(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 377 709**

(51) Int. CI.:

A23L 1/00 (2006.01)
A23L 1/035 (2006.01)
A23G 3/52 (2006.01)
A23G 9/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **09724628 .4**
(96) Fecha de presentación: **25.03.2009**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2254426**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

(54) Título: **Agentes espumantes que comprenden hidrofobina**

(30) Prioridad:
28.03.2008 EP 08153592

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

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

(72) Inventor/es:
AUMAITRE, Elodie;
FARRER, Donald Bernard;
HEDGES, Nicholas David;
WILLIAMSON, Ann-Marie y
WOLF, Bettina

(74) Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

Agentes espumantes que comprenden hidrofobinas.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a hidrofobinas y su uso como agentes espumantes, por ejemplo en productos alimenticios.

Antecedentes de la invención

El documento EP 1626361 desvela que las hidrofobinas son muy efectivas en la creación y estabilización de espumas, por ejemplo en productos alimenticios aireados, como helados. Sin embargo, una desventaja importante de las hidrofobinas es que actualmente no están fácilmente disponibles en grandes cantidades, y además son caras.

Breve descripción de la invención

Sorprendentemente, hemos encontrado que partículas gelificadas que tienen una dimensión más larga superior a 0,1 µm y que están revestidas con hidrofobina son agentes espumantes efectivos, de modo que pueden utilizarse cantidades menores de hidrofobina sin afectar negativamente la formación de espuma y las propiedades de estabilización. La cantidad de hidrofobina requerida puede ser reducida por un factor de hasta 10 veces. Otras ventajas de la invención incluyen:

- las partículas gelificadas son fáciles de producir;
- puede formarse fácilmente una espuma usando las partículas gelificadas revestidas con hidrofobina;
- la espuma es muy estable.

Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención se refiere a partículas gelificadas que tiene una dimensión más larga superior a 0,1 µm que están revestidas con hidrofobina.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición aireada, preferentemente un producto alimenticio, que comprende partículas gelificadas que tienen una dimensión más larga superior a 0,1 µm que están revestidas con hidrofobina.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición aireable que comprende partículas gelificadas que tienen una dimensión más larga superior a 0,1 µm y menor de 1 mm, preferentemente menor de 100 µm, que están revestidas con hidrofobina.

En un cuarto aspecto la invención se refiere a un procedimiento para producir una composición aireada, el procedimiento comprende airear una composición de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

Preferentemente las partículas gelificadas son de calidad alimentaria.

Preferentemente las partículas gelificadas comprenden un polisacárido gelificante como agar, carragenanos, pectina, alginato, gelano y/o almidones gelificables. Más preferentemente, las partículas gelificadas comprenden un polisacárido gelificante como agar, carragenanos, pectina, alginato y gelano.

Preferentemente las partículas gelificadas tienen una dimensión más larga de 0,5 µm a 100 µm.

Preferentemente las partículas gelificadas están revestidas con hidrofobina en una cantidad de desde 0,1 a 50% en peso basado en el peso total de las partículas.

Preferentemente, la hidrofobina es una hidrofobina de clase II, más preferentemente la hidrofobina es HFB II de *Trichoderma reesei*.

Descripción detallada de la invención

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

$$X_n\text{-C-}X_{5\text{-}9}\text{-C-C-}X_{11\text{-}39}\text{-C-}X_{8\text{-}23}\text{-C-}X_{5\text{-}9}\text{-C-C-}X_{6\text{-}18}\text{-C-}X_m \quad \text{(SEC ID No. 1)}$$

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) en la secuencia conservada son parte de puentes disulfuro. En el contexto de la presente invención, el término hidrofobina tiene un significado más amplio que incluye proteínas funcionalmente equivalentes que muestran aún la

característica de auto-ensamblaje en una interfaz hidrófoba- hidrófila, lo que resulta en una película de proteína, como proteínas que comprenden la secuencia:

$$X_n\text{-}C\text{-}X_{1\text{-}50}\text{-}C\text{-}X_{0\text{-}5}\text{-}C\text{-}X_{1\text{-}100}\text{-}C\text{-}X_{1\text{-}100}\text{-}C\text{-}X_{1\text{-}50}\text{-}C\text{-}X_{0\text{-}5}\text{-}C\text{-}X_{1\text{-}50}\text{-}C\text{-}X_m \qquad \text{(SEQ ID No. 2)}$$

o partes de las mismas que muestran aún la característica de auto-ensamblaje en una interfaz hidrófoba- hidrófila, lo que resulta en una película de proteína. De acuerdo con la definición de la presente invención, el auto-ensamblaje puede ser detectado mediante 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 et al., 1998, Biophys J. 74: 2059-68).

