

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 100**

51 Int. Cl.:

A23G 9/38 (2006.01)

A23G 9/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06022065 .4**

96 Fecha de presentación: **20.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1917865**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Péptidos estructurantes del hielo de origen láctico**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2012

73 Titular/es:
**NESTEC S.A.
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:
**Wille, Hans-Juergen Erich;
Vieira, Josélio, Batista;
de Kruif, Cornelius, Gijsbertus;
Floris, Theodorus, Arnoldus, Gerardus y
Slangen, Karel, Joseph**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 382 100 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

Péptidos estructurantes del hielo de origen láctico

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con la utilización de péptidos de origen láctico como agentes estructurantes del hielo y con su utilización en la elaboración de productos congelados.

10 Antecedentes de la invención

15 Las proteínas estructurantes del hielo (ISP, del inglés *ice-structuring proteins*) o, como se denominan de forma abusiva, proteínas anticongelantes (AFP, del inglés *anti-freeze proteins*) están presentes de forma natural en una serie de especies que son susceptibles de sufrir daños causados por la congelación, es decir, en especies que se encuentran en ambientes bajo cero. Han evolucionado en la naturaleza para ayudar a diferentes organismos como peces, insectos, plantas y bacterias, a sobrevivir en estos ambientes fríos. Hasta la fecha, se ha considerado que los peces procedentes de climas fríos son la fuente principal de ISP (véase por ejemplo las patentes WO 9702343 (Unilever), PE 0788745 (Nestlé)). Las fuentes vegetales de ISP también se describen, por ejemplo, en las patentes PE 0959689 (Unilever), PE 0918863 B1 (Unilever), PE 1049713 (Unilever), PE 1049783 B1 (Unilever), PE 1276763 (Unilever). Además, la patente PE 1240188 (Unilever) describe ISP aisladas a partir de fuentes bacterianas procedentes de ambientes con temperaturas bajas. La patente WO 9804147 (Unilever) describe el aislamiento de unos péptidos que inhiben el crecimiento de los cristales de hielo, derivados de plantas como el centeno o la hierba.

25 Se cree que las ISP logran su función enlazándose a planos específicos de los cristales de hielo y minimizando la recristalización (Biophysical Journal, Feb. 1991, 409-418). La inhibición de la recristalización del hielo, también denominada supresión del crecimiento de los cristales de hielo (Cryobiology, 25, 55-60, 1988), es una propiedad de las ISP que puede examinarse mediante la comparación en un momento determinado de los cristales de hielo en presencia de ISP y en ausencia de ISP. La aplicación de este método en los ensayos de las ISP de los peces se describe en la patente US 5118792 (DNA Plant technology Corporation). Así, se ha descrito que las ISP de los peces del océano Antártico son muy efectivas en la minimización del crecimiento de los cristales de hielo (Cryobiology 32:23-34, 1995). En comparación con las ISP de los peces, se ha descrito una ISP encontrada recientemente en el raigrás (*Lolium perenne*) que es 200 veces más efectiva (en términos molares) en la inhibición de la recristalización (Nature, 406(6793):256, 2000).

35 Otra propiedad de las ISP es su capacidad para influir sobre la forma de los cristales de hielo. Esta propiedad es consecuencia de la unión selectiva de las ISP a determinadas caras de los cristales de hielo y, con esto, de la limitación del crecimiento de los cristales en ciertas direcciones. Entonces, la presencia de cristales de hielo que tienen una forma bipiramidal hexagonal se considera indicativa de la presencia de ISP. Este método se describe en la patente WO 92/22581 (University of Waterloo) para ensayar la actividad de las ISP extracelulares del centeno de invierno.

40 Las ISP también tienen la capacidad de inhibir la actividad de las sustancias nucleantes del hielo. Esta interacción entre una ISP y un nucleante del hielo puede resultar por ejemplo, en el incremento de la histéresis térmica (patente WO 96/40973 - Universidad de Notre Dame du Lac). La histéresis térmica se caracteriza por una disminución de la temperatura aparente de congelación de una solución sin afectar a la temperatura de fusión. Así, en la literatura se describe extensamente la identificación de fuentes de ISP mediante la realización de ensayos de la histéresis térmica (por ejemplo, John G. Duman, Cryobiology, 30, 322-328, 1993).

