



**República Federativa do Brasil**  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0513602-4 B1**

**(22) Data do Depósito:** 27/06/2005

**(45) Data de Concessão:** 29/09/2015  
**(RPI 2334)**



---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO CONGELADA, COMPOSIÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO CONGELADO E USOS DE HIDROFOBINA CLASSE II

**(51) Int.Cl.:** A23L 2/66; A23L 2/54; A23C 9/154; A23C 9/152; A23C 11/06; A23G 1/44; A23G 3/44; A23G 9/38; A23L 1/305

**(30) Prioridade Unionista:** 27/07/2004 EP 04254483.3, 03/03/2005 EP 05251282.9

**(73) Titular(es):** UNILEVER N.V.

**(72) Inventor(es):** DEBORAH LYNNE ALDRED, MARK JOHN BERRY, DERYCK JOZEF CEBULA, ANDREW RICHARD COX, MATTHEW DUNCAN GOLDING, SARAH LOUISE GOLDING, ROBERT DANIEL KEENAN, MARK EMMETT MALONE, SARAH TWIGG

**“COMPOSIÇÃO CONGELADA, COMPOSIÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE  
UM PRODUTO ALIMENTÍCIO CONGELADO E USOS DE HIDROFOBINA DE  
CLASSE II”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se a produtos congelados que incluem hidrofobinas.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] Durante a armazenagem, os cristais presentes nos produtos congelados tendem a aumentar no tamanho como resultado de processos dinâmicos, tal como a recristalização. Isto pode levar a características pobres do produto, tais como uma aparência pobre e um gosto inaceitável e/ou danos ao produto. Foi sugerido anteriormente o uso de proteínas denominadas "proteínas anti-congelantes" (também conhecidas como "proteínas de estruturação do gelo") para inibir o processo da recristalização do gelo.

**DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[003] Foi verificado que uma classe de proteínas encontradas nos fungos, denominadas hidrofobinas, também tem a capacidade de inibir o crescimento de cristais de gelo em produtos congelados.

[004] Por conseguinte, a presente invenção apresenta uma composição congelada, tal como um produto alimentício congelado, que compreende hidrofobina, de preferência a hidrofobina na forma isolada. Em um aspecto correlato, a presente invenção apresenta uma composição congelada, tal como um produto alimentício congelado, que compreende a hidrofobina em uma forma que tem a capacidade de montagem em uma superfície de ar-líquido e uma composição congelada, tal como um produto alimentício congelado, ao qual foi adicionada hidrofobina na dita forma.

[005] De preferência, a hidrofobina é uma hidrofobina da classe II.

[006] Em uma realização preferida, a hidrofobina está presente

menos 0,01% em peso.

Em uma realização, a composição congelada é aerada. Em uma outra realização, a composição congelada é não aerada.

Em um aspecto correlato, a presente invenção apresenta uma  
5 composição para a obtenção de um produto de alimento congelado da invenção, em que a composição compreende hidrofobina, de preferência a hidrofobina na forma isolada, em conjunto com pelo menos um dos ingredientes restantes do produto de alimento, e a composição se apresenta na forma não congelada. De preferência, a composição compreende todos os  
10 ingredientes restantes do produto de alimento.

Em uma realização correlata, a presente invenção apresenta uma composição seca para a obtenção de um produto de alimento congelado da invenção, em que a composição compreende hidrofobina, de preferência a hidrofobina na forma isolada, em conjunto com pelo menos um dos  
15 ingredientes não líquidos restantes do produto de alimento. De preferência, a composição compreende todos os ingredientes não líquidos restantes do produto de alimento.

A presente invenção também apresenta o uso de uma hidrofobina em um método de inibição do crescimento de cristais de gelo em uma  
20 composição congelada. De preferência, a hidrofobina é usada para inibir a recristalização do gelo.

Em um aspecto correlato, a presente invenção também apresenta o uso da hidrofobina em um método de modificação do hábito de cristais de gelo em uma composição congelada.

25 Em um aspecto correlato, a presente invenção também apresenta um método de inibição do crescimento de cristais de gelo, por exemplo, a recristalização do gelo, em uma composição congelada, sendo que o método compreende a adição de hidrofobina à composição antes e/ou durante o

congelamento da composição.

Em um aspecto correlato, a presente invenção também apresenta um método de modificação do hábito de cristais de gelo em uma composição congelada, sendo que o método compreende a adição de hidrofobina à  
5 composição antes e/ou durante o congelamento do produto.

Em uma realização preferida dos usos e métodos descritos acima, a composição é um produto de alimento congelado.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A menos que esteja definido de alguma outra maneira, todos os  
10 termos técnicos e científicos aqui empregados têm o mesmo significado que é normalmente compreendido por um elemento versado na técnica (por exemplo, na manufatura de confeitos resfriados e confeitos congelados, na química e na biotecnologia). As definições e as descrições de vários termos e técnicas empregados na manufatura de confeitos resfriados/congelados são  
15 encontradas em Ice Cream, 4ª Edição, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY. As técnicas padrão usadas para os métodos moleculares e bioquímicos podem ser encontradas em Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3ª ed. (2001) Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., e em Ausubel et al., Short  
20 Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. - e a versão completa intitulada Current Protocols in Molecular Biology).

### **HIDROFOBINAS**

As hidrofobinas constituem uma classe bem definida de proteínas (Wessels, 1997, Adv. Microb. Physio. 38: 1 - 45; Wosten, 2001, Annu Rev.  
25 Microbiol. 55: 625 - 646) com capacidade de auto-montagem em uma interface hidrofóbica/hidrofílica, e tem uma sequência conservada:

X<sub>n</sub>-C-X<sub>5</sub>-9-C-C-X<sub>11</sub>-39-C-X<sub>8</sub>-23-C-X<sub>5</sub>-9-C-C-X<sub>6</sub>-18-C-X<sub>m</sub> (SEQ IDNo. 1)

onde X representa qualquer aminoácido, e n e m representam

independentemente um número inteiro positivo. Tipicamente, uma hidrofobina tem um comprimento de até 125 aminoácidos. Os resíduos de cisteína (C) na sequência conservada fazem parte de pontes de bissulfeto. No contexto da presente invenção, o termo hidrofobina tem um significado mais amplo para

5 incluir as proteínas funcionalmente equivalentes que ainda exibem a característica de auto-montagem em uma interface hidrofóbica-hidrofílica, o que resulta em uma película de proteína, tais como as proteínas que compreendem a sequência:

$X_n-C-X1-50-X-X0-5-C-C1-100-C-X1-100-C-X1-50-C-X0-5-C-X1-50-C-X_m$  (SEQ ID No. 2)

ou partes da mesma que ainda exibem a característica de auto-

10 montagem em uma interface hidrofóbica-hidrofílica que resulta em uma película de proteína. De acordo com a definição da presente invenção, a auto-montagem pode ser detectada mediante a adsorção da proteína ao Teflon e ao usar dicroísmo circular para estabelecer a presença de uma estrutura secundária (em geral, alfa-hélice) (De Vocht et al., 1998, Biophys. J.74: 2059 -

15 68).