La formación de una película puede establecerse mediante la incubación de una hoja de Teflón en la solución de proteína seguido por al menos tres lavados con agua o tampón (Wosten et al, 1994, EMBO J. 13: 5848-54). La película de proteína puede ser visualizada por cualquier procedimiento adecuado, como etiquetado con un marcador fluorescente o por el uso de anticuerpos fluorescentes, como está bien establecido en la técnica, m y n suelen tener valores de 0 a 2000, pero más generalmente m y n en total son menores de 100 o 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 son generalmente clasificadas como de clase I o clase II. Ambos tipos han sido identificados en hongos como proteínas secretadas que se auto-ensamblan en interfaces hidrófilas en películas anfipáticas. Las agrupaciones de hidrofobinas de clase I son en general relativamente insolubles mientras que las hidrofobinas de clase II se disuelven fácilmente en una variedad de disolventes. Preferentemente, la hidrofobina es una hidrofobina de clase II. Preferentemente, la hidrofobina es soluble en agua, por lo que se entiende que es al menos 0,1% soluble en agua, preferentemente al menos 0,5%. Por al menos 0,1% soluble se entiende que no precipita hidrofobina cuando 0,1 g de hidrofobina en 99,9 ml de agua se someten a centrifugación a 30.000 g durante 30 minutos a 20 °C.

Se han identificado también proteínas similares a hidrofobinas (por ejemplo, “chaplinas”) en bacterias filamentosas, como *Actinomycete* y *Streptomyces* sp. (WO01/74864; Talbot, 2003, Curr Biol, 13. R696-R698). Estas proteínas bacterianas a diferencia de las hidrofobinas de hongos, pueden formar sólo hasta un puente disulfuro ya que puede tener sólo dos residuos de cisteína. Estas proteínas son un ejemplo de equivalentes funcionales a hidrofobinas que tienen las secuencias consenso mostradas en las SEQ ID Nos. 1 y 2, y están dentro del alcance de la presente invención.

Las hidrofobinas pueden obtenerse por extracción a partir de fuentes nativas, como hongos filamentosos, por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, las hidrofobinas pueden obtenerse mediante el cultivo de hongos filamentosos que secretan hidrofobina en el medio de cultivo o por extracción del micelio del hongo con etanol 60%. Es particularmente preferido aislar las hidrofobinas de organismos huéspedes que naturalmente secretan hidrofobinas. Los huéspedes preferidos son hifomicetos (por ejemplo, Trichoderma), basidiomicetos y ascomicetos. Son huéspedes particularmente preferidos los organismos de calidad alimentaria, como *Cryphonectria parasitica*, que secreta una hidrofobina denomina criparina (MacCabe y Van Alfen 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 5431-5435).

Como alternativa, las hidrofobinas pueden obtenerse por el uso de tecnología recombinante. Por ejemplo, las células huésped, por lo general microorganismos, pueden ser modificadas para expresar hidrofobinas y las hidrofobinas pueden aislarse y utilizarse de acuerdo con la presente invención. Las técnicas para la introducción de construcciones de ácido nucleico que codifican hidrofobinas en las células huésped son bien conocidas en la técnica. Se han clonado más de 34 genes que codifican para hidrofobinas, de más de 16 especies de hongos (ver por ejemplo el documento WO96/418 que da la secuencia de hidrofobinas identificada en *Agaricus bisporus*, y Wosten 2001, Annu Rev. Microbiol 55: 625-646). La tecnología recombinante también puede utilizarse para modificar secuencias de hidrofobina o sintetizar hidrofobinas novedosas que tienen propiedades deseadas/mejoradas.

Comúnmente, una célula huésped u organismo apropiado se transforma mediante una construcción de ácido nucleico que codifica la hidrofobina deseada. La secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido puede insertarse en un vector de expresión adecuado que codifica los elementos necesarios para la transcripción y traducción y de tal manera que será expresado en condiciones adecuadas (por ejemplo, en la orientación apropiada y el marco de lectura correcto y con la orientación y secuencias de expresión adecuadas). Los procedimientos requeridos para la construcción de estos vectores de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Puede usarse un número de sistemas de expresión para expresar la secuencia de codificación del polipéptido. Estos incluyen, entre otros, bacterias, hongos (incluyendo levaduras), sistemas de células de insectos, sistemas de cultivo de células de plantas y plantas todos transformados con los vectores de expresión apropiados. Los huéspedes preferidos son aquellos que se consideran de calidad alimentaria, ‘generalmente considerados como seguros’ (GRAS).

Las especies de hongos apropiadas, incluyen levaduras como (entre otras) las de los géneros *Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Hansenula, Candida, Schizo saccharomyces* y similares, y especies filamentosas como (entre otras) las de los géneros *Aspergillus, Trichoderma, Mucor, Neurospora, Fusarium*, y similares.

Las secuencias que codifican las hidrofobinas son preferentemente al menos 80% idénticas a nivel de aminoácidos con respecto a una hidrofobina identificada en la naturaleza, más preferentemente al menos 95% o 100% idénticas. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden hacer sustituciones conservadoras u otros cambios de aminoácidos que no reducen la actividad biológica de la hidrofobina. A los efectos de la invención, estas hidrofobinas que poseen este nivel elevado de identidad con respecto a una hidrofobina que existe naturalmente también son comprendidas dentro del término “hidrofobinas”.

