

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 631**

51 Int. Cl.:

**A23G 9/38** (2006.01)

**A23G 9/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2009 E 09751930 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013 EP 2364097**

54 Título: **Dulces helados aireados y procedimientos de producción de los mismos**

30 Prioridad:

**09.12.2008 EP 08171054**

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

**11.04.2013**

73 Titular/es:

**UNILEVER NV (100.0%)**

**Weena 455**

**3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**CAGNOL, FLORENCE CLOTILDE;**

**COX, ANDREW RICHARD y**

**RUSSELL, ANDREW BAXTER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 400 631 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

Dulces helados aireados y procedimientos de producción de los mismos

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a dulces helados aireados y procedimientos de producción de los mismos. En particular, se refiere a dulces helados aireados que contienen pequeñas burbujas de gas.

**Antecedentes de la invención**

10 Los dulces helados aireados, tales como helado, sorbete y yogur helado contienen muchas burbujas de gas, típicamente, de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. La efectividad de las burbujas de gas está relacionada con su tamaño: generalmente, cuanto más pequeñas son las burbujas, más suave y cremosa es la textura. Sin embargo, es difícil crear y conservar burbujas de gas con tamaños menores de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . Esto es debido a que una dispersión de burbujas de gas es vulnerable a engrosamiento por formación de crema, a la coalescencia y a la desproporcionación, resultando en menos burbujas, más grandes. Cuanto más pequeñas son las burbujas de gas (para un volumen total de gas determinado), mayor es la fuerza impulsora para el engrosamiento.

15 El documento EP 0 675 685 divulga dulces helados aireados que contienen burbujas de gas que tienen un tamaño medio  $D(3,2)$  de menos de 20  $\mu\text{m}$ , preparados usando ésteres de sacarosa. El documento WO 98/09536 divulga un procedimiento de preparación de dulces helados aireados que tienen burbujas de gas de menos de 40  $\mu\text{m}$ , sometiendo el producto a fuerzas de cizallamiento y a enfriamiento en un extrusor de tornillo. El documento US 2005/0037110 divulga un helado que está tratado mecánicamente por medio de herramientas mecánicas que generan grandes tensiones de cizallamiento, lo que resulta en burbujas de gas que tienen un diámetro medio de no más de 10  $\mu\text{m}$ .

20 Sin embargo, estas rutas requieren ingredientes o procedimientos de procesamiento complejos especializados. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de un procedimiento mejorado, sencillo para producir dulces helados aireados que contienen pequeñas burbujas de gas.

**Breve descripción de la invención**

25 Los presentes inventores han encontrado ahora que es posible preparar dulces helados aireados que contienen una relación sustancial de burbujas de gas muy pequeñas mediante el uso de  $\beta$ -caseína. En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un dulce helado aireado que comprende al menos el 0,2% en peso de  $\beta$ -caseína libre, en la que la  $\beta$ -caseína libre constituye al menos el 45% de la  $\beta$ -caseína total presente en el dulce helado, y que contiene una población de burbujas de gas, en la que al menos el 65% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 20  $\mu\text{m}$ .

30 Preferentemente, al menos el 50% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 10  $\mu\text{m}$ .

Preferentemente, la cantidad de  $\beta$ -caseína libre es de al menos el 0,3% en peso, más preferentemente, de al menos el 0,5%, más preferentemente, de al menos el 0,7%, más preferentemente, de al menos el 1,0%.

Preferentemente, la  $\beta$ -caseína libre constituye al menos el 50%, más preferentemente, al menos el 55%, más preferentemente, al menos el 60% de la  $\beta$ -caseína total presente en el dulce helado.

35 Preferentemente, el dulce helado aireado tiene un índice de aireación de entre el 20% y el 400%.

Preferentemente, el dulce helado aireado es un helado, sorbete y yogur helado, más preferentemente, un helado.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un producto alimenticio aireado según el primer aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento:

40 a) proporcionar una mezcla de ingredientes que comprende al menos el 0,2% en peso de  $\beta$ -caseína libre, en el que la  $\beta$ -caseína libre constituye más del 45% de la  $\beta$ -caseína total presente en el dulce helado;

b) airear la mezcla de manera que se forme una población de burbujas de gas, en la que al menos el 65% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 20  $\mu\text{m}$ ;

c) congelar la mezcla;

en el que las etapas b) y c) pueden realizarse simultáneamente o en cualquier orden.

45 Preferentemente, la mezcla de ingredientes comprende una fuente de  $\beta$ -caseína aislada, purificada o parcialmente purificada, enriquecida o concentrada.

### Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido normalmente por una persona con conocimientos ordinarios en la materia (por ejemplo, en la producción de dulces helados). Las definiciones y descripciones de los diversos términos y las técnicas usadas en la fabricación de dulces helados se pueden encontrar en "Ice Cream", 6ª Edición, Robert T. Marshall, H. Douglas Goff y Richard W. Hartel (2003), Kluwer Academic/Plenum Publishers. Todos los porcentajes, a menos que se indique lo contrario, se refieren al porcentaje en peso, con la excepción de los porcentajes citados en relación con la aireación (que se definen por la ecuación indica más adelante) y los porcentajes citados en relación con la distribución de tamaños de burbuja (que se refiere a la frecuencia acumulada normalizada).