A formação de uma película pode ser estabelecida ao incubar uma folha de Teflon na solução da proteína seguida por pelo menos três lavagens com água ou tampão (Wosten et al., 1994, Embo. J. 13: 5848 - 54). A película de proteína pode ser visualizada por qualquer método apropriado, tal

20 como a etiquetagem com um marcador fluorescente ou através do uso de anticorpos fluorescentes, tal como é bem estabelecido no estado da técnica. m e n têm tipicamente valores que variam de 0 a 2.000, mas mais comumente m e n no total são menores do que 100 ou 200. A definição de hidrofobina no contexto da presente invenção inclui proteínas de fusão de uma hidrofobina e

25 um outro polipeptídeo, bem como conjugados de hidrofobina e outras moléculas tais como polissacarídeos.

As hidrofobinas identificadas até a presente data são em geral

classificadas como classe I ou classe II. Ambos os tipos foram identificados nos fungos como as proteínas secretadas que se auto-montam em interfaces hidrofóbicas em películas anfipáticas. As montagens de hidrofobinas da classe I são relativamente insolúveis, ao passo que aquelas de hidrofobinas da classe II se dissolvem de imediato em uma variedade de solventes.

Proteínas parecidas com hidrofobinas também foram identificadas nas bactérias filamentosas, tais como *Actinomycete* e *Streptomyces* sp. (WO01/74864). Estas proteínas bacterianas, ao contrário das hidrofobinas fungais, formam até somente uma ponte do bissulfeto, uma vez que elas têm somente dois resíduos de cisteína. Tais proteínas são um exemplo de equivalentes funcionais para as hidrofobinas que têm as seqüências de consenso mostradas nas SEQ ID no. 1 e 2, e estão dentro do âmbito da presente invenção.

As hidrofobinas podem ser obtidas pela extração de fontes nativas, tais como fungos filamentosos, por qualquer processo apropriado. Por exemplo, as hidrofobinas podem ser obtidas através do cultivo de fungos filamentosos que secretam a hidrofobina no meio de crescimento ou da extração das micelas fungais com etanol a 60%. É particularmente preferível o isolamento das hidrofobinas dos organismos hospedeiros que secretam hidrofobinas naturalmente. Os hospedeiros preferidos são os hipomicetes (por exemplo, *Trichoderma*), basidiomicetes e ascomicetes. Os hospedeiros particularmente preferidos são organismos da classe de alimentos, tais como *Cryphonectria* parasítica, que secreta uma hidrofobina denominada criparina (MacCabe eand Van Alfen, 1999, App. Environ. Microbiol. 65: 5431 - 5435).

Alternativamente, as hidrofobinas podem ser obtidas pelo uso de tecnologia recombinante. Por exemplo, células hospedeiras, tipicamente micro-organismos, podem ser modificadas para que expressem hidrofobinas, e as hidrofobinas podem então ser isoladas e usadas de acordo com a presente

invenção. As técnicas para introduzir os construtos de ácido nucléico que codificam hidrofobinas em células hospedeiras são bem conhecidas no estado da técnica. Mais de 34 genes que codificam para hidrofobinas foram clonados, de mais de 16 espécies fungais (consultar, por exemplo, o pedido de patente  
5 WO 96/41882 que fornece a seqüência de hidrofobinas identificadas em *Agaricus bisporus*; e em Wosten, 2001, *Annu Rev. Microbiol.* 55: 625 - 646). A tecnologia recombinante também pode ser usada para modificar seqüências de hidrofobina ou sintetizar novas hidrofobinas que têm propriedades desejadas/incrementadas.

10               Tipicamente, uma célula ou um organismo hospedeiros apropriados são transformados por um construto de ácido nucléico que codifica a hidrofobina desejada. A codificação da seqüência de nucleotídeo para o polipeptídeo pode ser inserida em um vetor de expressão apropriado que codifica os elementos necessários para a transcrição e a tradução e de uma  
15 maneira tal que serão expressos sob condições apropriadas (por exemplo, na orientação apropriada e na estrutura de leitura correta e com seqüências apropriadas de seleção e de expressão). Os métodos requeridos para construir estes vetores de expressão são bem conhecidos dos elementos versados na técnica.

20               Uma série de sistemas da expressão pode ser usada para expressar a seqüência de codificação de polipeptídeo. Estes incluem, mas sem ficar a eles limitados, bactérias, fungos (incluindo leveduras), sistemas de células de insetos, sistemas de cultura de células de plantas, e plantas, todos transformadas com os vetores de expressão apropriados. Os hospedeiros  
25 preferidos são aqueles que são consideradas como sendo da classe de alimentos - 'geralmente considerados como seguros' (GRAS).

As espécies fungais apropriadas incluem leveduras tais como (mas sem ficar a elas limitadas) aquelas dos gêneros *Saccharomyces*,

Kluyveromyces, Pichia, Hansenula, Candida, Schizo saccharomyces, e outras ainda, e espécies filamentosas tais como (mas sem ficar a elas limitadas) aquelas dos gêneros Aspergillus, Trichoderma, Mucor, Neurospora, Fusarium, e outras ainda.