50 Se ha sugerido que lo que permite que estas proteínas interactúen con el hielo es su estructura terciaria (véase Fletcher et al., Annu. Rev. Physiol., 2001, 63:359-390). Así, todas estas propiedades hacen que las ISP puedan aplicarse en una serie de utilidades potenciales. Con mayor importancia, se ha sugerido que las ISP se utilicen para la mejora de la tolerancia de ciertos productos a la congelación. Los productos congelados pueden someterse a fluctuaciones de temperatura que dan lugar a un incremento en el tamaño de los cristales de hielo y, consecuentemente, a defectos en su textura. Por lo tanto, las ISP permiten a los productos congelados resistir fluctuaciones de temperatura que pueden ocurrir durante el empaquetado, el almacenamiento, la fabricación, etc., permitiendo así que mantengan una textura deseable.

60 La utilización de ISP en el campo de los alimentos congelados se ha descrito ampliamente en las patentes WO2006042632 (Unilever), PE 1541034 (Unilever), PE 1158866 (Unilever), US 6914043 (Unilever), PE 0966206 (Unilever), WO 9841107 (Unilever), WO 9841109 (Unilever), PE 1049383 (Unilever); PE 1158865 (Unilever), PE 1158863 (Unilever), PE 1158862 (Unilever), PE 1158864 (Unilever), WO 98/04146 (Unilever), PE 1417892 (Unilever), WO 03055320 (Unilever), US 20040048962 (Unilever).

65 La patente US 3.889.001 hace referencia a productos de emulsión de aceite en agua que pueden congelarse y que contienen pequeñas cantidades de hidrolizados de proteína. Se dice que estos hidrolizados de proteína confieren una buena estabilidad a la congelación-descongelación de dicha emulsión.

La patente US 2006/0233933 hace referencia a emulsiones aireadas como los helados fortificados con calcio. Con tal de optimizar la biodisponibilidad del calcio, en este producto se utilizan hidrolizados de caseína, como los fosfopéptidos de caseína.

5 La patente FR 2.100.161 hace referencia a la utilización de albúmina parcialmente hidrolizada en dulces acídicos congelados. En esta misma se encontró que una combinación de pH bajo y la presencia de proteína parcialmente hidrolizada tiene un efecto positivo en la consistencia del producto congelado.

10 La patente PE 1 166 653 tiene relación con las composiciones proteicas que contienen hierro, que incluyen azúcar y que se pueden congelar. La proteína puede ser caseína hidrolizada y se dice que la solución congelada tiene una buena estabilidad a la congelación-descongelación.

15 La patente WO 94/10854 pertenece al campo de los dulces helados que contienen proteínas escindidas, de las que se dice que actúan como emulsionantes y estabilizantes.

El artículo de Ravula R. R. et al. en el Australian Journal of Dairy Technology, 1998, 53, 3, menciona la utilización de hidrolizados de caseína ácida para mejorar la viabilidad de los probióticos en los postres congelados.

20 La patente JP 11-276086 hace referencia a los postres congelados hipoalergénicos elaborados mediante la introducción de uno o más tipos de hidrolizados de proteínas.

25 La patente WO 00/53029 hace referencia a las proteínas anticongelantes procedentes de fuentes como animales o plantas que pueden utilizarse en los helados.

La patente US 5.405.756 hace referencia a la preparación de fosfopéptidos de caseína que son solubles en ácido. Los fosfopéptidos se producen mediante la escisión de la caseína con una enzima.

30 La patente WO 93/08702 también hace referencia a un método para producir hidrolizados de caseína.

No obstante, las fuentes de ISP se han limitado a las fuentes procedentes de ambientes bajo cero y/o a la utilización de organismos genéticamente modificados (GMO, del inglés *genetically modified organisms*) para producir estas proteínas. Por ejemplo, la patente WO 9403617 (Unilever) describe la producción de ISP a partir de levaduras y su posible utilización en los helados. La patente WO 9611586 (HSC R&D Ltd - Seabright Corporation Ltd) describe ISP de pez producidas por microbios. Se han obtenidos otras ISP principalmente mediante la modificación enzimática y química. Por ejemplo, la patente WO 9013571 (DNA Plant technology Corporation) describe péptidos ISP producidos químicamente o mediante técnicas de DNA recombinante a partir de plantas.

40 Estas técnicas están sujetas a mucha controversia y los productos "marcados con GMO" resultantes no siempre son atractivos para el consumidor.

Objeto de la invención:

45 Así, es objeto de la invención proporcionar una fuente alternativa de agentes estructurantes del hielo que puede utilizarse en productos congelados y que evita la necesidad de utilizar aditivos manipulados genéticamente.