El término " dulce helado" se refiere a un producto alimenticio elaborado, de sabor dulce, destinado al consumo en estado helado (es decir, bajo condiciones en las que la temperatura del producto alimenticio es menor de 0°C y, preferentemente, bajo condiciones en las que el producto alimenticio comprende cantidades considerables de hielo). Los dulces helados incluyen helado, sorbete, yogur helado y similares.

El término "aireado" significa que un gas ha sido incorporado intencionadamente a una mezcla, por ejemplo por medios mecánicos. El gas puede ser cualquier gas pero, preferentemente, en el contexto de los productos alimenticios, es un gas de calidad alimenticia, tal como aire, nitrógeno, óxido nitroso o dióxido de carbono. El grado de aireación se mide en términos de "índice de aireación", que se define como:

$$\text{índice de aireación} = \frac{\text{peso de la mezcla} - \text{peso del producto aireado}}{\text{peso del producto aireado}} \times 100$$

en la que los pesos se refieren a un volumen fijo de producto/mezcla. El índice de aireación se mide a presión atmosférica. Preferentemente, el dulce helado tiene un índice de aireación de al menos el 20%, más preferentemente, de al menos el 50%, más preferentemente, de al menos el 80%. Preferentemente, el dulce helado tiene un índice de aireación como máximo del 400%, más preferentemente, como máximo del 200%, más preferentemente, como máximo del 120%.

La leche de vaca contiene aproximadamente el 87% de agua. El resto consiste en grasa (4%), proteínas (3,5%), lactosa (4,8%) y pequeñas cantidades de sales inorgánicas, especialmente de calcio y de fosfato (0,29%). Las proteínas de la leche se dividen en dos tipos principales: caseína (80%) y proteínas de suero de leche (20%). La caseína y las proteínas de suero se caracterizan por su solubilidad a pH 4,6 (a 20°C): las caseínas son insolubles, mientras que las proteínas de suero son solubles. Las caseínas están presentes, principalmente, en forma de partículas coloidales que tienen, típicamente, un tamaño de 100 nm, conocidas como micelas de caseína. La función natural de las micelas de caseína es transportar el fosfato de calcio insoluble que es necesario para los mamíferos jóvenes. Las micelas de caseína tienden a perder su estructura cuando son sometidas a tratamiento enzimático o reducción de pH a 4,6. En un nivel microestructural, la leche puede considerarse como tres componentes: glóbulos de grasa, micelas de caseína y suero (suero de leche). Hay cierta caseína libre en el suero de leche, ya que hay un equilibrio dinámico entre la caseína micelar y la caseína. La caseína libre de suero puede ser separada de las micelas de caseína mediante centrifugación.

Las principales proteínas del suero son  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, albúmina de suero bovino inmunoglobulina y proteosa peptonas. Hay también diversas proteínas minoritarias (lisozima, glicoproteína, lactotransferrina, lactoperoxidasa). Hay 4 proteínas de caseína principales: caseína  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . Las caseínas son moléculas de proteína relativamente pequeñas, con una alta actividad superficial, ya que un extremo de las moléculas consiste principalmente en aminoácidos hidrófilos (tales como serina y ácido glutámico), mientras que el otro consiste principalmente en aminoácidos hidrófobos (por ejemplo leucina, valina y fenilalanina). Las caseínas son bastante estables a la desnaturalización térmica, pero pueden ser desnaturalizadas por calor excesivo, lo que conduce a la agregación y precipitación.

La  $\beta$ -caseína constituye aproximadamente el 33% de la caseína total. La  $\beta$ -caseína contiene muchos residuos de prolina que confieren una estructura helicoidal desordenada o aleatoria con poca estructura secundaria (hélice  $\alpha$  <10%). La  $\beta$ -caseína es muy anfifílica debido a la separación neta entre las agrupaciones hidrófobas y las regiones cargadas negativamente a lo largo de la cadena peptídica. También es la proteína de caseína más hidrófoba. Su estructura resulta en 3 importantes propiedades físico-químicas. En primer lugar, la  $\beta$ -caseína es una de las proteínas de la leche con más actividad superficial. Se adsorbe rápidamente en las interfaces de aire o aceite/agua, pero no forma una red rígida en la interfaz (por ejemplo, en comparación con la  $\beta$  lactoglobulina). En segundo lugar, el calor tiene poco efecto sobre la  $\beta$ -caseína, ya que ya tiene una forma abierta y extendida. En tercer lugar, la  $\beta$ -caseína tiende a auto-asociarse en solución, en una manera similar a un detergente iónico. Su auto-asociación es altamente

dependiente de la fuerza iónica y de la temperatura.