5                   As seqüências que codificam as hidrofobinas são de preferência pelo menos 80% idênticas ao nível de aminoácido em relação a uma hidrofobina identificada na natureza, com mais preferência pelo menos 95% ou 100% idênticas. No entanto, os elementos versados na técnica podem fazer substituições conservadoras ou outras mudanças de aminoácidos que não  
10       reduzem a atividade biológica da hidrofobina. Para a finalidade da invenção, estas hidrofobinas que possuem este nível elevado de identidade com uma hidrofobina que ocorre naturalmente também estão englobadas dentro do termo "hidrofobinas".

                  As hidrofobinas podem ser purificadas de meios de cultura ou de  
15       extratos celulares, por exemplo, o procedimento descrito no pedido de patente WO 01/57076 que envolve a adsorção da hidrofobina presente em uma solução que contém hidrofobina na superfície e então o contato da superfície com um tensoativo, tais como Tween 20, para eluir a hidrophobia da superfície. Consultar também Collen et al., 2002, Biochim Biophys. Acta 1569: 139 - 50;  
20       Calonje et al., 2002, Can. J. Microbiol. 48: 1030 - 4; Askolin et al., 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 124 - 30; e De Vries et al., 1999, Eur. J. Biochem. 262: 377 - 85.

#### **COMPOSIÇÕES CONGELADAS**

                  As composições congeladas/os produtos congelados incluem  
25       produtos de alimento congelados e materiais biológicos congelados. Os produtos de alimento congelados incluem materiais congelados derivados de plantas, tais como frutas e legumes, materiais congelados derivados de animais, tais como carne e peixe, bem como produtos de alimento processados

congelados, tais como refeições prontas, molhos e confeitos congelados tais como sorvete, leite cremoso, iogurte congelado, sorvete de fruta, massas moles, leite-creme congelado, picolé de fruta, sorvete de massa, granitas e purês congelados.

5                   As composições congeladas da invenção podem ser aeradas ou não aeradas. O termo "aerada" significa que um gás foi incorporado intencionalmente no produto, tal como por meios mecânicos. O gás é de preferência qualquer gás da classe de alimento, tal como o ar, o nitrogênio ou o dióxido de carbono. A extensão da aeração, especialmente no contexto dos  
10 produtos de alimento aerados, é definida tipicamente em termos de "transbordamento". No contexto da presente invenção, a % de transbordamento é definida em termos do volume como:

$$((\text{volume do produto aerado final} - \text{volume da mistura}) / \text{volume da mistura}) \times 100.$$

A quantidade de transbordamento presente no produto irá variar dependendo das características desejadas do produto. Por exemplo, o nível de  
15 transbordamento no sorvete é tipicamente de cerca de 70 a 100%, ao passo que o transbordamento nos sorvetes de fruta é de 25 a 30%.

Uma composição não aerada, tal como um produto de alimento congelado, tem de preferência um transbordamento de menos de 20%, e com mais preferência de menos de 10%. Um produto de alimento congelado não  
20 aerado não é submetido a etapas deliberadas, tal como ao ser batido, para aumentar o teor de gás. No entanto, deve ser apreciado que, durante a preparação dos produtos de alimento congelados não aerados, baixos níveis de gás, tal como o ar, podem ser incorporados ao produto.

#### **PRODUTOS DE CONFEITARIA CONGELADOS**

25                   Os confeitos congelados incluem confeitos que incluem tipicamente o leite e sólidos de leite, tais como sorvetes, leite cremoso, iogurte congelado, sorvete de fruta e leite-creme congelado, bem como confeitos

congelados que não contêm leite nem sólidos de leite, tais como picolés de fruta, sorvetes de massa, granitas e purês congelados.

Os confeitos congelados podem estar na forma de um produto composto no qual pelo menos uma parte ou região do produto, tal como um núcleo ou uma camada, não contém hidrofobina. Um exemplo disto pode ser um produto que contém um núcleo de sorvete que não contém hidrofobina, revestido em uma camada de sorvete, leite cremoso ou picolé de fruta que contém hidrofobina. Deve ser apreciado que, no caso de um produto composto, a quantidade em % em peso de hidrofobina adicionada é calculada apenas em relação aos componentes do confeito que contêm hidrofobina e não em relação ao produto completo.

Os confeitos congelados aerados têm de preferência um transbordamento de 25% a 300%, tal como de 25% a 150%, e com mais preferência de 50 a 150%.

A quantidade de hidrofobina presente no produto irá variar geralmente dependendo da formulação do produto e do volume da fase de ar.

Tipicamente, o produto irá conter pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina, e com mais preferência pelo menos 0,005 ou 0,01% em peso. Tipicamente, o produto irá conter menos de 1% em peso de hidrofobina. A hidrofobina pode ser de uma única fonte ou uma pluralidade de fontes, por exemplo, a hidrofobina pode ser uma mistura de dois ou mais polipeptídeos de hidrofobina diferentes.

De preferência, a hidrofobina é uma hidrofobina da classe II.

A presente invenção também engloba composições para a obtenção de um produto de alimento aerado da invenção, sendo que a composição compreende uma hidrofobina. Em geral, a hidrofobina vai estar em uma forma isolada, tipicamente pelo menos parcialmente purificada, tal como pelo menos 10% ou 20% pura, com base no peso dos sólidos. Desse

modo, a hidroforbina não é adicionado como parte de um organismo que ocorre naturalmente, tal como um cogumelo, que expressa hidroforbinas naturalmente. Ao invés disto, a hidroforbina tipicamente terá sido extraída de uma fonte de ocorrência natural ou então obtida através da expressão  
5 recombinante em um organismo hospedeiro.

Tais composições incluem pré-misturas líquidas, por exemplo, as pré-misturas usadas na obtenção de produtos de confeitaria congelados, e misturas secas, por exemplo, pós, às quais um líquido aquoso, tal como o leite ou a água, é adicionado antes ou durante o congelamento.

10 As composições para a obtenção de um produto de alimento congelado da invenção irão compreender outros ingredientes, além da hidroforbina, que são incluídos normalmente no produto de alimento, por exemplo, açúcar, gordura, emulsificantes, flavorizantes, etc. As composições podem incluir todos os ingredientes restantes requeridos para obter o produto  
15 de alimento de maneira tal que a composição fique pronta para ser processada para formar um produto de alimento aerado da invenção.