Resumen de la invención:

50 Consecuentemente, el objeto se resuelve por las características de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan adicionalmente la idea central de la invención.

Aquí se describen productos alimentarios congelados que contienen al menos un péptido estructurante del hielo derivado de las proteínas de la leche.

55 En un primer aspecto, la invención hace referencia a la utilización de un péptido derivado de las proteínas de la leche como agente estructurante del hielo.

También forma parte de la invención un proceso para la mejora de la resistencia al choque térmico de los productos de dulces congelados que incluye los pasos siguientes:

60 a. Escindir una proteína láctica en péptidos

b. Aislar los péptidos obtenidos en el paso anterior y

65 c. Utilizar dichos péptidos en la elaboración de productos dulces congelados.

De este modo, los péptidos estructurantes del hielo se pueden obtener mediante la escisión enzimática de la caseína.

Figuras

5 A continuación se describe la presente invención con referencias a algunas de sus realizaciones (o a la realización de referencia) que se muestran en las figuras, en las que

10 - La Figura 1 muestra la evolución del tamaño de los cristales de hielo con periodos crecientes de choque térmico (antes del choque térmico, dos semanas después del choque térmico y tres semanas después del choque térmico) para una mezcla estándar de helado y para un helado que contiene Peptigen IF-2050, un hidrolizado de caseína comercial (Arla Food Ingredient - Dinamarca).

15 - La Figura 2 muestra la evolución del tamaño de los cristales de hielo con periodos crecientes de choque térmico (antes del choque térmico, dos semanas después del choque térmico y tres semanas después del choque térmico) para una mezcla estándar de helado, para un helado que contiene Peptigen IF-2050, para un helado que contiene péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de la caseína con papaína y para un helado que contiene péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis de la caseína con tripsina.

20 - Las Figuras 3a y 3b son ilustraciones de los cristales de hielo tres semanas después del choque térmico en un helado para una mezcla estándar (fig. 3a) y para un helado que contiene Peptigen IF-2050 (fig. 3b), donde la barra de escala representa 100 micras.

Descripción detallada de la invención:

25 Se describen productos alimentarios congelados que contiene al menos un péptido estructurante del hielo. "Péptido" hace referencia a una cadena de hasta 50 aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Los péptidos utilizados en la invención no son proteínas y no poseen estructura terciaria. Son hidrolizados de proteínas. El peso de dicho péptido es menor a 1 kDa. "Estructurante del hielo" hace referencia a que el péptido tiene la capacidad de interactuar con la interfaz de los cristales de hielo, en particular de inhibir el crecimiento de los cristales de hielo. Esta función es distinguible y contrasta con la función de estabilización de la aireación/cámara de aire de algunos péptidos presentes en las interfaces de las cámaras de aire.

35 Los péptidos utilizados en la presente invención derivan de una proteína de la leche. Las proteínas de la leche incluyen la caseína y la proteína del suero de la leche. Preferiblemente, la proteína de leche utilizada es la caseína. "Caseína" hace referencia a la caseína tal y como se encuentra en la naturaleza, es decir, que no ha sido modificada químicamente. De acuerdo con la invención, esta definición incluye la caseína propiamente dicha y caseinatos hidrosolubles, por ejemplo caseinatos de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de amonio.

40 El péptido puede derivar de dicha proteína de la leche mediante la escisión enzimática o química. En una realización preferible, la proteína de la leche se trata con una enzima, que puede seleccionarse entre cualquier enzima proteasa capaz de hidrolizar la proteína de la leche en péptidos. Más preferiblemente, la enzima se selecciona de entre la tripsina, la papaína, la neutrasa o mezclas de las mismas. De acuerdo con la invención, tras el tratamiento de la proteína de la leche con una enzima, la proteína se escinde en péptidos que pueden utilizarse como agentes estructurantes del hielo. Éstos son capaces de controlar la estabilidad de los alimentos congelados mediante la inhibición del crecimiento de los cristales, mejorando así la calidad del producto.

50 De forma alternativa, se ha visto que los hidrolizados comerciales de la proteína de la leche pueden utilizarse en la presente invención. Consecuentemente, se cree que dichos hidrolizados comerciales pueden contener péptidos de acuerdo con la invención, es decir, péptidos que pueden utilizarse como agentes estructurantes del hielo. Estos hidrolizados se venden, por ejemplo, bajo el nombre de Peptigen, Peptone, Peptopro, etc.