Por supuesto, los dulces helados basados en leche que contienen  $\beta$ -caseína junto con las otras caseínas y proteínas de suero son bien conocidos. Sin embargo, estos productos no contienen cantidades considerables de  $\beta$ -caseína libre. La expresión " $\beta$ -caseína libre" se refiere a  $\beta$ -caseína que no está presente en micelas de caseína, es decir, no asociada con ningún otro tipo de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\kappa$ ). Dependiendo de la temperatura, la  $\beta$ -caseína libre se encuentra en el suero como un monómero o como micelas de  $\beta$ -caseína autoasociadas. Estas micelas de  $\beta$ -caseína no contienen ninguna de las otras caseínas y, por lo tanto, están incluidas en la expresión " $\beta$ -caseína libre". La concentración de  $\beta$ -caseína libre se mide a partir del sobrenadante obtenido después de la centrifugación, según el procedimiento descrito a continuación. La expresión " $\beta$ -caseína unida" se refiere a  $\beta$ -caseína que está presente en micelas de caseína. Su concentración puede medirse analizando el precipitado formado después de la centrifugación. La " $\beta$ -caseína total" es la suma de la  $\beta$ -caseína libre y la  $\beta$ -caseína unida. La cantidad de  $\beta$ -caseína libre es esencialmente la cantidad de  $\beta$ -caseína no-micelar incorporada a la mezcla a partir de la cual se fabrica el dulce helado, aunque (tal como se ha explicado anteriormente) una pequeña cantidad de  $\beta$ -caseína libre está presente junto con las micelas de caseína en las fuentes de proteína de la leche, tales como leche en polvo desnatada. Por ejemplo, usando el procedimiento descrito a continuación, los presentes inventores han determinado que en una leche en polvo desnatada típica, la cantidad de  $\beta$ -caseína libre es el 16% de la  $\beta$ -caseína total.

Con el fin de determinar las cantidades de  $\beta$ -caseína libre y unida, se preparan muestras de helado derretido, desgasificado mediante centrifugación, tal como se indica a continuación. Unos tubos de plástico transparentes (39 ml) se llenan completamente con helado derretido o solución de proteína usando una jeringa, se pesan exactamente y se sellan. Debe tenerse cuidado durante el llenado de los tubos para evitar la formación de espuma. Las muestras se centrifugan a 50.000 rpm durante 2 horas a 5°C usando una ultracentrífuga Beckman L8-M con un rotor Ti-70. Después de la centrifugación, el sobrenadante se separa por filtración del precipitado y ambos se pesan en viales de vidrio pesados previamente y, a continuación, se liofiliza hasta que esté completamente seco. A continuación, los viales de vidrio se vuelven a pesar para determinar la cantidad total de material liofilizado. Aproximadamente 30 mg de material liofilizado se pesan con precisión en viales de vidrio y, a continuación, se disuelven en 2 ml de tampón de disolución reductora (que consiste en 147 mg de citrato trisódico dihidrato, 100 mg de ditiotreitol y 36 g de urea en 100 ml de agua MilliQ). A continuación, la composición de proteínas en el sobrenadante y el precipitado se determina mediante electroforesis capilar (CE), usando un sistema de electroforesis capilar Hewlett Packard HP<sup>3D</sup> usando un capilar eCAP<sup>TM</sup> recubierto con N-CHO, diámetro interno de 50  $\mu$ m y longitud total de 65 cm (obtenido de Beckman Coulter). El procedimiento se basa en el descrito en: "Determination of milk proteins by capillary electrophoresis", N. de Jong, S. Visser y C. Olieman, J. Chromatogr. A, 652 (1993) página 207. El tampón de análisis CE se prepara disolviendo 147 mg de citrato trisódico dihidrato, 1,7 g de ácido cítrico monohidrato y 18 g de urea en 50 ml de agua MilliQ, y ajustando el pH a 3,0 mediante la adición de ácido cítrico monohidrato. A continuación, se disuelven 25 mg de hidroximetilcelulosa en esta solución (esto puede requerir varias horas). El tampón de análisis se filtra a través de un filtro de membrana de 0,2  $\mu$ m. Las muestras se cuantifican por comparación con un gráfico de calibración estándar de  $\beta$ -caseína. Todos los experimentos se realizan por duplicado para asegurar la reproducibilidad.

Los presentes inventores han encontrado que la aireación y la congelación de una mezcla que contiene  $\beta$ -caseína resultan en dulces helados aireados que contienen burbujas de gas muy pequeñas. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que estas pequeñas burbujas se crean debido a la alta actividad superficial de  $\beta$ -caseína y, también, debido a que la  $\beta$ -caseína parece ralentizar drásticamente la desproporción en dulces helados aireados. Sin embargo, cuando hay presente también  $\beta$ -caseína unida (por ejemplo, en forma de micelas de caseína), existe una competencia para la interfaz de gas, que resulta normalmente en una mezcla de especies en la superficie de las burbujas de gas. En estas circunstancias, la  $\beta$ -caseína libre es menos eficaz en la estabilización de las burbujas contra la desproporción. También se cree que la  $\beta$ -caseína interactúa con la micela de caseína y, por lo tanto, hay menos  $\beta$ -caseína libre disponible para la interfaz.