As composições secas para a obtenção de um produto de alimento aerado da invenção também irão compreender outros ingredientes, além da hidroforbina, que são normalmente incluídos no produto de alimento,  
20 por exemplo açúcar, gordura, emulsificantes, flavorizantes, etc. As composições podem incluir todos os ingredientes não líquidos restantes requeridos para obter o produto de alimento, de maneira tal que o usuário só precisa adicionar um líquido aquoso, tal como a água ou o leite, e a composição está pronta para ser processada para formar um produto de  
25 alimento aerado da invenção. Estas composições secas, cujos exemplos incluem pós e grânulos, podem ser projetadas para o uso industrial e de varejo, e são beneficiadas com um volume reduzido e uma vida útil mais longa.

A hidroforbina é adicionada a uma composição em uma forma e

em uma quantidade tais que fica disponível para inibir o crescimento de cristais de gelo, tal como a recristalização do gelo, e/ou modificar o hábito dos cristais de gelo. Pelo termo "adicionada", entenda-se que a hidrofobina é introduzida deliberadamente no produto de alimento para a finalidade de tirar vantagem de sua capacidade de inibir o crescimento de cristais de gelo e/ou modificar o hábito dos cristais de gelo. Conseqüentemente, onde estão presentes ou são adicionados ingredientes que contêm contaminadores fungais, que podem conter polipeptídeos de hidrofobina, isto não constitui a adição de hidrofobina dentro do contexto da presente invenção.

10                Tipicamente, a hidrofobina é adicionada ao produto de alimento em uma forma tais que tem a capacidade de auto-montagem em uma superfície de ar-líquido.

                 Tipicamente, a hidrofobina é adicionada às composições da invenção em uma forma isolada, tipicamente pelo menos parcialmente purificada, tal como pelo menos 10% pura, com base no peso dos sólidos. Por "adicionada na forma isolada", entenda-se que a hidrofobina não é adicionada como parte de um organismo natural, tal como um cogumelo, que expressa naturalmente as hidrofobinas. Ao invés disto, a hidrofobina tipicamente terá sido extraída de uma fonte natural ou obtida pela expressão recombinante em um organismo hospedeiro.

20                A hidrofobina adicionada pode ser usada para reduzir ou inibir o crescimento de cristais de gelo, por exemplo, para inibir o processo de recristalização do gelo, e/ou modificar o hábito dos cristais de gelo (ou seja, o formato dos cristais de gelo). A inibição e/ou a modificação podem ocorrer durante o congelamento ou depois do congelamento, por exemplo, durante a armazenagem. A inibição do crescimento de cristais de gelo e/ou do hábito dos cristais de gelo durante o congelamento pode ser usada para alterar a textura do produto. A inibição da recristalização do gelo melhora a estabilidade

co produto em resposta ao abuso térmico.

As hidrofobinas também podem ser usadas para inibir o crescimento de cristais de gelo, tal como a recristalização do gelo, e/ou o hábito dos cristais de gelo em materiais biológicos celulares. Isto vai ajudar a  
5 reduzir os danos às células como resultado dos processos de congelamento usados para preservar materiais biológicos. Tais materiais biológicos incluem culturas de organismos unicelulares e linhagens de células; gametas, por exemplo, espermatozoides e ovos; e tecido e órgãos derivados de organismos multicelulares, tanto vegetais quanto animais.

10 Por conseguinte, a presente invenção também apresenta um material biológico celular congelado que compreende a hidrofobina na forma isolada, de preferência que compreende pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina, contanto que os seres humanos sejam especificamente excluídos.

A presente invenção também apresenta o uso de hidrofobina para  
15 inibir o crescimento de cristais de gelo, tal como a recristalização do gelo/ e/ou modificar o hábito dos cristais de gelo em um material biológico celular congelado. A inibição/modificação pode ser durante e/ou após o congelamento do material biológico.

A presente invenção ainda será agora descrita com referência aos  
20 exemplos a seguir, os quais são apenas ilustrativos e não limitadores.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 é um diagrama que mostra os regimes de cisalhamento para os produtos congelados aerados.

A Figura 2 é uma micrografia eletrônica de varredura de  
25 microestruturas de produto congelado aerado - frescos e após o abuso (Ampliação de 100 vezes).

A Figura 3 é uma micrografia eletrônica de varredura de microestruturas de produto congelado aerado - frescos e após o abuso

(Ampliação de 300 vezes).

A Figura 4 mostra micrografias eletrônicas de varredura de microestruturas de produto não aerado (com HFBII) (Ampliação de 50 vezes).

A Figura 5 mostra micrografias eletrônicas de varredura de microestruturas de produto não aerado (com HFBII) (Ampliação de 50 vezes).

### **EXEMPLO 1 - PRODUTOS CONGELADOS AERADOS**

Os produtos congelados aerados foram preparados ao usar três tipos de proteína:

A: Caseinato de Sódio (Na Cas)

B: Leite em Pó Desnatado (SMP)

C: Hidrofobina (HFBII) de *Trichoderma reesei*

As propriedades microestruturais e físicas dos produtos foram comparadas, tanto antes quanto depois de regimes de abuso da temperatura.

### **MATERIAIS**

Os detalhes dos materiais usados são resumidos na Tabela 1 e as formulações a partir das quais cada um dos produtos congelados aerados foi preparado são mostradas na Tabela 2.

| <b>Ingrediente</b>              | <b>Composição</b>                                                                                                                                                  | <b>Fornecedor</b>            |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Caseinato de sódio              | 88 - 90% de proteína, 1,5% de gordura, 6% de umidade                                                                                                               | DMV International, Holanda   |
| Leite em pó desnatado           | 33 - 36% de proteína, 0,8% de gordura, 3,7% de umidade                                                                                                             | United Milk, Reino Unido     |
| Hidrofobina do tipo II (HFB II) | Purificada de <i>Trichoderma reesei</i> essencialmente tal como descrito no pedido de patente WO 00/58342 e em Linder et al. 2001, <i>Biomacromolecules</i> 2: 511 | VIT Biotechnology, Finlândia |

| Ingrediente           | Composição | Fornecedor                 |
|-----------------------|------------|----------------------------|
|                       | - 517).    |                            |
| Óleo de coco refinado |            | Van den Bergh Foods, Ltd   |
| Sacarose              |            | Tate and Lyle, Reino Unido |