Las hidrofobinas pueden ser purificadas a partir de medios de cultivo o extractos celulares mediante, por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento WO01/57076 que comprende la adsorción de la hidrofobina presente en una solución que contiene hidrofobina a la superficie y a continuación poner en contacto la superficie con un tensioactivo, como Tween 20, para la elución de 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.

La hidrofobina se añade en una forma y una cantidad tal que está disponible para estabilizar la fase gaseosa, es decir, la hidrofobina es introducida deliberadamente en el producto con el fin de aprovechar sus propiedades de estabilización de espuma. Por consiguiente, cuando están presentes o se añaden ingredientes que contienen contaminantes fúngicos, que pueden contener polipéptidos hidrofobina, esto no constituye una adición de hidrofobina en el contexto de la presente invención.

Comúnmente, la hidrofobina se añade al producto de la invención en una forma aislada, por lo general, al menos parcialmente purificada, como al menos 10% pura, basado en el peso de los sólidos. Por “forma aislada”, queremos decir que la hidrofobina no se agrega como parte de un organismo de origen natural, como un hongo, que naturalmente expresa hidrofobinas. En cambio, la hidrofobina normalmente se ha extraído de una fuente de origen natural u obtenido por expresión recombinante en un organismo huésped.

Partículas gelificadas

Las partículas gelificadas pueden fabricarse adecuadamente a partir de polisacáridos gelificantes, como agar, carragenanos, pectina, alginatos, gelano y almidones gelificables, preferentemente agar, carragenanos, pectina, alginato y gelano. También es posible que se utilicen mezclas de más de un polímero para formar las partículas gelificadas. Las partículas gelificadas por lo general contienen una cantidad significativa de agua además de los polisacáridos. Las partículas fabricadas a partir de polisacáridos gelificados tiene la ventaja de que son de calidad alimentaria, es decir, son adecuadas para su uso en alimentos. Esto es definido generalmente por instituciones gubernamentales como la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) de los EE.UU. o la OMS (Organización Mundial de la Salud).

Las partículas gelificadas pueden ser producidas por cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, de la siguiente manera: El polímero se disuelve, usualmente en agua o en un medio acuoso. Las condiciones se controlan a continuación de modo que se forman partículas de gel a partir de esta solución. Esto puede lograrse mediante el uso de una baja concentración de polímero, o mediante la formación de una red completa de gel y posteriormente la ruptura, por ejemplo, mediante cizallamiento del gel durante o después del procedimiento de ajuste. La suspensión resultante puede ser centrifugada para recolectar las partículas. Para algunos polímeros, como kappa-carragenanos, es posible alterar las condiciones iónicas para obtener partículas gelificadas, como es bien conocido por las personas expertas en la técnica.

En una realización preferida, las partículas son fabricadas de agar, kappa-carragenano, pectina o gelano. El agar es un polisacárido ramificado obtenido de las paredes celulares de algunas especies de algas o algas rojas. También es conocido como agarosa, kanten o agal-agal (agar de Ceilán). Químicamente, el agar es un polímero formado por subunidades de azúcar galactosa. Los carragenanos son una familia de polisacáridos sulfatados lineales extraídos de algas rojas. La pectina es un polisacárido lineal que consiste en un esqueleto de unidades de ácido galacturónico y éster metílico de ácido galacturónico, y puede ser extraída de la cáscara de cítricos y la pulpa de la manzana. El gelano es un exopolisacárido bacteriano de *Sphingomonas elodea*.

Las partículas tienen una dimensión más larga de al menos 0,1 µm. Por dimensión más larga nos referimos a la dimensión recta mayor que puede medirse sobre la partícula. La dimensión de las partículas puede ser determinada por cualquier técnica conocida comúnmente, como, por ejemplo, microscopía electrónica, dispersión de luz, o microscopía de fuerza atómica. La dimensión más larga de las partículas es preferentemente de al menos 0,5 µm, más preferentemente de al menos 1 µm. Preferentemente, la dimensión más larga de las partículas es no mayor que 500 µm, más preferentemente no mayor que 100 µm, con la mayor preferencia no mayor que 10 µm. Hemos encontrado que partículas de este tamaño, cuando están revestidas con hidrofobina, son más efectivas en la producción y/o estabilización de espumas.

Las partículas pueden ser de cualquier forma, por ejemplo, esféricas, en forma de placa o alargadas, por ejemplo, fibras. No es necesario que las partículas sean uniformes en forma, o que todas las partículas sean del mismo tamaño y forma.

