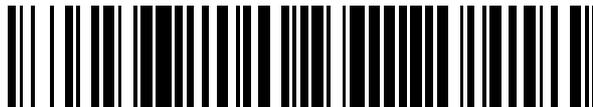


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 517**

51 Int. Cl.:

A23G 9/20 (2006.01)
A23G 9/38 (2006.01)
A23G 9/48 (2006.01)
A23G 9/32 (2006.01)
A23G 9/52 (2006.01)
A23G 9/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11764164 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2624705**

54 Título: **Procedimiento de producción de un hidrato de gas comestible**

30 Prioridad:

04.10.2010 EP 10186348

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

12.02.2016

73 Titular/es:

**UNILEVER N.V. (100.0%)
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**CEBULA, DERYCK JOZEF;
TELFORD, JULIA HELEN;
WILLIAMS, ANDREA y
ZHU, SHIPING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 559 517 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de un hidrato de gas comestible

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos comestibles de hidrato de gas e hielo, y productos de confitería helados que comprenden dichos compuestos.

Antecedentes de la invención

10 Los productos de confitería helados que contienen un hidrato de un gas tal como dióxido de carbono (CO₂) u óxido nitroso (N₂O) proporcionan una agradable sensación burbujeante o gaseosa cuando se consumen. Dichos productos se divulgan por ejemplo en los documentos WO 94/02414, WO 97/16980 y US 4.398.394. Los hidratos de gas (conocidos también como clatratos) se producen normalmente poniendo en contacto el gas con agua bajo alta presión y reduciendo a continuación la temperatura. Generalmente, se usa un exceso de agua de manera que se forme un producto compuesto que consiste en cristales de hidrato de gas en hielo. A continuación, el producto compuesto es molido típicamente en partículas y se mezcla con los otros ingredientes del producto de confitería helado (por ejemplo, un jarabe o una mezcla que contiene azúcar, sabor, proteína, grasa, etc.). El hidrato de gas se forma usando agua esencialmente pura, ya que la presencia de otros ingredientes (tales como azúcar, color, sabor, etc.) disminuye la capacidad de control del procedimiento y/o reduce la estabilidad del producto.

15 El documento WO 02/34065 divulga un procedimiento de preparación de una bebida carbonatada en el que partículas de hidrato de dióxido de carbono se mezclan con un componente de jarabe. Se afirma que los jarabes que contienen azúcar no deberían añadirse antes de la terminación de la reacción CO₂-hidrato ya que esto hace que la reacción sea menos estable ya que los jarabes tienden a formar espuma. Cuando se usa un jarabe edulcorado artificialmente, puede añadirse antes de la formación del hidrato. Cuando se usa dicho un jarabe, pueden añadirse pectina y goma guar al producto durante el mezclado para prevenir la separación. No hay ninguna sugerencia de que puedan añadirse otras sustancias antes de la formación del hidrato.

20 El documento US 5 538 745 divulga un procedimiento de producción de productos de confitería helados mediante la mezcla de partículas de azúcar encapsulado en grasa en una solución aireada congelada de proteína de la leche. Se afirma que los cristales de hielo de clatrato puedan formarse mediante la adición de CO₂, N₂, N₂O o mezclas de los mismos a la solución de proteína. Estos gases pueden comprender hasta el 100% de los gases usados para airear la solución. La proteína de leche está presente en cantidades típicas para un helado, es decir, > 5% en peso.

25 La "actividad" del hidrato de gas, es decir, la cantidad de gas atrapado por unidad de peso del hielo, depende de las condiciones de temperatura y presión en las que se produce el hidrato de gas, así como de las cantidades relativas de gas y agua que se ponen en contacto entre sí.

30 Es deseable poder producir hidratos de gas con una mayor actividad y nuestra solicitud co-pendiente WO 2010/069770 divulga que los compuestos de hidrato de gas e hielo que tienen una actividad incrementada pueden ser producidos siempre que un agente de aireación esté presente durante la formación del hidrato de gas. Aunque el documento WO 2010/069770 proporciona hidratos de gas con una actividad incrementada, los enfoques alternativos son también altamente deseables.