**TABELA 1. MATERIAIS USADOS**

|                          | Mistura A                | Mistura B | Mistura C |
|--------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| Ingrediente              | Concentração / % em peso |           |           |
| Caseinato de sódio       | 2,0                      | --        | --        |
| Leite em pó<br>desnatado | --                       | 11,42     | --        |
| HFB II                   | --                       | --        | 0,2       |
| Óleo de coco             | 5,0                      | 5,0       | 5,0       |
| Sacarose                 | 25,0                     | 20,0      | 25,0      |
| Água                     | 68,0                     | 63,58     | 69,8      |

**TABELA 2. FORMULAÇÕES USADAS****PREPARAÇÃO DOS PRODUTOS CONGELADOS AERADOS****PREPARAÇÃO DA MISTURA (EMULSÃO)**

- 5 Todas as misturas foram feitas em bateladas de 100 g. Para as Misturas A e B (que contêm caseinate de sódio e leite em pó desnatado, respectivamente), a proteína foi combinada com a sacarose e dispersada em água fria ao usar um agitador magnético. A solução foi então aquecida até 60°C com agitação e mantida por cinco minutos antes de ser resfriada até
- 10 40°C. Gordura de coco derretida foi então adicionada, e a mistura aquosa sonicada imediatamente (Branson Sonifer com ponta afunilada de 6,4 mm) por três minutos a uma amplitude de 70% com a ponta bem imersa na solução. A emulsão foi então resfriada rapidamente em um banho de água a -10°C até a temperatura da solução ficar igual a 5°C, para cristalizar as gotas de gordura.

As misturas foram armazenadas a 5°C até um uso adicional.

- Para a Mistura C (que contém HFB II), a sacarose foi dispersada em primeiro lugar em água fria com agitação. Em seguida, metade da concentração requerida de HFB II foi adicionada a esta como uma alíquota. A
- 5 solução foi então sonicada suavemente em um banho sônico por trinta segundos para dispersar totalmente a HFB II. Esta solução foi então agitada em um agitador magnético e aquecida até 40°C. Antes de a gordura derretida ser adicionada, a solução foi sonicada outra vez em um banho sônico por trinta segundos. A gordura derretida foi então adicionada e a mistura foi emulsionada
- 10 e resfriadas tal como descrito para as misturas A e B. Uma outra alíquota de HFB II foi então adicionada a esta solução fria para elevar a concentração da HFB II até 0,2%. O primeiro 0,1% de HFB II foi para emulsionar e estabilizar a gordura. A segunda adição de HFB II deve fornecer o excesso adequado de HFBII para obter uma boa estabilidade de aeração e de espuma.
- 15 A análise do tamanho de partícula nas emulsões frias foi feita ao usar um Malvern Mastersizer 2000.

#### **ANÁLISE DAS EMULSÕES**

- Seguindo esta metodologia, foi possível a obtenção de emulsões com gotas de gordura pequenas. Um resumo dos tamanhos das gotas de óleo
- 20 medidos é mostrado na Tabela 3.

| <b>Mistura</b> | <b>Diâmetro da gota de gordura</b> |
|----------------|------------------------------------|
|                | D(3,2) / $\mu\text{m}$             |
| A (Na Cas)     | 0,4                                |
| B (SMP)        | 0,25                               |
| C (HFB II)     | 1,88                               |

**TABELA 3**

**TAMANHO DE PARTÍCULA DA EMULSÃO TAL COMO MEDIDO AO USAR O MALVERN**

### **MASTERSIZER 2000**

#### **PROCESSO DE CONGELAMENTO COM CISALHAMENTO**

80 ml da mistura foram cisalhados e congelados simultaneamente em um vaso cilíndrico de aço inoxidável com camisa montado verticalmente com proporções internas de 105 mm de altura e 72 mm de diâmetro. A tampa do vaso preenche 54% do volume interno, deixando 46% (180 ml) para a amostra. O rotor usado para cisalhar a amostra consiste em um impulsor retangular das proporções corretas para raspar a borda da superfície do recipiente à medida que este gira (dimensões de 72 mm x 41,5 mm). Também são unidas ao rotor duas pás de alto cisalhamento semi-circulares (60 mm de diâmetro) posicionadas a um ângulo de 45 graus em relação à união retangular. O vaso é circundado por uma camisa através da qual flui o agente refrigerante.

Essencialmente, um protótipo aerado e congelado é produzido tal como segue: A mistura dentro do recipiente encerrado é misturada com um impulsor a uma taxa de cisalhamento elevada a fim de incorporar o ar. Simultaneamente, o agente refrigerante flui em torno da camisa do recipiente para resfriar e congelar a mistura. O impulsor também raspa a parede interna, removendo o gelo que é ali formado e incorporando este ao restante da mistura. O elevado cisalhamento é usado para aerar inicialmente a mistura, e então a taxa de cisalhamento é desacelerada a fim de permitir resfriamento e congelamento melhores. Os regimes de cisalhamento usados para cada mistura são apresentados graficamente na Figura 1.

Para a etapa de congelamento e aeração com as Misturas A e B (que contêm caseinato de sódio e leite em pó desnatado, respectivamente) o agente refrigerante (ajustado em -18°C) foi ajustado para circular a partir do tempo = 0 minuto. A agitação relativamente lenta no início para as Misturas A e B permitiu o resfriamento da mistura e a geração de um pouco de viscosidade

(através da formação e da incorporação de gelo) antes da aeração ao usar um cisalhamento mais elevado. Um tempo curto à alta velocidade incorporou o ar e a velocidade foi então reduzida para permitir que as amostras alcançassem pelo menos  $-5^{\circ}\text{C}$ .

- 5 Para a Mistura C (que contém HFB II) o vaso foi resfriado até cerca de  $5^{\circ}\text{C}$  e a amostra foi adicionada, e o cisalhamento elevado para a aeração foi iniciado. O agente refrigerante (ajustado em  $-18^{\circ}\text{C}$ ) não foi colocado para circular antes de nove minutos devido ao tempo aumentado requerido para gerar 100% de transbordamento. Uma vez que o agente  
10 refrigerante foi colocado para circular (em 9 minutos), foi adotado o mesmo padrão de cisalhamento-resfriamento que o anterior (para A e B).