Las moléculas de hidrofobina son absorbidas/unidas/ligadas sobre las partículas, revistiéndolas de esta manera. Por "revestido con hidrofobina", se entiende que algo de hidrofobina está unida a las partículas, pero no es necesario que toda la superficie de la partícula esté revestida. Preferentemente las partículas están revestidas con hidrofobina en una cantidad de desde 0,1 a 50% en peso, basado en el peso total de las partículas, más preferentemente de al menos 0,5%, y como máximo 25%. Sin ánimo de ser limitado por la teoría, creemos que las partículas revestidas se adsorben en la superficie de burbujas de gas y por lo tanto las estabilizan. Dado que las partículas son mucho más grandes que el tamaño de las moléculas de hidrofobina, las partículas revestidas con hidrofobina se comportan de manera diferente a las moléculas de hidrofobina solas. Sin embargo, si la cantidad de hidrofobina que reviste las partículas es demasiado grande, el beneficio, en comparación con la hidrofobina sola, se reduce. Las partículas fabricadas de polisacáridos gelificados contienen una cantidad sustancial de agua (~90-99% en peso de la partícula), por lo que se prefiere que la relación de la cantidad de hidrofobina a la cantidad de polisacárido seco esté en el intervalo de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 5:1, preferentemente aproximadamente 10:1.

El medio mediante el cual la hidrofobina se une a la partícula no es crítico, y el revestimiento puede lograrse por cualquier medio adecuado, por ejemplo por medio de la atracción electrostática entre las partículas y la hidrofobina en la que las partículas y la hidrofobina llevan cargas netas opuestas. Por ejemplo, las partículas pueden estar cargadas negativamente y la hidrofobina cargada positivamente (o viceversa). La carga sobre la hidrofobina depende del pH de la solución en relación con el punto isoeléctrico de la hidrofobina. Por ejemplo, la hidrofobina HFB II de *Trichoderma reesei* tiene un punto isoeléctrico de pH 4,8. Por debajo de este pH, las moléculas de hidrofobina están cargadas positivamente y por lo tanto son atraídas a partículas cargadas negativamente, revistiéndolas de esta manera. La interacción entre una partícula cargada y una hidrofobina depende de la hidrofobina en particular y la naturaleza de la partícula. Bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica y dependiendo del tipo de partícula, las partículas pueden ser revestidas con demasiada hidrofobina. En este caso, la efectividad de las partículas es reducida, y en algunos casos puede ser perjudicial para el rendimiento de la hidrofobina. La efectividad de las partículas puede ser restaurada haciendo los ajustes apropiados a las condiciones del medio mediante, por ejemplo, el cambio del pH y/o la fuerza iónica de acuerdo con principios bien conocidos de química física.

Composiciones aireadas y aireables

El término "composición aireada" o "espuma" en el contexto de la presente invención, significa una composición en la que se ha incorporado gas intencionalmente. El término "composición aireable" o "mezcla" se refiere a una composición en la que puede incorporarse gas, por ejemplo, mediante batido. El gas puede ser cualquier gas, pero se prefiere, particularmente en el contexto de productos alimenticios, un gas de calidad alimentaria como aire, nitrógeno, óxido nitroso o dióxido de carbono. El grado de aireación se define en términos de "incorporación de aire", que se define en términos de volumen como incorporación de aire % =

[(volumen de composición aireada – volumen inicial de la mezcla) / volumen inicial de la mezcla] x 100

en la que los volúmenes de composición aireada y mezcla no aireada son los volúmenes de una masa fija de composición aireada y mezcla inicial, respectivamente.

La incorporación de aire de una composición aireada puede variar dependiendo de las características del producto deseadas. Preferentemente, la incorporación de aire es de al menos 10%, más preferentemente de al menos 25 o 50%. Preferentemente, la cantidad de incorporación de aire es menor de 400%, más preferentemente menor de 300 o 200%. Para los productos de pastelería congelados aireados, la incorporación de aire es con la mayor preferencia de 70 a 150%. Para la crema batida o crema no láctea y productos relacionados, la incorporación de aire es con la mayor preferencia de 100 a 160%.

Las composiciones aireadas de la invención son estables, lo que significa que mantienen su forma y propiedades en el tiempo. La estabilidad de la espuma se define en términos del porcentaje de incorporación de aire inicial que permanece en un momento dado después de la aireación.

Otra realización de la presente invención es una composición aireable que comprende partículas como se definió anteriormente. Las composiciones aireables dentro del alcance de esta invención comprenden agua y opcionalmente una fase grasa emulsionada. Las composiciones aireables incluyen mezclas que son posteriormente aireadas para formar el producto final, como postres, mousses y productos de pastelería congelados aireados, y crema batida o crema no láctea.

Comúnmente, la composición aireada/aireable contendrá al menos 0,001% en peso de hidrofobina (basado en el peso total del producto), preferentemente al menos 0,005% en peso, más preferentemente al menos 0,01, tal como aproximadamente 0,05% en peso. Comúnmente, el producto contendrá menos de 1% en peso de hidrofobina, más preferentemente menos de 0,1% en peso. Hemos encontrado que cuando las partículas revestidas se utilizan para

crear y estabilizar espumas, la cantidad de hidrofobina requerida se reduce. La hidrofobina puede ser de una sola fuente o de una pluralidad de fuentes, por ejemplo una mezcla de dos o más hidrofobinas diferentes.