Los presentes inventores han encontrado ahora que este efecto de competición puede ser superado cuando una mezcla (es decir, una solución y/o suspensión acuosa) que contiene al menos el 0,2% en peso de  $\beta$ -caseína libre en la que la  $\beta$ -caseína libre constituye más del 45% de la  $\beta$ -caseína total presente es aireada. De esta manera, pueden formarse un gran número de pequeñas burbujas de gas, es decir, al menos el 65% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 20  $\mu$ m, según se mide mediante el procedimiento descrito en los ejemplos a continuación. Preferentemente, al menos el 75%, más preferentemente, al menos el 80% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 20  $\mu$ m. Preferentemente, al menos el 50%, más preferentemente, al menos el 60%, más preferentemente, al menos el 75% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 10  $\mu$ m. La etapa de aireación debe ser de una "intensidad" suficientemente alta de manera que se crean un gran número de burbujas de gas muy pequeñas. La intensidad del procedimiento de aireación depende de una serie de factores, los más importantes de los cuales son la tasa de disipación de energía en la etapa de aireación, la naturaleza del flujo experimentado por la mezcla y las burbujas de gas en la etapa de aireación, y la viscosidad y la temperatura de la mezcla. Además, la etapa de aireación debería ser suficientemente larga para conseguir el grado de aireación deseado (es decir, índice de aireación). La congelación puede tener lugar simultáneamente con la aireación, por ejemplo, en un

intercambiador de calor de superficie raspada. La congelación y aireación simultáneas pueden ayudar a la formación de pequeñas burbujas de gas debido al aumento en la viscosidad de la mezcla conforme se forma el hielo. Si la congelación tiene lugar después de la aireación, preferentemente, se lleva a cabo de manera que se incorpora poco o ningún gas. La congelación parcial puede tener lugar antes de la aireación, pero la mezcla no debe ser congelada hasta el punto de que sea demasiado viscosa para luego ser aireada.

Preferentemente, la  $\beta$ -caseína se proporciona en una forma aislada, purificada, enriquecida o concentrada. Un procedimiento para el aislamiento a gran escala de  $\beta$ -caseína se describe en Food Chemistry vol. 99 (2006), páginas 45-50. Como alternativa, podría ser proporcionada como leche, leche en polvo, concentrado de leche o cualquier otra forma de caseinato, que está enriquecida en  $\beta$ -caseína. La  $\beta$ -caseína se encuentra no sólo en la leche bovina, sino también en la leche de otros mamíferos, por ejemplo, leche de cabra, de oveja, de búfalo o de camello. La  $\beta$ -caseína a partir de cualquier fuente de la leche puede ser usada en los dulces helados de la invención.

Los dulces helados aireados pueden contener también otras proteínas. Las fuentes adecuadas de proteína de la leche incluyen caseinatos, tales como caseinato de sodio; suero, suero en polvo y concentrados/aislados de proteínas de suero de leche; fuentes de proteína de la leche que contienen micelas de caseína (por ejemplo, leche entera, desnatada o semidesnatada, leche en polvo, concentrados de leche, crema y yogur) siempre que la relación de  $\beta$ -caseína libre a  $\beta$ -caseína total sea al menos el valor mínimo especificado. También pueden usarse proteínas no lácteas, tales como proteína de soja. En una realización, el dulce helado tiene un contenido total de proteína del 1 al 8% en peso, más preferentemente, del 2 al 5% en peso. Los helados, yogures helados y sorbetes contienen, típicamente, proteínas en estas cantidades. En otra realización, el dulce helado aireado es un producto de tipo sorbete que contiene menos del 1% de proteína en peso.

Debido a que la  $\beta$ -caseína es muy eficaz en la producción de pequeñas burbujas, no se necesitan otros agentes de aireación, tales como hidrofobinas y ésteres de sacarosa. De esta manera, en una realización, el dulce helado aireado no contiene hidrofobina. En otra realización, el dulce helado aireado no contiene éster de sacarosa.

Los dulces helados aireados pueden comprender grasa. Preferentemente, la composición congelada tiene un contenido de grasa de al menos el 2%, preferentemente, de al menos el 4%, más preferentemente, de al menos el 7%, y como máximo el 20%, preferentemente, como máximo el 15%, más preferentemente, como máximo el 12%. Las grasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, grasa láctea, aceite de coco, aceite de palma y aceite de girasol.

Los dulces helados aireados pueden comprender también emulsionante (tal como mono- y di-glicéridos de ácidos grasos saturados o insaturados, lecitina y yema de huevo) y/o estabilizador (tal como goma de algarroba, goma guar, agar, alginatos, carragenano, pectina, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano y xantano). Preferentemente, el emulsionante y el estabilizante están presentes cada uno a un nivel del 0,05 al 1% en peso del dulce helado. Además, los dulces helados aireados pueden contener aromatizantes y/o colorantes. Pueden incluirse también pedazos de chocolate, nuez, jengibre, galleta, fruta, puré de fruta y similares.