Breve descripción de la invención

35 Los presentes inventores han encontrado ahora que los compuestos de hidrato de gas e hielo que tienen una actividad incrementada pueden ser producidos siempre que una proteína estructurante de hielo (PEH) esté presente durante la formación del hidrato de gas.

40 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un producto compuesto comestible de hidrato de gas e hielo que comprende del 0,0001 al 2% en peso de una proteína estructurante de hielo.

Preferentemente, el producto compuesto comestible consiste esencialmente en hielo, el hidrato de gas y la proteína estructurante de hielo.

45 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un producto compuesto comestible de hidrato de gas e hielo, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una solución acuosa con dióxido de carbono u óxido nitroso a una presión suficientemente alta para formar un hidrato de gas, pero a una temperatura que previene la formación; y a continuación
- b) reducir la temperatura de la solución para formar el hidrato de gas e hielo;

caracterizado porque la solución acuosa contiene del 0,0001 al 2% en peso de una proteína estructurante de hielo.

Preferentemente, el gas es dióxido de carbono.

Preferentemente, la proteína estructurante de hielo es una proteína estructurante de hielo de tipo III.

5 Preferentemente, la proteína estructurante de hielo está presente en la solución acuosa en una cantidad del 0,001 al 2% en peso, más preferentemente del 0,01 al 1% en peso.

Preferentemente, la solución acuosa consiste esencialmente en agua, el gas y la proteína estructurante de hielo.

En una realización, la etapa a) se realiza en un recipiente de presión que a continuación se coloca en un congelador en la etapa b).

10 En otra realización, en la etapa b) la solución acuosa se hace pasar bajo presión a través de un extrusor con un cilindro refrigerado.

Preferentemente, el procedimiento de la invención es seguido por la combinación del producto compuesto con los ingredientes restantes para formar un producto de confitería helado.

Preferentemente, el producto compuesto constituye del 5 al 50% en peso, preferentemente del 10 al 20% en peso del producto de confitería helado.

15 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un producto de confitería helado que comprende un producto compuesto comestible del primer aspecto de la invención.

Descripción detallada de la invención

20 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 comúnmente por una persona con conocimientos ordinarios en la materia (por ejemplo, en la fabricación de productos de confitería helados). Las definiciones y las descripciones de los diversos términos y técnicas usados en la fabricación de productos de confitería helados se encuentran en Ice Cream, 6ª Edición, Robert T. Marshall, H. Douglas Goff y Richard W. Hartel (2003), Kluwer Academic/Plenum Publishers. A menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes se refieren al porcentaje en peso en base al producto de confitería helado.

Breve descripción de los dibujos

25 La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a la Figura 1 que muestra el diagrama de fases para hidratos de dióxido de carbono.

Hidratos de gas y su producción

30 Un hidrato de gas es un sólido cristalino que consiste en una molécula de gas rodeada por una jaula de moléculas de agua. De esta manera, esto es similar al hielo, excepto que la estructura cristalina tiene una molécula de gas huésped dentro de la jaula de moléculas de agua. Muchos gases tienen tamaños moleculares adecuados para formar hidratos, incluyendo dióxido de carbono y óxido nitroso. Los hidratos de gas tienen una fórmula estequiométrica particular: para el hidrato de gas de dióxido de carbono es $\text{CO}_2 \cdot 5,75\text{H}_2\text{O}$. Sin embargo, los cristales de hidratos de gas son inestables a presión atmosférica (incluso a temperaturas de almacenamiento frías típicas). Por lo tanto, cuando los hidratos de gas se preparan para su uso en productos de confitería helados, típicamente se usa un exceso de agua (es decir, más agua que la indicada por la relación estequiométrica) de manera que se forme un producto compuesto de cristales de hidrato de gas en hielo. En efecto, el hielo actúa como un recipiente de presión microscópico que previene que el hidrato de gas se descomponga durante la fabricación y el almacenamiento. Al calentarlo (por ejemplo, en la boca cuando se consume), la capa de hielo alrededor de los cristales de hidratos de gas se derrite y el hidrato de gas se descompone, liberando el gas. Esto proporciona una sensación "efervescente" similar a la de las bebidas carbonatadas.