Ao final do processo, o transbordamento foi medido e as amostras (cerca de 15 g) foram colocados em vasos pequenos. Cada produto foi ainda resfriado por dez minutos em um freezer ajustado em  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de ser  
15 armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **ANÁLISE DE PRODUTOS CONGELADOS AERADOS**

Todos os produtos congelados aerados foram armazenados sob dois regimes de temperatura:

- (a)  $-20^{\circ}\text{C}$ . A análise subsequente foi feita dentro de uma  
20 semana da produção e este produto foi julgado como o produto "fresco".

(b) As amostras submetidas a abusos de temperatura foram colocadas sob armazenagem a  $-10^{\circ}\text{C}$  por uma ou duas semanas, e então armazenadas subsequentemente a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes da análise.

| Amostra    | Tempo de<br>cisalhamento a 1.200<br>rpm | Transbordamento | Temperatura do<br>produto final |
|------------|-----------------------------------------|-----------------|---------------------------------|
|            | min.                                    | %               | $^{\circ}\text{C}$              |
| A (Na Cas) | 1                                       | 103             | -5,3                            |

| Amostra    | Tempo de cisalhamento a 1.200 rpm | Transbordamento | Temperatura do produto final |
|------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|
|            | min.                              | %               | °C                           |
| B (SMP)    | 1                                 | 98              | -8                           |
| B (SMP)    | 1                                 | 94              | -5,6                         |
| C (HFB II) | 10                                | 75              | -5                           |

**TABELA 4.****DETALHES DO PROCESSO E TRANSBORDAMENTO DO PRODUTO PARA OS PRODUTOS****PREPARADOS A PARTIR DAS MISTURAS A, B, E C**

Os produtos finais foram analisados tal como segue:

5

Transbordamento do produto recém produzido

Análise de SEM em produto fresco e submetido a abusos de temperatura

Comportamento de fusão do produto fresco e submetido a abusos de temperatura

10

**TRANSBORDAMENTO**

O transbordamento para cada um dos produtos é resumido na Tabela 4. Todas as misturas eram aeráveis e incorporaram quantidades significativas de ar.

**ESTABILIDADE MICROSTRUCTURAL: METODOLOGIA**

15

**MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)**

A microestrutura de cada um dos produtos foi visualizada ao empregar a Microscopia Eletrônica de Varredura a Baixa Temperatura (LTSEM). A amostra foi resfriada até -80°C em gelo seco e uma seção da amostra foi cortada. Esta seção, com um tamanho de cerca de 5 mm x 5 mm x

20 10 mm, foi montada em um suporte de amostras ao usar um composto Tissue

Tek : OCT TM (11% de PVA, 5% de Carbowax e 85% de componentes não reativos). A amostra incluindo o suporte foi mergulhada em lama de nitrogênio líquido e transferida a uma câmara de preparação de baixa temperatura: Oxford Instrument CT1500HF. A câmara está sob vácuo, cerca de 10<sup>-4</sup> bars, e a amostra é aquecida até -90°C. Gelo é causticado lentamente para revelar os detalhes da superfície não causados pelo próprio gelo, de modo que a água é removida a esta temperatura sob vácuo constante por 60 a 90 segundos. Uma vez registrada, a amostra é resfriada até -110°C culminando com a sublimação, e revestida com ouro ao usar plasma de argônio. Este processo também tem lugar sob vácuo com uma pressão aplicada de 10<sup>-1</sup> milibars e uma corrente de 6 miliamperes por 45 segundos. A amostra é transferida então a um Microscópio Eletrônico de Varredura convencional (JSM 5600), equipado com um estágio frio Oxford Instruments a uma temperatura de -160°C. A amostra é examinada e as áreas de interesse são capturadas através de um software de aquisição de imagem digital.

#### **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE FRATURA DE CONGELADOS (TEM)**

Um pequeno bloco, de cerca de 5 mm x 3 mm x 3 mm foi cortado da amostra sobre uma placa de alumínio colocada sobre um leito de gelo seco ao usar um bisturi frio. O bloco de amostra foi montado verticalmente em um grande suporte de congelados 'de cartola' ao usar o composto Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek, Europe BV). O suporte foi colocado imediatamente no dispositivo de transferência Cressington CFE-50 sob nitrogênio líquido e transferido para a câmara de fratura de congelados (-180°C). A amostra foi fraturada com um único golpe da faca de microtomo oscilante, e então causticada por dez minutos a -95°C. A superfície causticada foi sombreada por rotação (45 graus) com platina/carbono até uma espessura de 2 nm, e então revestida com carbono até uma espessura de 10 nm. A amostra revestida foi removida da câmara e do dispositivo de transferência e a rélica de metal

flutuou da amostra, sobre a água. As peças de réplica foram limpadas em ácido crômico e lavadas várias vezes com água antes de serem coletadas em grades EM de cobre de malha 400. As grades foram colocadas para secar antes do exame por TEM.

5 O exame de TEM foi feito ao usar um microscópio JEOL 1200 EX II operado a 100 kV. As imagens foram obtidas ao usar uma câmera Bioscan e um software Digital Micrograph (Gatan Inc.).

### **ANÁLISE MICROESTRUTURAL: RESULTADOS**

A Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) foi usada para  
10 examinar a microestrutura dos produtos congelados frescos e submetidos a abusos de temperatura. As imagens representativas podem ser vistas nas Figuras 2 e 3 em ampliações diferentes.

Os resultados das amostras frescas revelaram que o produto que contém HFB II (preparado a partir da Mistura C) eram significativa e  
15 surpreendentemente diferentes daqueles que contém proteínas mais convencionais (ou seja, a Mistura A ou B). As diferentes propriedades observadas eram: células de ar menores, cristais de gelo menores, cristais de gelo mais angulares, e cristais de gelo ligeiramente mais acentuados. Para os produtos A e B, o tamanho dos cristais de gelo nas amostras frescas foi  
20 aproximado para ficar com um diâmetro de 50 a 100  $\mu\text{m}$ . Para o produto C, o tamanho dos cristais de gelo foi aproximado para ficar com um diâmetro de 40 a 60  $\mu\text{m}$ .