Comúnmente, la composición aireada/aireable contendrá al menos 0,1% en peso de partículas (basado en el peso total del producto), preferentemente al menos 0,5% en peso, como aproximadamente 1% en peso. Comúnmente, la composición contendrá menos del 10% en peso de partículas, más preferentemente menos del 5% en peso.

Las composiciones aireadas y aireables de la invención comprenden agua. El contenido de agua puede variar (dependiendo del nivel de los demás ingredientes), y es comúnmente 5 - 99,5% en peso, basado en el peso total del producto, preferentemente 20 - 95% en peso.

Las composiciones aireadas y aireables de la invención pueden comprender aceite/grasa. Los aceites/grasas adecuados incluyen aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de canola (aceite de colza), aceite de oliva, aceite de palma, aceite de maní (aceite de cacahuete), aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de girasol, grasa y aceites de pescado (por ejemplo, aceite de hígado de bacalao). Además, las composiciones aireadas y aireables puede comprender otros ingredientes. Los ingredientes de uso común para productos alimenticios son emulsionantes, saborizantes, agentes colorantes, conservantes, proteínas como proteínas lácteas o proteína de soja; azúcares, por ejemplo, sacarosa, fructosa, dextrosa, lactosa, jarabes de maíz, alcoholes de azúcar, purés, extractos, trozos o jugo de frutas o vegetales, y estabilizadores o espesantes, como polisacáridos, por ejemplo, goma garrofín, goma guar. Las composiciones aireables pueden incluir todos los ingredientes restantes requeridos para fabricar el producto alimenticio de tal manera que la composición esté lista para ser aireada a fin de formar un producto aireado.

Las composiciones aireadas y aireables de la invención pueden ser productos que normalmente se almacenan y/o sirven a temperatura ambiente (productos a temperatura ambiente), temperatura de refrigeración (por ejemplo, alrededor de 4 °C) o congelados (por debajo de 0 °C, comúnmente aproximadamente -18 °C). En una realización particularmente preferida la composición aireada es un producto de confitería congelado aireado como crema helada o yogur congelado. En otra realización, la composición es una mousse, crema batida o crema no láctea.

La composición aireada de acuerdo con la presente invención puede ser producida a partir de una composición aireable mediante cualquier procedimiento de aireación adecuado, como batido, aspersión, etc.

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Si no se indica lo contrario los porcentajes se basan en peso.

Ejemplo 1: Preparación de partículas de agar

Se calentó agua desionizada a más de 95 °C y se mantuvo cubierta con el fin de evitar la evaporación. Se añadió lentamente 0,05% de agar en polvo (Luxara 1253 de Arthur Branwell) y se dejó disolver. La solución se calentó a continuación durante al menos 30 minutos para asegurar que el agar se había disuelto por completo. La mezcla se refrigeró a continuación a temperatura de enfriamiento (alrededor de 5 °C) y se almacenó durante un mínimo de 24 horas de modo que el agar gelificara. Debido a que la concentración de agar era baja, no pudo formar una red de gel continua y en su lugar se produjeron partículas de gel. Las partículas fueron recolectadas por centrifugación a 60.000 rpm (ultracentrífuga Beckman L8-M) durante 30 minutos a 20 °C en un rotor de 8 x 50cm^3 Ti70 L8-70M. Quinientos centímetros cúbicos de solución inicial (es decir, que contenían 0,25 g de agar) produjeron aproximadamente 2,5-3 g de partículas. El contenido de agua de las partículas fue de aproximadamente 92%.

Las partículas recuperadas por centrifugación fueron redispersadas para preparar una suspensión de partículas de agar 2% en peso en agua desionizada de acuerdo con dos procedimientos diferentes:

a) redispersión suave: se colocó una barra de agitación en la suspensión, y se mezcló durante 48 horas usando un matraz rotatorio a velocidad media. La microscopía mostró que esto dio como resultado partículas polidispersas, generalmente en forma de placas con dimensiones mayores que abarcan desde ~ 0,5 hasta 100 µm

b) redispersión por ultrasonicación: se redispersaron 15 ml de solución por medio de una sonda ultrasónica Branson durante 2 minutos a una amplitud de 20%. La microscopía de las partículas mostró fibrillas individuales y grupos de fibrillas del orden de 5 nm de espesor, con dimensiones mayores de aproximadamente 0,5 - 2 µm.

Ejemplo 2: Preparación de espumas

La hidrofobina HFBII se obtuvo de VTT Biotechnology, Finlandia. La misma había sido purificada a partir de *Trichoderma reesei* esencialmente como se describe en el documento WO00/58342 y Linder et al, 2001, Biomacromolecules 2: 511-517. Se prepararon soluciones de HFB II en ácido cítrico 0,05 M, y cada una se mezcló con un volumen igual de la suspensión de partículas de agar preparada en el Ejemplo 1a). Las soluciones resultantes tenían concentraciones de HFB de 0,005, 0,01 y 0,04% en peso y pHs de aproximadamente 2,4. Las mezclas (volumen inicial 40 cm^3) fueron aireadas durante un minuto con una batidora eléctrica manual, y se midió el

volumen de las espumas resultantes. Se airearon también de la misma manera soluciones de hidrofobina que no contenían partículas de agar. La Tabla 1 muestra la cantidad de incorporación de aire como una función de la concentración de hidrofobina, con y sin partículas de agar.