55 El crecimiento de los cristales puede medirse mediante el análisis del tamaño de los cristales utilizando un analizador de imagen controlado por ordenador. Habitualmente, el tamaño de los cristales puede medirse utilizando la distribución del diámetro sobre el volumen (es decir sobre la cantidad de cristales de hielo evaluados). Así, el valor $D_v(0,50)$ representa el valor del diámetro máximo del 50% del volumen total de los cristales de hielo evaluados. El valor $D_v(0,90)$ representa el valor del diámetro máximo del 90% del volumen total de los cristales de hielo evaluados. Mediante la utilización de los péptidos de la invención, el tamaño de los cristales de una solución de azúcar a -11°C que contiene dichos péptidos se reduce entre un 15%-25% en comparación con una solución de azúcar de referencia a -11°C sin péptidos (véase la Tabla 2).

60 El efecto de los péptidos se prueba adicionalmente mediante un tratamiento de choque térmico. "Choque térmico" hace referencia a los ciclos de temperatura inevitables durante el almacenamiento y la distribución que provoca el crecimiento de los cristales de hielo y otros deterioros debidos a cambios estructurales. Este "choque térmico" se produce mediante un proceso, que es un ciclo definido de cambios térmicos inflingidos sobre el producto. El

producto se coloca dentro de una cabina a -20°C que automáticamente se enciende durante 19 horas y luego se apaga durante 5 horas utilizando un temporizador de 24 horas para provocar un choque térmico.

5 Estos análisis llevaron a la sorprendente conclusión de que determinados péptidos derivados de la caseína tienen una acción visible y medible sobre la inhibición del crecimiento de los cristales de hielo.

Además, en relación a las figuras 1, 2, 3a y 3b, se puede observar que aunque crezca el tamaño de los cristales en los helados, en particular tras 2 semanas del choque térmico, se obtienen cristales de tamaño menor mediante la utilización de los péptidos estructurantes del hielo de acuerdo con la invención.

10 Las condiciones de elaboración de algunos de dichos péptidos que proporcionan actividad anticongelante se proporcionan en la tabla 1.

15 De este modo, los productos alimentarios congelados pueden contener el péptido utilizado en la invención en una cantidad entre el 0,0001 y 10%, preferiblemente en una cantidad entre el 0,001 y 5%, más preferiblemente en una cantidad entre el 0,01 y 1% en peso de la composición.

20 El producto alimentario congelado puede ser cualquier producto alimentario. Preferiblemente, es un producto dulce que puede ser un helado, un sorbete, un yogur helado, una melorina, etc. El producto puede contener inclusiones en forma de trozos de chocolate, frutos secos, trozos de fruta, etc. El producto también puede contener un recubrimiento, como por ejemplo, un recubrimiento de chocolate o un recubrimiento de fruta, etc. El recubrimiento en sí también puede contener inclusiones. El producto alimentario congelado puede estar aireado o no aireado. Preferiblemente, los dulces helados aireados muestran un aumento del volumen de entre un 30% y un 200%, más preferiblemente de entre un 50% y un 150%. Por ejemplo, el nivel de aumento del volumen en un helado habitualmente es de entre un 70% y un 100%, y en dulces como las *mousses* el aumento del volumen puede ser tan elevado como entre un 200 y un 250 % del peso, mientras que el aumento del volumen en los helados de leche es de entre un 25 y un 35%.

25 De este modo, la invención incluye la utilización de un péptido derivado de la proteína de la leche como agente estructurante del hielo. Preferiblemente, la proteína de la leche es caseína y el péptido puede derivarse de la proteína de la leche mediante la escisión química o enzimática de la proteína.

30 De acuerdo con otra realización de la invención, el péptido puede obtenerse mediante el fraccionamiento del sustrato obtenido a través de la escisión química o enzimática de la proteína. Esto proporciona la ventaja de enriquecer el principio activo para así poder trabajar a concentraciones menores.

35 De acuerdo con la invención, el péptido estructurante del hielo se utiliza preferiblemente en productos dulces congelados.

40 En relación a la figura 3b, se puede observar que mediante la utilización de los péptidos de acuerdo con la invención, los cristales de hielo son menores en comparación a una mezcla estándar de helado (figura 3a).