40 Las condiciones de temperatura y presión adecuadas para la formación de dióxido de carbono o hidratos de gas de óxido nitroso pueden derivarse de los diagramas de fase de la combinación de gas-líquido acuoso respectiva, que están disponibles en la literatura. Por ejemplo, el diagrama de fases para los hidratos de gas de dióxido de carbono se proporciona en la Figura 1. En la etapa a), la solución acuosa de la proteína estructurante de hielo y dióxido de carbono se presuriza a una presión de aproximadamente 10 bar (10^6 Pa) o superior, preferentemente de 15 a 45 bar. La temperatura es superior a 0°C, preferentemente tal como aproximadamente 5°C. En la etapa b), la temperatura se reduce por debajo de 0°C (por ejemplo, -10 o -20°C), formando de esta manera el producto compuesto de hidrato de gas/hielo sólido.

45 Los hidratos de gas pueden prepararse como se indica a continuación. En primer lugar, la proteína estructurante de hielo se disuelve en agua. A continuación, la solución se presuriza (usando dióxido de carbono u óxido nitroso o mezclas de los

mismos). La solución puede ser enfriada para ayudar a la disolución del gas. Preferentemente, la solución acuosa consiste esencialmente en agua y la proteína estructurante de hielo, junto con el gas, de manera que no hay otras sustancias presentes en cantidades significativas (por ejemplo, la solución acuosa contiene menos del 1% en peso, preferentemente menos del 0,1% en peso de otras sustancias). En esta etapa, la temperatura de la solución es preferentemente tan baja como sea posible sin entrar en la parte del diagrama de fases en la que se forma el hidrato de gas. Después de permitir suficiente tiempo para que el gas se disuelva la solución acuosa se congela, resultando en partículas de hidrato de gas encapsuladas en hielo.

Este procedimiento puede llevarse a cabo como un procedimiento por lotes, por ejemplo la solución gasificada acuosa se pone en un recipiente a presión que a continuación se coloca en un congelador durante la etapa de congelación. De manera alternativa, el procedimiento puede ser un procedimiento continuo. Por ejemplo la solución gasificada acuosa (preferentemente a una temperatura de 0°C a 15°C) puede hacerse pasar bajo presión (por ejemplo, 10 bares o superior) a través de un extrusor (por ejemplo, un extrusor de tornillo) con un cilindro enfriado. Preferentemente, la temperatura de cilindro cerca del extremo de salida es de -50°C a -10°C. La presión se mantiene por la formación de un tapón congelado de producto dentro del extrusor, preferentemente en o cerca de la salida del extrusor. De esta manera, el extrusor permite la creación de las condiciones de temperatura y presión requeridas para la formación de hidratos de gas.

Proteína estructurante de hielo

Las proteínas estructurantes de hielo (PEH) son proteínas que pueden influir en la forma y tamaño de los cristales de hielo formados durante la congelación, e inhiben la recrystalización del hielo (Clarke et al, 2002, Cryoletters 23: 89-92; Marshall et al, Ice Cream, 6ª Edición, ibid.). Muchas de estas proteínas se identificaron originalmente en organismos que viven en entornos con una temperatura bajo cero y se cree que protegen al organismo de los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo en las células del organismo. Por esta razón, muchas proteínas estructurantes de hielo se conocen también como proteínas anticongelantes (PACs). En el contexto de la presente invención, una PEH se define como una proteína que tiene actividad inhibidora de la recrystalización del hielo (RI).