Tabla 1

	T = 0		Después de 1 día de almacenamiento	
Concentración de HFB	Incorporación de aire - sin partículas (%)	Incorporación de aire - con partículas (%)	Incorporación de aire – sin partículas (%)	Incorporación de aire - con partículas (%)
0,005	20	65	10	50
0,01	30	140	15	130
0,04	245	235	210	200

La Tabla 1 muestra que, en ausencia de las partículas de agar, se logró una buena incorporación de aire con hidrofobina 0,04%, pero a niveles de hidrofobina de 0,005% y 0,01% la incorporación de aire fue pequeña. Sin embargo, en presencia de las partículas, se produjo una buena incorporación de aire con niveles de hidrofobina tan bajos como 0,005%. (La incorporación de aire máxima obtenible fue limitada por el tamaño del recipiente en el que se airearon las soluciones, lo que explica por qué hay poca diferencia entre las incorporaciones de aire obtenidas con y sin partículas a HFB 0,04%). Estos resultados muestran que la adición de partículas de agar ha incrementado la cantidad de espuma producida a las concentraciones más bajas de hidrofobina.

La Tabla 1 muestra también cómo cambia la incorporación de aire después del almacenamiento durante 1 día a temperatura de enfriamiento. Las espumas estabilizadas con partículas de agar más 0,005 o 001% de hidrofobina retuvieron más volumen, es decir, las espumas fueron más estables, que las espumas en las que no estaban presentes las partículas.

Las imágenes de microscopía electrónica de crio-barrido de la superficie de una burbuja de gas en una espuma producida a partir de hidrofobina 0,03% en presencia de partículas de agar 1% preparadas por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1a) indicaron que estaban presentes partículas de agar en la interfaz líquido/gas.

Ejemplo 3: Preparación de partículas y espumas sin centrifugación

Se preparó una solución de agar como se describe en el Ejemplo 1, excepto que no se realizó un procesamiento adicional en las partículas después del almacenamiento en frío. Se prepararon soluciones de HFB II, se mezclaron con estas partículas (concentración final de HFB 0,005 y 0,01% en peso) y se airearon como se describió en el Ejemplo 2 (volumen inicial 20 cm^3). Los resultados se muestran en la Tabla 2. A 0,005% y 0,01% de hidrofobina, se produjo solamente una incorporación de aire pequeña. Sin embargo, en presencia de las partículas de agar, la incorporación de aire fue similar a la producida por HFB sola a una concentración de 0,03%. De este modo, la adición de partículas de agar permite una reducción de aproximadamente seis veces en la cantidad de hidrofobina que se requiere para producir un volumen de espuma determinado. Los volúmenes de espuma se registraron también después del almacenamiento durante 1 mes a temperatura de enfriamiento, y se encontró que el volumen no había disminuido significativamente, es decir, la espuma se mantuvo estable.

Tabla 2

Concentración de HFB (% en peso)	Incorporación de aire - sin partículas (%)	Incorporación de aire - con partículas (%)
0,005	20	55
0,005 1 mes de almacenamiento	15	50
0,01	35	75
0,03	60	

Ejemplo 4: Partículas de gel cizalladas

Se calentó agua desionizada por encima de 95 °C y se mantuvo cubierta con el fin de evitar la evaporación. Se añadió lentamente agar en polvo 2% al agua caliente y se dejó disolver. La solución se calentó a continuación durante al menos 30 minutos para asegurar que el agar se había disuelto por completo. La solución se enfrió a

temperatura ambiente para permitir la formación del gel. Se vertieron 2 g de este gel en 100 ml de agua desionizada y se rompieron mediante el uso de un dispositivo Silverson (cabezal de desintegración de propósito general, 20 segundos). La microscopía óptica mostró que esto dio como resultado la formación de partículas polidispersas con dimensiones mayores de desde aproximadamente 0,5 a 300 µm. Se prepararon soluciones de HFB II (0,005% en peso), se mezclaron con estas partículas y airearon como se describe en el Ejemplo 2 (volumen inicial 20 cm^3). Nuevamente, se produjo más espuma en presencia de las partículas de agar (ver Tabla 3).

Ejemplo 5: Partículas de gelano

Las partículas de gelano (Kelcogel F de CP Kelco) se prepararon utilizando los procedimientos descritos en (a) Ejemplo 3 y (b) Ejemplo 4, utilizando las mismas concentraciones de polímero. Se prepararon soluciones de HFB II (concentración final 0,005%) en ácido cítrico, se mezclaron con estas partículas y airearon como se describe en el Ejemplo 2 (volumen inicial 20 cm^3). Nuevamente, se produjo más espuma en presencia de partículas de gelano (ver Tabla 3).