45 Además, se ha observado que la forma de los cristales de hielo en el helado mantiene un aspecto esencialmente redondeado. Este efecto es sorprendente, considerando que las proteínas anticongelantes comunes utilizadas en la materia tienden a modificar la estructura de los cristales de hielo. Además, los cristales de hielo encontrados en los productos congelados que contienen ISP tienden a tener una forma rectangular alargada que afecta a la textura del producto, aumentando su dureza. Con la presente invención, se puede obtener un producto congelado que tiene una textura suave y blanda mientras se conserva la resistencia a las fluctuaciones de temperatura.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la mejora de la resistencia al choque térmico de los productos dulces congelados.

55 El primer paso del método consiste en la escisión de la proteína de la leche. Preferiblemente, la proteína de la leche es caseína. La escisión puede llevarse a cabo química o enzimáticamente. Un proceso preferible es la hidrólisis enzimática de la proteína de la leche para producir péptidos. Para la hidrólisis de la proteína de la leche, la proporción entre la enzima y el sustrato es de entre 1/100 a 1/500, y preferiblemente de 1/250 peso/peso.

60 Los péptidos obtenidos pueden variar ampliamente dependiendo de las condiciones aplicadas, por ejemplo, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación, el pH de la solución, etc. De acuerdo con la invención, se ha visto que las condiciones preferibles para obtener diferentes péptidos que sean todos ellos compuestos estructurantes del hielo eficientes son una temperatura de incubación de entre 45°C y 70°C, un tiempo de incubación de entre 5 y 480 minutos y un pH de la solución de entre 6,5 y 8,5.

65 La enzima utilizada puede seleccionarse de entre cualquier enzima proteasa. Preferiblemente, se selecciona entre la tripsina, la papaína, la neutrasa o mezclas de las mismas.

De este modo, la proteína de la leche se incubó con la enzima deseada bajo unas condiciones determinadas. Tras el periodo de tiempo deseado, la enzima se inactiva y se recoge el sustrato. Entonces, se aíslan los péptidos del sustrato y pueden ser utilizados directamente en la producción de un producto congelado. De forma alternativa, el sustrato puede estar sujeto a un fraccionamiento adicional, tras el cual se aíslan los péptidos y se utilizan como agentes estructurantes del hielo en la elaboración de un producto congelado. También se pueden purificar los péptidos antes de su utilización. El producto congelado puede elaborarse mediante cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la materia. Además, los péptidos pueden añadirse en cualquier punto durante la elaboración del producto congelado, más preferiblemente durante la preparación de la mezcla, antes del proceso de maduración.

De este modo, los péptidos estructurantes del hielo pueden obtenerse mediante la escisión enzimática de la caseína. La escisión enzimática puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las realizaciones del proceso descrito con anterioridad.

En resumen, la presente invención proporciona una forma de producir productos congelados, y en particular, productos dulces congelados que se mantienen suaves y estables tras el choque térmico. También proporciona productos congelados naturales que se etiquetan como "sin aditivos" (del inglés "clean" label) y no contienen sin aditivos GMO. Además, con la utilización de las ISP conocidas deja de observarse la modificación de la estructura de los cristales de hielo que se observaba antes. Esto produce un producto que mantiene la forma esencialmente circular de los cristales de hielo y que mantiene una textura suave y sabrosa tras el choque térmico.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Elaboración de los péptidos

Los caseinatos sódicos comerciales se sometieron a la acción de diferentes enzimas y se examinó la actividad inhibitoria para el crecimiento de los cristales de hielo de los hidrolizados resultantes.

La hidrólisis se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento siguiente. El aislado proteico de caseinato sódico se disolvió en una concentración del 5% de proteínas en agua. El pH se ajustó al pH deseado de acuerdo con la tabla 1 mediante la adición de hidróxido de sodio, NaOH 1N, o de ácido clorhídrico, HCl 1N. Entonces se llevó el sustrato a la temperatura deseada. Finalmente, se añadió la enzima. Durante la reacción, el pH no se ajustó.

Para la hidrólisis del caseinato, la proporción entre la enzima y el sustrato es de entre 1/100 y 1/500, y preferiblemente de 1/250 peso/peso.

Dependiendo de las condiciones de la reacción, el tiempo de reacción puede oscilar entre 5 min. y 1200 min.

Ejemplo 2: Preparación de las muestras para el análisis

Se mezclaron 50 µL del producto de la reacción (obtenido mediante el método descrito en el ejemplo 1) con un tampón de RP-HPLC, para el análisis cromatográfico. Simultáneamente, se calentaron 1,5 ml del producto de la reacción a 90°C durante 15 minutos con objeto de inactivar las enzimas. Tras el calentamiento, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 14.000 revoluciones/min. (rpm), para eliminar cualquier precipitado posible. El sobrenadante se liofilizó para el análisis de la recristalización de los cristales de hielo.