Después de las etapas de congelación y de aireación, el contenido de hielo puede ser aumentado adicionalmente mediante operaciones subsiguientes de congelación, tales como extrusión a baja temperatura, congelación en reposo en un molde, dejando caer porciones de la mezcla aireada directamente en un baño de fluido criogénico, tal como nitrógeno líquido o colocando un recipiente que contiene la mezcla aireada en un entorno frío, tal como un túnel de congelación rápida, túnel de endurecimiento o un almacén frigorífico. La etapa de congelación subsiguiente se lleva a cabo, preferentemente, a una tasa de cizallamiento baja o nula, de manera que se incorpora poco o ningún gas adicional.

Ahora, la presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los ejemplos siguientes, que son ilustrativos y no limitativos, y las figuras, en las que:

La Figura. 1 muestra una representación esquemática de una micrografía que ilustra el concepto de marco protector.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Sorbetes

Se prepararon dulces helados aireados de tipo sorbete usando las formulaciones proporcionadas en la Tabla 1.

Tabla 1

<b>Ingrediente (% en peso)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Leche desnatada en polvo	7,14	7,14
$\beta$ -caseína	1,5	1,0
Sacarosa	22,0	22,0
Goma xantano	0,2	0,2
Agua	Hasta 100	Hasta 100

5 La leche desnatada en polvo (SMP) contenía aproximadamente el 35% de proteína, el 0,8% de grasa, el 3,7% de humedad y se obtuvo de United Milk, Reino Unido. La goma de xantano (Keltrol RD dispersable en frío) se obtuvo de CP Kelco. La  $\beta$ -caseína se obtuvo de Sigma-Aldrich y contenía > 90% de proteína.

En primer lugar, los ingredientes secos se mezclaron entre sí y, a continuación, se añadió a agua a temperatura ambiente mientras se agitaba. La solución se pasteurizó manteniéndola a 82°C durante 5 minutos y, a continuación, se enfrió a 5°C y se almacenó durante dos horas.

10 A continuación, 80 ml (aproximadamente 90 g) de cada mezcla se sometieron a cizallamiento y se congelaron simultáneamente en un "tanque de agitación". El tanque de agitación es un recipiente cilíndrico, encamisado, de acero inoxidable, montado verticalmente, con dimensiones internas de 105 mm de altura y 72 mm de diámetro. La tapa ocupa una gran parte del recipiente, dejando un volumen de trabajo de 160 ml. El rotor usado para cizallar la muestra consiste en un impulsor rectangular de las dimensiones correctas para raspar la superficie interior del recipiente conforme gira (72 mm x 41,5 mm). Unidas también al rotor, hay dos palas semi-circulares de alto cizallamiento (60 mm de diámetro) posicionadas en un ángulo de 45° con respecto al impulsor rectangular. El recipiente está rodeado por una camisa a través de la cual puede hacerse fluir un refrigerante de etilenglicol. El flujo de refrigerante a través de la camisa se pone en marcha y se detiene mediante una válvula en la línea de suministro de refrigerante que desvía el flujo. Una sonda de resistencia de platino está montada en la tapa para permitir la medición de la temperatura de la mezcla durante el procesamiento. Un medidor de par de torsión montado en el eje permite el aumento de la viscosidad de la mezcla durante la congelación a monitorizar.

25 Usando este dispositivo, la mezcla fue sometida a cizallamiento haciendo girar el impulsor con el fin de incorporar aire. Simultáneamente, el refrigerante se bombeó alrededor de la camisa del recipiente para refrigerar y congelar la mezcla. El impulsor raspó también la pared interior, retirando el hielo formado allí e incorporándolo al resto de la mezcla. Se usaron las siguientes condiciones de procedimiento. El refrigerante (-18°C) se hizo circular tan pronto como el cizallamiento se inició con el impulsor a una velocidad inicial de 100 rpm durante 1 minuto. A continuación, la velocidad de rotación se aumentó a 1.000 rpm durante 2 minutos adicionales para airear la mezcla. A continuación, la velocidad de rotación se redujo a 300 rpm para permitir un mayor enfriamiento y congelación. Cuando la temperatura del producto había alcanzado aproximadamente entre -5°C y -6°C y el par final del eje era de aproximadamente 1 Nm, se detuvieron la circulación del refrigerante y el impulsor. Esto requirió aproximadamente entre 4 y 5 minutos. Finalmente, el producto se retiró del recipiente y su índice de aireación se midió pesando un volumen conocido de producto. Se colocaron muestras de aproximadamente 15 g en recipientes pequeños, se enfrió en hielo seco durante 20 minutos y, a continuación, se almacenó en un congelador a -80°C antes de su análisis mediante microscopía.