Depois de serem submetidas a abusos de temperatura, as imagens de SEM mostram claramente que o produto que contém HFB II (da  
25 mistura C) reteve a sua microestrutura original, isto é, há relativamente pouco cristal de gelo aparente e engrossamento de bolhas de ar. Este é o caso depois de uma armazenagem de uma e duas semanas a  $-10^{\circ}\text{C}$ . No entanto, os protótipos que contêm Na Cas e SMP (das Misturas A e B, respectivamente)

mostram um engrossamento muito intenso da estrutura do gás e gelo quando submetidos a abusos de temperatura a  $-10^{\circ}\text{C}$  depois de apenas uma semana.

No total, fica evidente que o produto congelado obtido que contém HFB II exibe uma estabilidade muito maior a abusos de temperatura do que o produto congelado obtido ao usar caseinato de sódio ou leite em pó desnatado. A HFBII tem uma influência tanto no tamanho quanto na estabilidade das bolhas de ar e dos cristais de gelo.

#### **COMPORTAMENTO EM FUSÃO: METODOLOGIA**

Amostras de produto congelado foram colocadas em uma grade de metal à temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Diferenças na maneira na qual os produtos derreteram, principalmente a retenção da forma e a estabilidade de espuma, foram observadas como uma função do tempo.

#### **COMPORTAMENTO EM FUSÃO: RESULTADOS**

Estas diferenças microestruturais (espuma estável e gelo estável) tiveram algum impacto no comportamento em fusão do produto congelado. A amostra congelada aerada produzida a partir da Mistura C (que contém HFBII) reteve melhor o seu formato em fusão, em comparação com o produto obtido com caseinato de sódio ou leite em pó desnatado (isto é, as Misturas A e B, respectivamente).

À medida que o gelo derretia e formava água, ele fluía através da grade de fusão. No entanto, para o produto com HFB II, grande parte da espuma também permaneceu na grade com algumas gotas estáveis de espuma observadas em baixo (dados não mostrados) - nenhuma destas características foi observada com as proteínas convencionais (caseinato de sódio e leite em pó desnatado). Isto ilustra as diferenças na estabilidade da espuma entre cada uma das proteínas usadas.

#### **DIFERENÇAS TEXTURAIS ENTRE OS PRODUTOS A, B, E C**

Diferenças evidentes na textura entre as três amostras também

puderam ser observadas após uma armazenagem de uma semana a  $-10^{\circ}\text{C}$  (isto é, as amostras submetidas a abusos de temperatura). Na manipulação do produto obtido ao usar caseinato de sódio (A) e leite em pó desnatado (B), foi observado que estes têm uma textura muito macia e muito flocosa, o que era difícil de remover de maneira limpa do papel de silício usado para forrar o vaso de amostra. O produto obtido ao usar a HFBII (C), por outro lado, era muito firme e soltou de maneira bastante limpa o forro de papel usado para forrar o vaso de amostra. Em outras palavras, o produto preparado ao usar HFBII exibe uma estabilidade muito maior aos abusos de temperatura em uma escala tanto microscópica quanto macroscópica do que o produto preparado ao usar caseinato de sódio ou leite em pó desnatado.

#### **EXEMPLO 2: PRODUTOS CONGELADOS NÃO AERADOS**

Foram preparadas duas soluções, uma contendo hidrofobina, a HFBII de *Trichoderma reesei*, a outra não. As composições das soluções eram tal como mostrado na Tabela 5.

|             | Amostra 1                | Amostra 2 |
|-------------|--------------------------|-----------|
| Ingrediente | Concentração / % em peso |           |
| HFB II      | 0                        | 0,1       |
| Xantana     | 0,5                      | 0,5       |
| Sacarose    | 25,0                     | 25,0      |
| Água        | 74,5                     | 74,4      |

Tabela 5 - Formulações para os produtos não aerados

A HFBII foi fornecida pela VTT Biotechnology, tal como descrito acima, e a sacarose pela Tate & Lyle. A xantana era de uma classe dispersível em água fria (Keltrol RD) fornecida pela CP Kelco (Atlanta, EUA).

#### **PREPARAÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS CONGELADOS NÃO AERADOS**

Ambas as soluções foram preparadas em bateladas de 100 g. A

solução de sacarose e xantana foi preparada ao adicionar a quantidade requerida de água deionizada à temperatura ambiente a uma mistura seca de sacarose e xantana. Isto foi então misturado ao usar um agitador magnético até os solutos ficarem totalmente dissolvidos. No caso da Amostra 2, a HFBII foi  
5 então adicionada como uma alíquota de uma solução a 5,3 mg/ml, após o que a solução foi misturada outra vez no agitador magnético por mais dez minutos.

O congelamento das soluções não aeradas foi executado de maneira quiescente (ou seja, sem a aplicação simultânea de cisalhamento). Cada solução foi usada para preencher uma pequena placa de Petri com um  
10 volume de 8 ml. Estas foram então colocadas dentro de um gabinete de freezer doméstico a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, e durante esse período ocorreu o congelamento das amostras.

Depois do congelamento, a microestrutura de cada amostra foi analisada por SEM ao empregar o mesmo método de preparação que foi  
15 descrito no Exemplo 1.

#### **ANÁLISE MICROESTRUTURAL - RESULTADOS**

As imagens de SEM representativas de cada amostra a uma ampliação de 50 vezes podem ser vistas nas Figuras 4 e 5. Pode ser discernido que a microestrutura da solução que contém HFBII (amostra 2) é  
20 mais fina e contém cristais de gelo com dimensões características menores. Por exemplo, as estruturas dendríticas alongadas na amostra 1 (Figura 4) são mais largas e mais compridas do que aquelas vistas na amostra 2 (Figura 5). Isso ilustra a influência da hidrofobina na redução do processo de crescimento de cristais de gelo - resultando em cristais com um tamanho menor.

25 As várias características e realizações da presente invenção, indicadas em seções individuais acima, aplicam-se, tal como apropriado, a outras seções, mutatis mutandis. Conseqüentemente, as características especificadas em uma seção podem ser combinadas com as características

especificadas em outras seções, tal como apropriado.

