Tiempo = 0 días



Tiempo = 3 semanas