35 Las cantidades de  $\beta$ -caseína libre y  $\beta$ -caseína total en los productos A y B se determinaron mediante el procedimiento descrito anteriormente (para B, se usó una solución modelo con la misma composición de proteínas en lugar de una muestra del dulce helado). Éstas se compararon con las cantidades esperadas, estimadas a partir de la formulación sobre la base siguiente: la leche desnatada en polvo contiene el 35% de proteína, 80% de la cual es caseína; 33% de este 80% es  $\beta$ -caseína; la fuente de  $\beta$ -caseína libre contiene el 90% de  $\beta$ -caseína. Las cantidades se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2

	A	B
Leche desnatada en polvo (% en peso del dulce helado)	7,14	7,14
Proteína total de SMP (% en peso)	2,50	2,50
Caseína total de SMP (% en peso)	2,00	2,00
$\beta$ -caseína de SMP (% en peso)	0,67	0,67
Fuente de la $\beta$ -caseína libre (% en peso del dulce helado)	1,50	1,0
Free $\beta$ -caseína (% en peso)	1,35	0,9
$\beta$ -caseína libre / $\beta$ -caseína total estimada (%)	67	58
$\beta$ -caseína libre / $\beta$ -caseína total medida (%)	55	40

Las proporciones estimadas y medidas de  $\beta$ -caseína libre/total difieren debido a que la estimación ignora el equilibrio dinámico entre la  $\beta$ -caseína libre y la  $\beta$ -caseína unida en las micelas. De esta manera, en realidad, hay algo menos de  $\beta$ -caseína libre presente de lo estimado.

#### Microscopía Electrónica de Barrido

La microestructura de cada producto se visualizó usando microscopía electrónica de barrido a baja temperatura. Cada muestra se enfrió a  $-80^{\circ}\text{C}$  en hielo seco, y una sección de aproximadamente 5 mm x 5 mm x 10 mm de tamaño, se cortó y se montó en un porta-muestras usando un Tissue Tek: compuesto OCT<sup>TM</sup> (PVA 11%, Carbowax 5% y 85% de componentes no reactivos). La muestra que incluye el porta-objetos se sumergió en nitrógeno líquido fundente y se transfirió a una cámara de preparación de baja temperatura (Oxford Instruments CT1500HF). La cámara se mantuvo bajo vacío, aproximadamente  $10^{-4}$  bar. La muestra se calentó hasta  $-90^{\circ}\text{C}$  durante 60 a 90 segundos, grabando, de esta manera, lentamente el hielo con el fin de revelar los detalles superficiales no causados por el propio hielo. A continuación, la muestra se enfrió a  $-110^{\circ}\text{C}$  y se recubrió con oro usando plasma de argón con una presión aplicada de  $10^{-1}$  milibares y corriente de 6 miliamperios durante 45 segundos. La muestra se transfirió finalmente a un microscopio electrónico de barrido convencional (JSM 5600), provisto de una etapa fría Oxford Instruments mantenida a una temperatura de  $-160^{\circ}\text{C}$ . La muestra se examinó y las áreas representativas se capturaron mediante software de adquisición digital de imágenes.

#### Cuantificación de las distribuciones de tamaños de burbuja de gas

La distribución de tamaños (diámetro) de burbujas de gas, tal como se usa en la presente memoria, se define como la distribución de tamaños obtenida a partir de la representación bidimensional de la microestructura tridimensional, tal como se visualiza en la micrografía SEM, determinada usando la siguiente metodología.

Las imágenes de las muestras se toman con 3 aumentos diferentes (por razones que se explican más adelante), y la distribución de tamaños de burbuja de una muestra se obtiene a partir de este conjunto de micrografías en tres etapas:

1. Identificación y dimensionamiento de las burbujas de gas individuales en las micrografías;
2. Extracción de la información de tamaño a partir de cada micrografía;
3. Combinación de los datos a partir de las micrografías en una única distribución de tamaños.

De manera conveniente, la totalidad de estas etapas, diferentes a la identificación inicial de las burbujas de gas, pueden ser realizadas automáticamente en un ordenador, por ejemplo, usando software tal como el software MATLAB R2006a (MathWorks, Inc.).

#### Identificación y dimensionamiento de las burbujas de gas individuales en las micrografías

En primer lugar, un operario entrenado (es decir, un operario familiarizado con las microestructuras de los sistemas

aireados) traza los contornos de las burbujas de gas en las imágenes SEM digitales usando una interfaz gráfica de usuario. El operario entrenado es capaz de distinguir las burbujas de gas con respecto a los cristales de hielo (que están presentes en los productos helados aireados y que tienen un tamaño del mismo orden de magnitud) debido a que las burbujas de gas son objetos aproximadamente esféricos de brillo/oscuridad variable mientras que los cristales de hielo son objetos de forma irregular con una apariencia uniforme de color gris.

En segundo lugar, el tamaño se calcula a partir del contorno seleccionado midiendo el área máxima tal como se ve en la sección transversal bidimensional de la micrografía (A) tal como se ha definido por el operario y multiplicando ésta por un factor de escala definido por el aumento del microscopio. El diámetro de la burbuja se define como el diámetro circular d equivalente:

$$d = 2\sqrt{A/\pi}$$

Esta es una definición exacta del diámetro de la sección transversal bidimensional a través de una esfera perfecta. Debido a que la mayoría de las burbujas de gas son aproximadamente esféricas, esta es una buena medida del tamaño.