Las propiedades de actividad inhibidora de la recrystalización del hielo pueden medirse convenientemente por medio de un ensayo de aplastamiento modificado tal como se describe en el documento WO00/53029:

Se transfieren 2,5 µl de la solución bajo investigación en 30% (p/p) de sacarosa a un cubreobjetos circular transparente de 16 mm, etiquetado apropiadamente. Un segundo cubreobjetos se coloca en la parte superior de la gota de solución y el sándwich se presiona conjuntamente entre el dedo y el pulgar. El sándwich se deja caer en un baño de hexano mantenido a -80°C en una caja de hielo seco. Una vez preparados todos los sándwiches, los sándwiches se transfieren desde el baño de hexano a -80°C a la cámara de visualización que contiene hexano mantenido a -6°C usando fórceps pre-enfriados en el hielo seco. Tras la transferencia a -6°C, puede observarse que los sándwiches cambian de un aspecto transparente a un aspecto opaco. Las imágenes se graban con cámara de vídeo y se introducen en un sistema de análisis de imágenes (LUCIA, Nikon) usando un objetivo 20x. Las imágenes de cada aplastamiento se registran en el tiempo = 0 y de nuevo después de 60 minutos. El tamaño de los cristales de hielo en ambos ensayos se compara colocando los portaobjetos en una cabina de criostato de temperatura controlada (Bright Instrument Co Ltd, Huntington, UK). Las imágenes de las muestras se transfieren a un sistema de análisis de imágenes Quantimet 520 MC (Leica, Cambridge UK) por medio de una cámara de vídeo Sony CCD monocroma.

El dimensionamiento del cristal de hielo puede ser realizado manualmente alrededor de los cristales de hielo. Típicamente, se dimensionan al menos 100 a 400 cristales para cada muestra. El tamaño de los cristales de hielo se considera como la dimensión más larga de la proyección 2D de cada cristal. El tamaño de cristal medio se determina como el promedio en número de los tamaños de los cristales individuales. Se compara el tamaño de los cristales de hielo en ambos ensayos. Si el tamaño a los 30-60 minutos es similar o sólo moderadamente (menos del 10%) aumentado en comparación con el tamaño en t = 0, y/o el tamaño del cristal es menor de 20 micrómetros, preferentemente de 5 a 15 micrómetros, esta es una indicación de buenas propiedades de recrystalización de cristales de hielo.

Una actividad inhibidora de la recrystalización de hielo significativa puede definirse como cuando una solución de 0,01% en peso de la PEH en 30% en peso de sacarosa, enfriada rápidamente (al menos $\Delta 50^\circ\text{C}$ por minuto) a -40°C, se calentada rápidamente (al menos $\Delta 50^\circ\text{C}$ por minuto) a -6°C y, a continuación, mantenida a esta temperatura resulta en un aumento en el tamaño medio de cristales de hielo durante una hora de menos de 5 µm.

Las PEHs para uso según la presente invención pueden derivarse de cualquier fuente siempre que sean adecuadas para su inclusión en productos alimenticios. Las PEHs se han identificado hasta la fecha en peces, plantas, líquenes, hongos, microorganismos e insectos. Además, se han descrito un número de PEHs sintéticas.

Los ejemplos de productos de PEH de pescado son AFGP (por ejemplo, obtenible de bacalao del Atlántico, bacalao de Groenlandia y bacalao), PEH Tipo I (por ejemplo obtenible de la platija de invierno, limanda nórdica, cabracho, *Myoxocephalus aeneus*), PEH tipo II (por ejemplo obtenible de charrasco, pejerrey y arenque del Atlántico) e PEH tipo III

(por ejemplo obtenible de faneca, pez lobo del Atlántico, *Ulvaria subbifurcata*, *Pholis gunnellus* y licode de Laval).

5 Las PEHs de Tipo III son particularmente preferidas. Las PEHs de Tipo III tienen típicamente un peso molecular de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 14 kDa, una estructura secundaria en sándwich beta y una estructura terciaria globular. Un número de genes que codifican las PEH de tipo III han sido clonados (Davies y Hew, 1990, FASEB J. 4: 2460-2468). Una PEH de tipo III particularmente preferida es HPLC-12 de tipo III (Nº de Acceso P19614 en la base de datos de proteínas Swiss- Prot).

Las PACs de líquen se describen en los documentos W099/37673 y WO01/83534.