Ejemplo 3: Análisis HLPC

El análisis de HPLC de fase reversa se llevó a cabo sobre las muestras obtenidas en el ejemplo 2 de acuerdo con el método descrito en S. Visser, C.J. Stangen y H.S. Rollema (1991) "Phenotyping of bovine milk protein by reversed-phase high-performance liquid chromatography", J.Chromatography, 548, págs. 361-370. La separación se basó principalmente en las diferencias en la hidrofobicidad de las proteínas y los péptidos. La detección se llevó a cabo mediante la absorción UV a 22 nm.

Ejemplo 4: Ensayo de recristalización del hielo

Se llevó a cabo un análisis de la recristalización de los cristales de hielo para evaluar el efecto de los hidrolizados de la proteína láctica sobre la recristalización de los cristales de hielo.

Materiales:

- Criomicroscopio que consta de:

(1) Microscopio Olympus Provis AX 70

(2) Fase fría Linkam BCS 196

(3) Bomba de nitrógeno Linkam LNP 93/2 ajustada a un frasco Dewar de 2L

5 (4) Controlador de temperatura Linkam TP93

(5) Videocámara a color 3CCD (Sony DXC-950P)

10

- Cubreobjetos redondos de 14mm No 1 Deckglaser

- Microjeringa de 10 µL N° 701 Hamilton

- Soporte para cubreobjetos de cuarzo Linkam THMS/Q

15

- Balanza analítica AT400 Mettler Toledo

- Erlenmeyer de 250 ml

20

- Viales de vidrio de 20 ml

- Nitrógeno líquido Air Liquide

- Agua destilada

25

- D(+)-Sacarosa N° 16104 Sigma-Aldrich

30

El hidrolizado liofilizado obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito con anterioridad se disuelve en una solución al 40% de sacarosa en agua. La solución final contiene el hidrolizado liofilizado en un 5% del peso. La solución al 40% de sacarosa en agua se utiliza como muestra de referencia. Se utiliza como control positivo una solución de péptidos que inhiben el crecimiento de los cristales de hielo (ISP tipo 1) en una solución al 40% de sacarosa en agua. Las muestras se analizan mediante la observación bajo un microscopio de tipo Polyvar distribuido por Reichert-Jung, Harnalser Hauptstrasse 219, Vienna, Austria, equipado con un regulador de temperatura Linkham distribuido por Linkham Scientific Instruments Ltd, Tadworth UK. El regulador de temperatura se recalibra con n-dodecano (punto de fusión: -9,6°C) y n-decano (punto de fusión: -29,7°C).

35

Una muestra de 2 µl se coloca en una celda de cuarzo cubierta con una cubierta circular. La celda de cuarzo se coloca en el regulador de temperatura y entonces se refrigera hasta los -100°C a un ritmo de 90°C por minuto. A -100°C, se deja que la muestra se equilibre durante 2 minutos, y luego se recalienta hasta los -11°C a un ritmo de 30°C por minuto. Se toma como momento de inicio del análisis el instante en que la muestra alcanza los -11°C. Durante los primeros dos minutos del análisis, se regula el microscopio para asegurar la obtención de una buena imagen y la presencia de suficientes cristales para la realización de un análisis significativo. Tras 2 minutos, se adquieren las imágenes del microscopio y se almacenan utilizando un programa de grabación de vídeo con un intervalo de tiempo predefinido (2 minutos). Se graban imágenes durante 2 h. para cada hidrolizado a temperatura constante. Los resultados se muestran en la tabla 2.

40

45

50

Para cada muestra utilizada se toma como referencia la solución al 40% de sacarosa. Para esta solución, los cristales de hielo alcanzan el tamaño máximo medio que puede alcanzarse bajo un ciclo de refrigeración / calentamiento determinado, dada la ausencia de inhibidor de crecimiento de cristales de hielo. De este modo, los resultados obtenidos para los distintos hidrolizados pueden compararse con las imágenes del microscopio de los cristales de hielo en la muestra de sacarosa de referencia. Es posible establecer si se observa o no el efecto de la inhibición del crecimiento de los cristales de hielo para cada hidrolizado ensayado mediante la comparación de la imagen obtenida para la solución de sacarosa de referencia con las imágenes de microscopio del estado de los cristales tras una hora a -11°C.