**Extracción de la información de tamaño a partir de cada micrografía**

Las burbujas de gas que tocan el borde de una micrografía sólo son visibles parcialmente. Debido a que, por lo tanto, no es posible determinar su superficie, éstas deben ser excluidas. Sin embargo, al hacerlo, se introducen errores sistemáticos: (i) el número de burbujas de gas por unidad de área es subestimada, y (ii) grandes burbujas de gas son rechazadas de manera relativamente más frecuente, ya que es más probable que éstas toquen el borde, distorsionando, de esta manera, la distribución de tamaños. Para evitar estos errores, se introduce un marco protector (tal como se describe en John C. Russ, "The Image Processing Handbook", 2ª edición, CRC Press, 1995). El concepto marco protector usa una frontera virtual para definir una zona interna dentro de la micrografía. La zona interna forma la zona de medición a partir de la cual se obtiene información imparcial de tamaño, tal como se ilustra en la Figura 1 (una representación esquemática de una micrografía, en la que las burbujas de gas que tocan el borde exterior de la micrografía se han representado en su totalidad, aunque en realidad sólo sería observada la parte que cae dentro de la micrografía real).

Las burbujas se clasifican en 5 clases dependiendo de su tamaño y posición en la micrografía. Se incluyen las burbujas que caen totalmente dentro de la zona interior (etiquetadas clase 1). También se incluyen las burbujas que tocan el borde de la micrografía virtual (clase 2) (debido a que es sólo un borde virtual, hay un conocimiento completo de estas burbujas). Están excluidas las burbujas que tocan el borde de la micrografía real (clase 3) y/o que caen dentro de la zona exterior (clase 4). La exclusión de las burbujas de la clase 3 introduce un sesgo, pero esto se compensa incluyendo las burbujas en la clase 2, resultando en una estimación no sesgada de la distribución de tamaños. Las burbujas muy grandes, es decir, aquellas mayores que la anchura de la zona exterior (clase 5), pueden estar tanto en el borde virtual (interior) como en el borde exterior real y, por lo tanto, deben ser excluidos, introduciendo de nuevo un sesgo. Sin embargo, este sesgo sólo existe para las burbujas que son más anchas que la zona exterior, de manera que puede evitarse excluyendo todas las burbujas de al menos este tamaño (independientemente de si cruzan o no el borde real). Esto establece efectivamente un límite superior para el tamaño de las burbujas de gas que pueden ser medidas de manera fiable en una micrografía particular. La anchura de la zona interior se elige para ser el 10% de la altura vertical de la micrografía, como un compromiso entre la burbuja más grande que puede ser dimensionada (en la resolución de la micrografía particular) y el área de la imagen que se desecha efectivamente (la zona exterior).

También hay límite de tamaño mínimo (en la resolución de la micrografía) por debajo del cual el operario no puede trazar de manera fiable burbujas de gas redondas. Por lo tanto, las burbujas que son más pequeñas que un diámetro de 20 píxeles son ignoradas también.

**Combinación de los datos a partir de las micrografías en una única distribución de tamaño**

Tal como se ha explicado anteriormente, es necesario introducir tamaños de burbuja máximos y mínimos límite. Con el fin de que estos tamaños mínimo y máximo sean suficientemente pequeños y grandes, respectivamente, para no excluir un número considerable de burbujas, las imágenes de las muestras se toman en 3 aumentos diferentes: 100x, 300x y 1.000x. Cada aumento proporciona información en un rango diferente, proporcionada en la Tabla 3.

Tabla 3

Aumento	Tamaño mínimo de burbuja	Tamaño máximo de burbuja
100x	20 $\mu\text{m}$	83 $\mu\text{m}$
300x	6,6 $\mu\text{m}$	28 $\mu\text{m}$
1.000x	2,0 $\mu\text{m}$	8,3 $\mu\text{m}$

De esta manera, se cuentan burbujas tan pequeñas como 2  $\mu\text{m}$  y tan grandes como 83  $\mu\text{m}$ . Una inspección visual de las micrografías con un aumento alto y bajo, respectivamente, confirmó que esencialmente todas las burbujas estaban dentro de este rango de tamaños. Los aumentos se eligen de manera que exista una superposición entre los rangos de tamaño de los diferentes aumentos (por ejemplo, las burbujas de gas con un tamaño de 20-28  $\mu\text{m}$  están cubiertas por las dos micrografías de 100x y 300x) para asegurar que no hay huecos entre los rangos de tamaño. Con el fin de obtener datos robustos, se dimensionan al menos 500 burbujas; esto puede conseguirse, típicamente, analizando una micrografía a 100x, una o dos a 300x y de dos a cuatro a 1.000x para cada muestra.