Ejemplo 6: Partículas de pectina

Se calentó agua desionizada por encima de 95 °C y se mantuvo cubierta con el fin de evitar la evaporación. Se añadió lentamente pectina en polvo de bajo metoxi 0,5% (pectina Genu LM101 DE 36 de CP Kelco) al agua caliente y se dejó disolver. La solución se calentó a continuación durante al menos 30 minutos para asegurar que la pectina se había disuelto por completo. La mezcla se refrigeró a continuación a temperatura de enfriamiento (aproximadamente 5 °C) y se vertió en una solución de $CaCl_2$ 1%. Se recuperaron 2 g de gel y se vertieron en agua destilada. Como el gel de pectina se rompe con facilidad, la solución fue simplemente sacudida enérgicamente para formar partículas gelificadas de pectina. Se prepararon soluciones de HFB II (concentración final 0,005% en peso) en ácido cítrico, se mezclaron con las partículas y airearon como se describió en el Ejemplo 2 (volumen inicial 20 cm^3). Nuevamente, se produjo más espuma en presencia de las partículas de pectina (ver Tabla 3).

Ejemplo 7: Partículas de κ-carragenano

a) Partículas preparadas usando el procedimiento del Ejemplo 3: Se calentó agua desionizada por encima de 95 °C y se mantuvo cubierta con el fin de evitar la evaporación. Se añadió lentamente κ-carragenano en polvo 0,05% (Código: X6960 de Hercules) y KCl 0,05 M al agua caliente y se dejó disolver. La solución se calentó a continuación durante al menos 30 minutos para asegurar que el κ-carragenano se había disuelto por completo. La mezcla se refrigeró a continuación a temperatura de enfriamiento (aproximadamente 5 °C) durante un mínimo de 24 horas. La muestra se almacenó a temperatura de enfriamiento hasta que fue necesario. No se realizó un tratamiento posterior en las partículas.

b) Partículas preparadas usando el procedimiento del Ejemplo 4: Se calentó agua desionizada por encima de 95 °C y se mantuvo cubierta con el fin de evitar la evaporación. Se añadió lentamente κ-carragenano en polvo 2% y KCl 2M al agua caliente y se dejó disolver. La solución se calentó a continuación durante al menos 30 minutos para asegurar que el κ-carragenano se había disuelto por completo. Se refrigeró la solución para enfriar la temperatura (aproximadamente 5 °C) a fin de permitir la formación del gel. Se vertió 2 g de este gel en 100 ml de agua desionizada y se rompió mediante el uso de un dispositivo Silverson (cabezal de desintegración de propósito general, 20 segundos).

Se disolvió HFB II en una solución tampón de citrato de sodio y ácido cítrico. Las soluciones de HFB II se mezclaron con las suspensiones de κ-carragenano para dar una concentración final de HFB de 0,005% en peso y un pH de 3,8, y a continuación se airearon como se describió en el Ejemplo 2 (volumen inicial 20 cm^3). Nuevamente se produjo más espuma en presencia de partículas de κ-carragenano (fabricadas por cualquier procedimiento) que en su ausencia (ver Tabla 3).

Tabla 3

Tipo de partícula	Incorporación de aire – sin partículas (%)	Incorporación de aire - con partículas (%)
Gel de agar cizallado	10	25
Gel de gelano débil	15	35
Gel de gelano cizallado	15	35
Pectina de bajo metoxi	20	45
Gel de κ-carragenano débil	10	25
Gel de κ-carragenano cizallado	10	20

Ejemplo 8: Efecto del pH

Se repitió el Ejemplo 3 (HFB 0,005% en peso), excepto que se varió el pH: 2,4, 3,4, 4,0, 4,4 y 6,2. A pHs por debajo del punto isoeléctrico de HFB II (pH 4,8) la incorporación de aire fue mayor cuando las partículas de agar estaban presentes. Sin embargo, a pH 6,2, por encima del punto isoeléctrico, no hubo diferencia en la incorporación de aire entre las muestras con y sin partículas de agar. Esto se debe al hecho de que cuando el pH está por encima del punto isoeléctrico, la hidrofobina no es capaz de revestir las partículas, ya que también está cargada negativamente.

Las diversas características y realizaciones de la presente invención, referidas a las secciones individuales anteriores se aplican, según sea apropiado, a otras secciones, cambiando lo que corresponda cambiar. Por lo tanto, las características especificadas en una sección pueden ser combinadas con características especificadas en otras secciones, según corresponda. Diversas modificaciones y variaciones de los productos y procedimientos de la invención descritos serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. Aunque la invención ha sido descrita en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe ser excesivamente limitada a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que las diversas modificaciones de los modos de llevar a cabo la invención descritos, que son evidentes para los expertos en los campos relevantes, estén dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

Ejemplo 9

Se prepararon dos soluciones que consisten en una solución de agar 0,05% en ácido cítrico 25 mM por el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. La solución de agar se mezcló con un volumen igual de solución de hidrofobina 0,04% o 0,08% en ácido cítrico 25 mM. Las mezclas fueron aireadas a continuación utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. El tiempo de aireación fue de 1 minuto. Se registró la incorporación de aire de la solución con espuma. Estos datos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Comparación de incorporaciones de aire para espumas de hidrofobina elaboradas con y sin agar en ácido cítrico 25 mM.