10 Los ejemplos de plantas en las que se han obtenido las PEHs se describen en los documentos WO98/04699 y W098/4148 e incluyen mostaza de ajo, *Aster cordifolius*, avena de primavera, berro de invierno, colza, coles de Bruselas, zanahoria (nº de acceso en GenBank CAB69453), *Dicentra cucullaria*, euforbias, lirios de día, cebada de invierno, hoja de agua de Virginia, plantago de hoja estrecha, plantago, hierba de estepa, pasto azul de Kentucky, chopo americano, roble blanco, centeno de invierno (Sidebottom y col., 2000, Nature 406: 256), dulcamara, patata, pampolina, diente de león, trigo de invierno y primavera, triticale, vinca, violeta y hierba.

15 Las PEHs pueden ser obtenidas mediante extracción a partir de fuentes nativas mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo los procedimientos de aislamiento descritos en los documentos WO98/04699 y W098/4148.

De manera alternativa, las PEH pueden obtenerse mediante el uso de tecnología recombinante. Por ejemplo, para las células anfitrionas, típicamente microorganismos o células vegetales, pueden modificarse para expresar las PEHs y, a continuación, las PEHs pueden ser aisladas y usadas según la presente invención. Las técnicas para introducir construcciones de ácidos nucleicos que codifican las PEHs en células anfitrionas son bien conocidas en la técnica.

20 Típicamente, una célula anfitriona u organismo apropiados serían transformados por una construcción de ácido nucleico que codifica la PEH deseada. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido puede ser insertada en un vector de expresión adecuado que codifica los elementos necesarios para la transcripción y traducción y de una manera que se expresarán en condiciones apropiadas (por ejemplo, en una orientación apropiada y un marco de lectura correcto y con secuencias objetivo y de expresión apropiadas). Los procedimientos requeridos para construir estos vectores de expresión son bien conocidos para las personas con conocimientos en la materia.

25 Pueden usarse un número de sistemas de expresión para expresar la secuencia codificante del polipéptido. Estos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos (incluyendo levadura), sistemas celulares de insectos, sistemas de cultivo de células vegetales y plantas, todos ellos transformados con los vectores de expresión apropiados. Los huéspedes preferidos son los que se consideran de calidad alimentaria ("considerados generalmente como seguros" (Generally Regarded As Safe, GRAS)).

30 Las especies fúngicas adecuadas incluyen levaduras tales como (pero sin limitarse a) las de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizo Saccharomyces* y similares, y especies fúngicas filamentosas tales como (pero sin limitarse a) las de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Neurospora*, *Fusarium* y similares. Preferentemente, las especies seleccionadas son una levadura, más preferentemente una especie de *Saccharomyces* tales como *S. cerevisiae*. Cuando la glicosilación de la PEH conduce a una menor actividad, entonces es preferente que el anfitrión exhiba una glicosilación reducida de proteínas heterólogas. Una amplia diversidad de plantas y sistemas de células vegetales pueden ser transformadas también con las construcciones de ácido nucleico de los polipéptidos deseados. Los ejemplos de especies de plantas incluyen maíz, tomate, tabaco, zanahorias, fresas, semilla de colza y remolacha azucarera.

40 Las secuencias que codifican las PEHs son preferentemente idénticas al menos al 80% al nivel de aminoácidos con una PEH identificada en la naturaleza, más preferentemente al menos el 95% o el 100% idénticas. Sin embargo, las personas con conocimientos en la materia pueden realizar sustituciones conservadoras u otros cambios de aminoácidos que no reduzcan la actividad RI de la PEH. Para los propósitos de la invención, estas PEHs que poseen este alto nivel de identidad con relación a una PEH natural están incluidas también dentro del término "PEHs".

45 La cantidad de proteína estructurante de hielo en la solución acuosa es al menos el 0,0001% en peso, preferentemente al menos el 0,001, más preferentemente al menos el 0,01% en peso, más preferentemente al menos el 0,1% en peso. La cantidad de proteína estructurante de hielo es menor del 2% en peso, preferentemente menor del 1% en peso, más preferentemente menor del 0,5% en peso, más preferentemente menor del 0,25% en peso.

50 Los presentes inventores han encontrado que el producto compuesto hidrato de gas/hielo producido de esta manera tiene una actividad más alta (cantidad de gas atrapado por unidad de peso de hielo) que cuando se realiza sin proteína estructurante de hielo. Preferentemente, la actividad es al menos el 5%, más preferentemente al menos el 10%, más preferentemente al menos el 15% mayor que cuando no se usa la proteína estructurante de hielo (con las mismas condiciones de procesamiento).