La información de tamaño a partir de las micrografías a diferentes aumentos se combina finalmente en un único histograma de distribución de tamaños. Las burbujas con un diámetro de entre 20  $\mu\text{m}$  y 28  $\mu\text{m}$  se obtienen a partir de las micrografías 100x y 300x, mientras que las burbujas con un diámetro mayor de 28  $\mu\text{m}$  se extraen sólo de las micrografías 100x. Se evita un doble recuento de burbujas en los intervalos de tamaño superpuestos teniendo en cuenta el área total que se usó para obtener la información de tamaño en cada uno de los rangos de tamaño (que depende del aumento), es decir, es el número de burbujas de un cierto tamaño por unidad de área contada. Esto se expresa matemáticamente, usando los parámetros siguientes:

$N$  = número total de celdas de gas obtenidas en las micrografías

$d_k$  = la  $k$ -ésima celda de gas contorneada siendo  $k \in [1, N]$

$A_i$  = el área de la zona interna en la  $i$ -ésima micrografía

$R_i$  = el rango de diámetros comprendidos en la  $i$ -ésima micrografía (por ejemplo, [20  $\mu\text{m}$ , 83  $\mu\text{m}$ ])

$B(j)$  = el  $j$ -ésimo contenedor que cubre el rango de diámetros:  $[jW, (j+1)W)$

El área total,  $S(d)$ , usada para contar las burbujas de gas con diámetro  $d$  es proporcionada mediante la adición de las áreas de las zonas interiores ( $A_i$ ) en las micrografías para las que  $d$  está dentro de su rango de tamaños ( $R_i$ ).

$$S(d) = \sum_{i|d \in R_i} A_i$$

La distribución de tamaños final se obtiene mediante la construcción de un histograma que consiste en contenedores de ancho  $W$   $\mu\text{m}$ .  $B(j)$  es el número de burbujas por unidad de área en el  $j^{\text{o}}$  contenedor (es decir, en el rango de diámetro  $j \times W$  a  $(j+1) \times W$ ).  $B(j)$  se obtiene mediante la adición de todas las contribuciones individuales de las burbujas de gas con un diámetro en el rango de diámetro  $j \times W$  a  $(j+1) \times W$ , con el coeficiente apropiado, es decir  $1/S(d)$ .

$$B(j) = \sum_{k \in D} 1/S(d_k)$$

en la que

$$D_j = \{k | d_k \in [jW, (j+1)W)\}$$

Las distribuciones de tamaño de burbuja se describen convenientemente en términos de la frecuencia acumulada normalizada, es decir, el número total de burbujas con un diámetro de hasta un tamaño determinado, expresado como un porcentaje del número total de burbujas medidas.

**Resultados**

5 La frecuencia acumulada normalizada en diámetros de burbuja de 20 y 10  $\mu\text{m}$  para los productos A y B se resume en la Tabla 4. Se eligen los tamaños de 20 y 10  $\mu\text{m}$  debido a que son sustancialmente más pequeños que el tamaño promedio de las burbujas de gas en los dulces helados aireados convencionales (típicamente de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ ), de manera que un producto que contiene un número considerable de burbujas de gas por debajo 20 o 10  $\mu\text{m}$  contiene un gran número de pequeñas burbujas en comparación con un producto estándar.

Tabla 4

<b>Producto</b>	<b>% de burbujas &lt; 20 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>% de burbujas &lt; 10 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b><math>\beta</math>-caseína libre / <math>\beta</math>-caseína total medida (%)</b>
<b>A</b>	0,99	0,97	55
<b>B</b>	0	0	40

10 El número de burbujas con un diámetro menor de 20  $\mu\text{m}$  depende de la relación de  $\beta$ -caseína libre a  $\beta$ -caseína total. Para una relación  $\beta$ -caseína libre: $\beta$ -caseína total inferior al 45% (producto B) hay muy pocas burbujas pequeñas, mientras que por encima de esta relación (producto A) hay un número considerable de burbujas pequeñas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dulce helado aireado que comprende al menos el 0,2% en peso de  $\beta$ -caseína libre, en el que la  $\beta$ -caseína libre constituye más del 45% de la  $\beta$ -caseína total presente en el producto de dulce helado, y que contiene una población de burbujas de gas, en la que al menos el 65% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 20  $\mu\text{m}$ .
- 5 2. Dulce helado aireado según la reivindicación 1, en el que al menos el 50% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 10  $\mu\text{m}$ .
3. Dulce helado aireado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la cantidad de  $\beta$ -caseína libre es de al menos el 0,5% en peso.
- 10 4. Dulce helado aireado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la  $\beta$ -caseína libre constituye al menos el 50% de la  $\beta$ -caseína total presente en el dulce helado.
5. Dulce helado aireado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene un índice de aireación de entre el 20% y el 400%.
6. Dulce helado aireado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un helado, sorbete y yogur helado.
7. Un procedimiento de producción de un producto alimenticio aireado, comprendiendo el procedimiento:
  - 15 a) proporcionar una mezcla de ingredientes que comprende al menos el 0,2% en peso de  $\beta$ -caseína libre, en el que la  $\beta$ -caseína libre constituye más del 45% de la  $\beta$ -caseína total presente en el dulce helado;
  - b) airear la mezcla de manera que se forme una población de burbujas de gas, en la que al menos el 65% de las burbujas de gas tienen un diámetro de menos de 20  $\mu\text{m}$ ;
  - c) congelar la mezcla;
- 20 en el que las etapas b) y c) podrán realizarse simultáneamente o en cualquier orden.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la mezcla de ingredientes comprende una fuente de  $\beta$ -caseína aislada, purificada o parcialmente purificada, enriquecida o concentrada.

Fig.1.