55

Las micrografías muestran la evolución de los cristales de hielo durante un experimento representativo utilizando las condiciones descritas aquí.

Tabla 1 - Hidrolizados con actividad estructurante del hielo

Proteína	Enzima	Tiempo de incubación	pH	Temperatura (°C)
Caseína	Papaína	480 min.	7	70
Caseína	Tripsina	480 min.	8	45
Caseína	Neutrasa	5 min.	7	45
Caseína	Papaína	5 min.	7	70
Caseína	Tripsina	5 min.	8	45

Todos estos hidrolizados se sometieron a un análisis del tamaño de los cristales utilizando un analizador de imagen controlado por ordenador. Los resultados se muestran en la tabla 2.

5 Tabla 2 - Análisis del tamaño de los cristales

	Tamaño de los cristales (µm) tras 1 h. a -11°C		Tamaño de los cristales (µm) tras 2 h. a -11°C	
	Dv(0,50)	Dv(0,90)	Dv(0,50)	Dv(0,90)
Solución de sacarosa al 40% (referencia)	16,0	24,5	18,7	30
Hidrol. caseinato con papaína 480 min.	12,6	18,0	16,7	26,6
Hidrol. caseinato con tripsina 480 min.	13,3	19,0	16,8	25
Hidrol. caseinato con neutrasa 5 min.	13,0	19,1	15,4	22
Hidrol. caseinato con papaína 5 min.	12,7	18,6	16,5	22,5
Hidrol. caseinato con tripsina 5 min.	12,3	17,5	15	22,1

Dv(0,50) representa el valor del diámetro máximo del 50% del volumen total de los cristales de hielo evaluados; Dv(0,90) representa el valor del diámetro máximo del 90% del volumen total de los cristales de hielo evaluados.

10 Los resultados del análisis confirman que el tamaño de los cristales de hielo obtenidos es menor en las cinco soluciones que contienen los hidrolizados de caseína seleccionados que en la solución al 40% de sacarosa de referencia que no contiene un agente para la inhibición del crecimiento de los cristales de hielo. Esto muestra el efecto inhibitorio de estos cinco hidrolizados sobre el crecimiento de los cristales de hielo.

Ejemplo 5: Recetas de helado utilizadas para el ensayo

15 Las siguientes recetas se utilizaron en los ensayos al 1, 5 y 10% en los helados. Se utilizaron como referencia las mezclas estándar con un contenido equivalente de sólidos totales (TS).

Ingredientes	Mezcla Std. al 1%	1% P	Mezcla Std. al 5%	5% P	Mezcla Std. al 10%	10% P
Agua	61,5	61,5	61,5	61,5	61,5	61,5
Leche desnatada en polvo	2	2	2	2	2	2
Suero de leche dulce en polvo	8	8	8	8	6,5	6,5
Azúcar	13	13	13	13	11	11
Sirope de glucosa DE40	1	1	1	1	1	1
Grasa de coco	9	9	9	9	7,5	7,5
Emulsionante	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Goma de guar	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sirope de glucosa DE 20-23	5	4	5		10	
Péptidos		1		5		10

Std: estándar
P: péptidos utilizados en la invención
TS: 38%

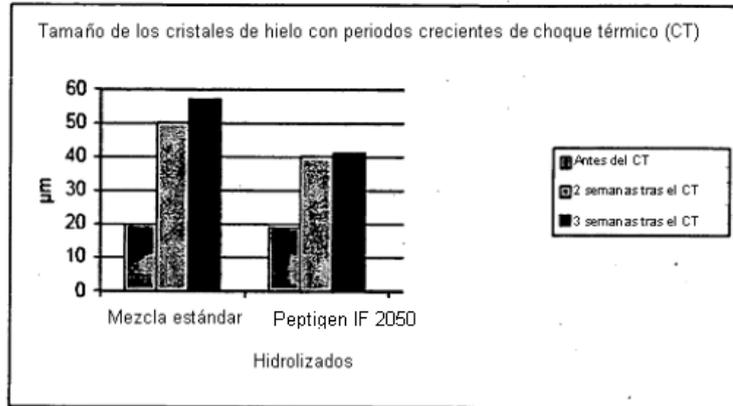
20 La congelación se llevó a cabo tras 24 horas de maduración en un KF 80 (Hoyer) utilizando los parámetros siguientes:

Velocidad de la batidora	860 rpm
Tasa de flujo	701/h
Presión relativa del barril	3 bar
Temperatura de congelación	-5,7°C
Aumento del volumen	100%