Concentración de HFBII	Concentración de agar	Incorporación de aire (%)
0,02%	0%	10
0,02%	0,025%	25
0,04%	0%	40
0,04%	0,025%	250

Las espumas (incluyendo el líquido sin espuma) se incorporaron a continuación suavemente en un mismo peso de leche en polvo descremada (SMP) 20%, sacarosa 40% y solución de goma xantano 0,8%. Después de la incorporación en la mezcla de SMP/sacarosa/goma xantano las muestras que contenían agar aún tenían incorporaciones de aire mayores que sus controles respectivos.

Las espumas producidas también mostraron buena estabilidad al almacenamiento a temperaturas de enfriamiento.

Ejemplo 10

Las espumas con hidrofobina/partículas pudieron ser usadas en mayonesa como un reemplazo de grasa para crear una mayonesa baja en grasa con atributos cremosos. El procedimiento consistió en fabricar una espuma a partir de HFBII 0,05% + agar 0,05% en una solución de ácido cítrico 25 mM (usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 10) e incorporando a continuación la espuma en la mayonesa mediante mezclado suave usando un mezclador Hobart. Se pesaron los productos finales para verificar la cantidad final de espuma contenida en la mayonesa. Las espumas de agar-hidrofobina soportan muy bien el procedimiento de incorporación ya que volúmenes de espuma iniciales de 10% y 15% incorporados llevaron a productos finales que contenían 7% y 10% de espuma, lo que es comparable al rendimiento de la hidrofobina pura. No obstante, la cantidad de hidrofobina requerida para elaborar 500 ml de mayonesa aireada 10% puede reducirse hasta 7 veces por adición de agar 0,025%.

Ejemplo 11: Preparación de un producto “tipo sorbete”.

Se preparó un producto sorbete de la siguiente manera. Se preparó un gel de agar cizallado utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Se prepararon dos mezclas. Una mezcla comprendía una solución de hidrofobina 0,025% en ácido cítrico 0,2% y sacarosa 25%. Esta fue la mezcla de control. La segunda mezcla contenía hidrofobina 0,025%, ácido cítrico 0,2%, sacarosa 25% y 1% de partículas de gel cizalladas. Esta fue la mezcla de prueba. Se generó espuma en las mezclas usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. El tiempo

de generación de espuma fue de 3 minutos. Las incorporaciones de aire alcanzadas para los dos conjuntos de mezclas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Incorporaciones de aire para las espumas preparadas en el Ejemplo 11

Concentración de HFBII (%)	Concentración de partículas de agar (%)	Incorporación de aire (%)
0,025	0	116
0,025	1	129

Se alcanzó una incorporación de aire mayor para la mezcla de prueba.

Las mezclas fueron congeladas con cizalladura usando el procedimiento siguiente. Se mezcla a baja velocidad durante 1 minuto, se mezcla a alta velocidad durante 1 minuto, se enciende la fuente de refrigeración y se continúa mezclando a alta velocidad durante 3 minutos. Finalmente se mezcla a baja velocidad hasta que el producto ha alcanzado una temperatura de -5 °C a -6 °C. Se registra el peso de un volumen conocido de producto congelado. Las incorporaciones de aire finales alcanzadas en el Ejemplo 11 se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Incorporaciones de aire finales para las espumas congeladas preparadas en el Ejemplo 11

Concentración de HFBII (%)	Concentración de partículas de agar (%)	Incorporación de aire (%)
0,025	0	49,7
0,025	1	68,7

Los datos de la Tabla 6 muestran que pueden lograrse incorporaciones de aire mayores para un producto congelado que contiene hidrofobina más partículas de agar

REIVINDICACIONES

1. Partículas gelificadas que tienen una dimensión más larga superior a 0,1 µm y menor de 1 mm que están revestidas con hidrofobina.

2. Partículas de acuerdo con la reivindicación 1 que son de calidad alimentaria.

3. Partículas de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprenden agar, carragenanos, pectina, alginato y gelano.

4. Partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tienen una dimensión más larga de 0,5 µm a 100 µm.

5. Partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que están revestidas con una cantidad de 0,1 a 50% en peso de hidrofobina, basado en el peso total de las partículas.

6. Partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en las que la hidrofobina es una hidrofobina clase II.

7. Partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en las que la hidrofobina es HFB II de *Trichoderma reesei*.

8. Una composición aireada que comprende partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Una composición aireada de acuerdo con la reivindicación 8 que contiene menos de 0,1% en peso de hidrofobina, basado en el peso total de la composición.

10. Una composición aireada de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 que contiene de 0,1 a 10% en peso de partículas, basado en el peso total de la composición.

11. Una composición aireada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que es un producto alimenticio.

12. Una composición aireable que comprende partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

13. Un procedimiento para producir una composición aireada, el procedimiento comprende la aireación de una composición de acuerdo con la reivindicación 12.