5 El producto compuesto de hidrato de gas/hielo es concebido generalmente como un aditivo para productos de confitería helados para hacerlos burbujeantes en la boca. De esta manera, después de la producción, típicamente el producto compuesto es disuelto en partículas del tamaño requerido (por ejemplo, ~ 1-5 mm), por ejemplo mediante molienda. A continuación, las piezas pueden ser envasadas directamente, o pueden ser mezcladas con una salsa o incorporadas en un producto de confitería helado, tal como helado, sorbete o polo para formar un producto final.

10 La expresión "producto de confitería helado" significa un producto alimenticio fabricado con sabor dulce destinado al consumo en estado helado (es decir, bajo condiciones en donde la temperatura del producto alimenticio es menor de 0°C y preferentemente bajo condiciones en las que el producto alimenticio comprende cantidades significativas de hielo). Los productos de confitería helados incluyen helado, sorbete, yogur helado, polo, helado de leche, etc. Los productos de confitería helados tales como helado y yogur helado contienen típicamente grasas, proteínas (tales como proteína de la leche) azúcares, junto con otros ingredientes menores tales como estabilizantes, emulsionantes, colores y aromas. Típicamente, el polo contiene, en peso de la composición, el 15-25% de azúcares junto con estabilizadores, colores y aromas.

15 Típicamente, los otros ingredientes ya se han combinado para producir un producto de confitería helado (por ejemplo, helado) o una salsa/almíbar, en la que se mezclan las partículas de hidrato de gas/hielo. Preferentemente, el producto compuesto de hidrato de gas/hielo comestible constituye del 5 al 50% en peso, preferentemente del 10 al 20% en peso del producto de confitería helado total. Después de combinar el hidrato de gas con los otros ingredientes, el producto de confitería helado puede ser sometido a una etapa de congelación adicional (por ejemplo, endurecimiento) y, a continuación, puede ser envasado.

20 La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los ejemplos, que son solamente ilustrativos y no limitativos.

Ejemplo 1

25 El hidrato de dióxido de carbono se preparó usando el procedimiento siguiente. Un recipiente de presión (volumen interno 0,5 l) se colocó en un baño de agua a 5°C. Se colocaron 300 g de una solución acuosa de proteína estructurante de hielo (PEH) en el interior del recipiente de presión, junto con un agitador magnético. El recipiente se presurizó a 20 bar con dióxido de carbono, y se mantuvo a 5°C con agitación durante 6 horas. Al final de este tiempo, la alimentación de dióxido de carbono se desconectó (sin liberar la presión), el recipiente se selló y, a continuación, se colocó en un congelador a -20°C durante la noche para formar un pedazo de hielo que contenía cristales de hidrato de dióxido de carbono. A continuación, el hielo se retiró del recipiente de presión y se rompió en pedazos. Se tomaron muestras de aproximadamente 20 g para las mediciones de actividad.

La PEH usada fue de PEH HPLC12 de tipo III (de Martek Biosciences Kingstree Corporación). También se produjeron muestras de control sin usar PEH.

35 La actividad de las muestras se midió como sigue. Aproximadamente 10 g del producto compuesto de hidrato de hielo/gas se selló en una lata de aerosol. La lata y su contenido se equilibraron a temperatura ambiente, de manera que el hielo se derritió y el hidrato se descompuso, liberando el gas. A continuación, se midió la presión de gas del espacio de cabeza usando un medidor de presión Druck DPI 705. La actividad se calcula como el volumen de dióxido de carbono (ml) liberado por gramo de muestra de producto compuesto usando el cálculo siguiente.