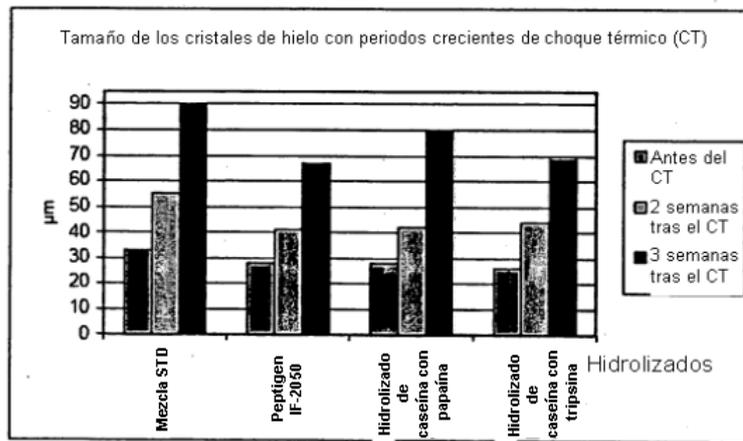
25 La degustación técnica llevada a cabo tres semanas después del choque térmico detectó que la mezcla estándar estaba muy cristalizada en la boca. La percepción de los cristales de hielo tras el choque térmico fue menor en las muestras que contenían los péptidos utilizados en la invención.

REIVINDICACIONES

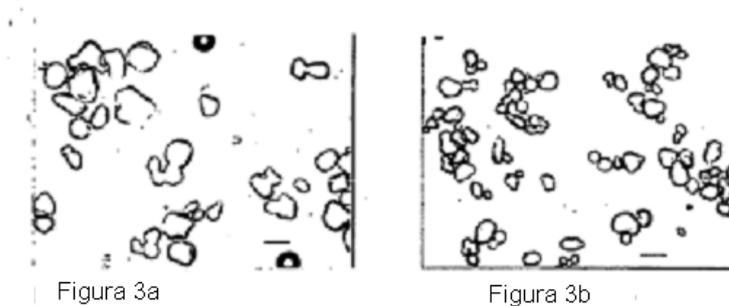
1. La utilización de un péptido derivado de la proteína de la leche como agente estructurante del hielo.
- 5 2. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína de la leche es caseína.
3. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el péptido se deriva mediante la escisión química o enzimática de la proteína de la leche.
- 10 4. La utilización de acuerdo con la reivindicación anterior, donde el péptido se obtiene mediante el fraccionamiento del sustrato escindido química o enzimáticamente.
5. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en productos dulces congelados.
- 15 6. La utilización de acuerdo con la reivindicación 5, donde el péptido se encuentra presente en una cantidad de entre 0,0001-10%, preferiblemente entre 0,001-5%, más preferiblemente entre 0,01-1% en peso del producto congelado.
7. La utilización de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, donde el producto dulce congelado se selecciona entre helados, sorbetes, yogures helados o melorinas.
- 20 8. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde el producto dulce congelado contiene inclusiones y/o recubrimientos.
9. La utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde el producto dulce congelado está aireado.
- 25 10. Un proceso para la mejora de la resistencia al choque térmico de un producto dulce congelado que comprende los pasos de:
 - 30 a. Escindir una proteína de la leche en péptidos
 - b. Aislar los péptidos obtenidos en el paso anterior
 - 35 c. Utilizar dichos péptidos en la elaboración de un producto dulce congelado.
11. El proceso de la reivindicación 10, donde se lleva a cabo un paso de fraccionamiento sobre el sustrato escindido de la proteína de la leche obtenido en el paso a.
- 40 12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la proteína de la leche es caseína.
13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la escisión de la proteína de la leche es enzimática o química.
- 45 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, donde la escisión enzimática se lleva a cabo con tripsina, papaína, neutrasa o con mezclas de las mismas.
15. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde la escisión enzimática se lleva a cabo durante un periodo de entre 5 y 480 min.
- 50 16. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 15, donde la escisión enzimática se lleva a cabo a una temperatura de entre 45°C y 70°C.
17. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 16, donde la escisión enzimática se lleva a cabo a un pH de entre 6,5 y 8,5.



Efecto de los hidrolizados en el tamaño de los cristales de hielo en helados
Figura 1



Efecto de los hidrolizados en el tamaño de los cristales de hielo en helados
Figura 2



Tamaño de los cristales en helados
Figura 3