40 La lata sellada (volumen total V) contiene una masa conocida (M) y un volumen V_s del producto compuesto, que contiene una cantidad de dióxido de carbono que debe determinarse (es decir, la actividad, A). La lata contiene también un volumen ($V-V_s$) de aire que está inicialmente a temperatura T_0 (tomada como 0°C (273°K)) y presión atmosférica, P_0 ($1,0 \times 10^5$ Pa). A continuación, el sistema se calienta a la temperatura ambiente T (tomada como 19,85°C (293°K)), y el hielo se derrite, liberando dióxido de carbono. En el equilibrio final, la lata contiene un volumen V_1 de líquido, en el que se disuelven parte del aire y del dióxido de carbono. La mezcla gaseosa restante de aire y dióxido de carbono tiene un volumen ($V-V_1$) y una presión, P que se mide. Se supone que el aire y el dióxido de carbono se comportan como gases ideales. Mediante la aplicación de la ley de los gases ideales y la conservación de la masa y conociendo las densidades del hielo (920 kgm^{-3}) y el agua (1.000 kgm^{-3}), la actividad (A) puede calcularse como:

$$A = \frac{RT_0}{MP_0} \cdot \frac{Z + H_c}{H_c} \cdot \left[\frac{P(V - V_l)}{RT} - \left(\frac{H_a P_0 (V - V_s)}{RT_0 (Z + H_a)} \right) \right]$$

en la que

5

$$Z = \frac{mRT}{m_w (V - V_l)}$$

10

H_a es la solubilidad del aire ($6,73 \times 10^9 \text{ Nm}^{-2}$) y H_c es la solubilidad del dióxido de carbono ($1,42 \times 10^8 \text{ Nm}^{-2}$). R es la constante de los gases ideales ($8,31 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y m_w es el peso molecular del agua (18 gmol^{-1}). Se llevaron a cabo tres ciclos de producción de clatrato para cada solución. Se midieron seis muestras para cada ciclo de producción de clatrato, y las actividades medias (expresadas como $\text{ml CO}_2/\text{g}$ de producto) se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1

Aditivo	Cantidad (% en peso)	Actividad (ml/g)	Aumento (%)
Ninguno	-	17,45	-
PEH III	0,005	19,55	10,74
PEH III	0,05	21,10	17,30

15

El ejemplo muestra que las proteínas estructurantes del hielo aumentan la actividad de los productos compuestos de hidrato de gas/hielo resultantes.

Diversas características y realizaciones de la presente invención, a las que se hace referencia en las secciones individuales anteriores se aplican, en su caso, a otras secciones, *mutatis mutandis*. Por consiguiente, las características especificadas en una sección pueden combinarse con las características especificadas en otras secciones, según corresponda.

20

REIVINDICACIONES

1. Un producto compuesto comestible de dióxido de carbono o hidrato de gas de óxido nitroso e hielo, **caracterizado porque** comprende del 0,0001 al 2% en peso de una proteína estructurante de hielo.
- 5 2. Un procedimiento de producción de un producto compuesto comestible de hidrato de gas e hielo, en el que el procedimiento comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto una solución acuosa con dióxido de carbono u óxido nitroso a una presión suficientemente alta para formar un hidrato de gas, pero a una temperatura que previene la formación; y a continuación
 - b) reducir la temperatura de la solución para formar el hidrato de gas e hielo; **caracterizado porque** la solución acuosa contiene del 0,0001 al 2% en peso de una proteína estructurante de hielo.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el gas es dióxido de carbono.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la proteína estructurante de hielo es una proteína estructurante de hielo de tipo III.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la proteína estructurante de hielo está presente en una cantidad del 0,001 al 1% en peso.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la proteína estructurante de hielo está presente en una cantidad del 0,01 al 0,5% en peso.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la solución acuosa consiste esencialmente en agua, el gas y la proteína estructurante de hielo.
- 20 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la etapa a) es realizada en un recipiente de presión que a continuación se coloca en un congelador en la etapa b).
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que en la etapa b) la solución acuosa se hace pasar bajo presión a través de un extrusor con un cilindro refrigerado.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, seguido por la combinación del producto compuesto con el resto de ingredientes para producir un producto de confitería helado.
- 25 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el producto compuesto constituye del 5 al 50% en peso, preferentemente del 10 al 20% en peso del producto de confitería helado.
12. Un producto de confitería helado que comprende un compuesto comestible según la reivindicación 1.

Figura 1