Todas as publicações mencionadas no relatório descritivo acima são aqui incorporadas a título de referência. Várias modificações e variações dos métodos e dos produtos descritos da invenção serão aparentes aos elementos versados na técnica sem que se desvie do âmbito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita com relação a realizações preferidas específicas, deve ficar compreendido que a invenção tal como reivindicada não deve ficar inadequadamente limitada a tais realizações específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para a prática da invenção que são aparentes aos elementos versados nos campos correspondentes devem ficar dentro do âmbito das reivindicações a seguir.

### **REIVINDICAÇÕES**

1.COMPOSIÇÃO CONGELADA, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 0,001% em peso e menos de 1% em peso de hidrofobina de classe II na forma isolada, em que a hidrofobina de classe II é extraída a partir de uma fonte de ocorrência natural ou obtida por expressão recombinante em um organismo hospedeiro, e em que a composição congelada é um produto alimentício, e em que a composição ainda compreende outros ingredientes do produto alimentício, preferencialmente compreende açúcar, gordura, emulsionantes e aromatizantes.

2.COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é não aerada.

3.COMPOSIÇÃO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada pelo fato de que é um produto de confeitaria congelado.

4.COMPOSIÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO CONGELADO, conforme descrita em uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 0,001% em peso e menos de 1% em peso de hidrofobina de classe II na forma isolada em conjunto com os ingredientes restantes do produto alimentício, a composição estando na forma não congelada, e em que a composição ainda compreende outros ingredientes do produto alimentício, preferencialmente compreende açúcar, gordura, emulsionantes e aromatizantes.

5.USO DE HIDROFOBINA DE CLASSE II, caracterizado pelo fato de ser na inibição do crescimento de cristais de gelo, em uma composição congelada.

6.USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a composição congelada é um produto alimentício.

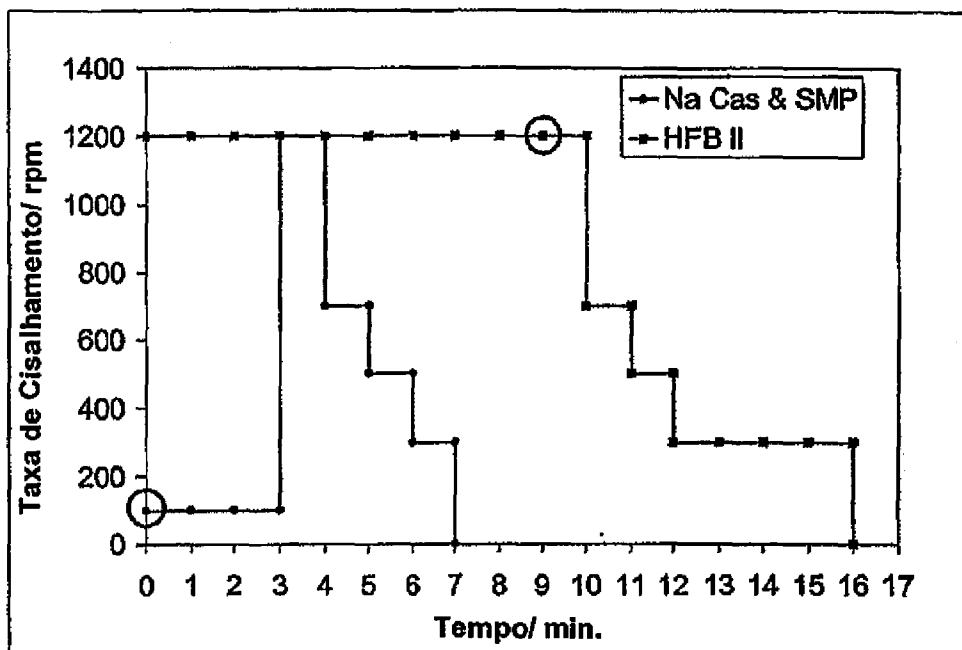
7.USO DE HIDROFOBINA DE CLASSE II, caracterizado pelo fato de ser na modificação do hábito de cristais de gelo em uma composição

congelada.

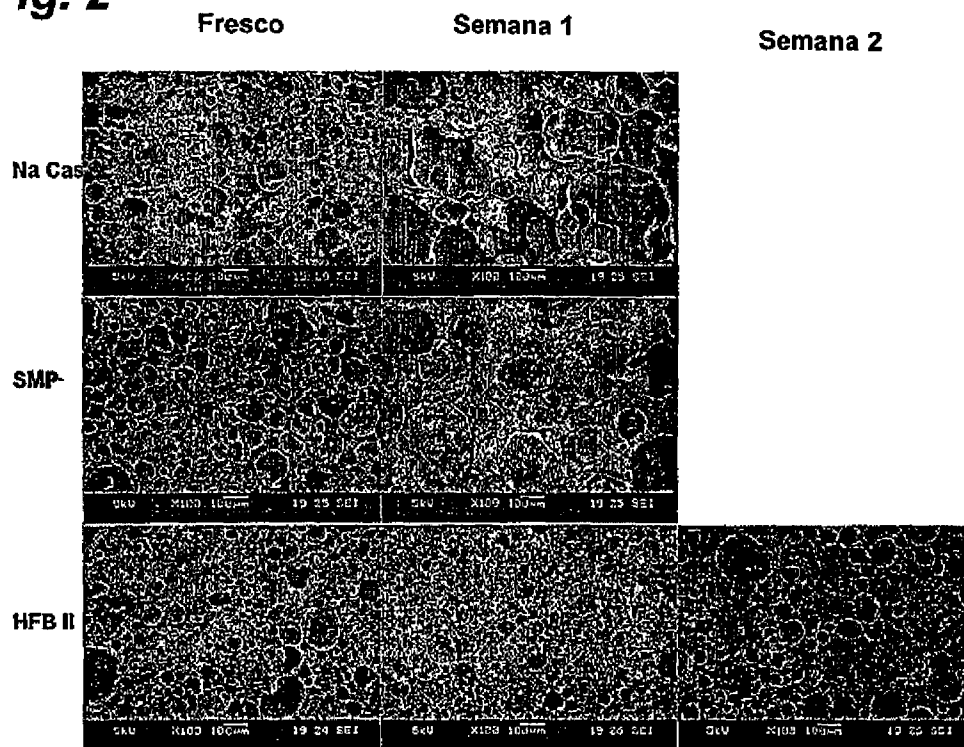
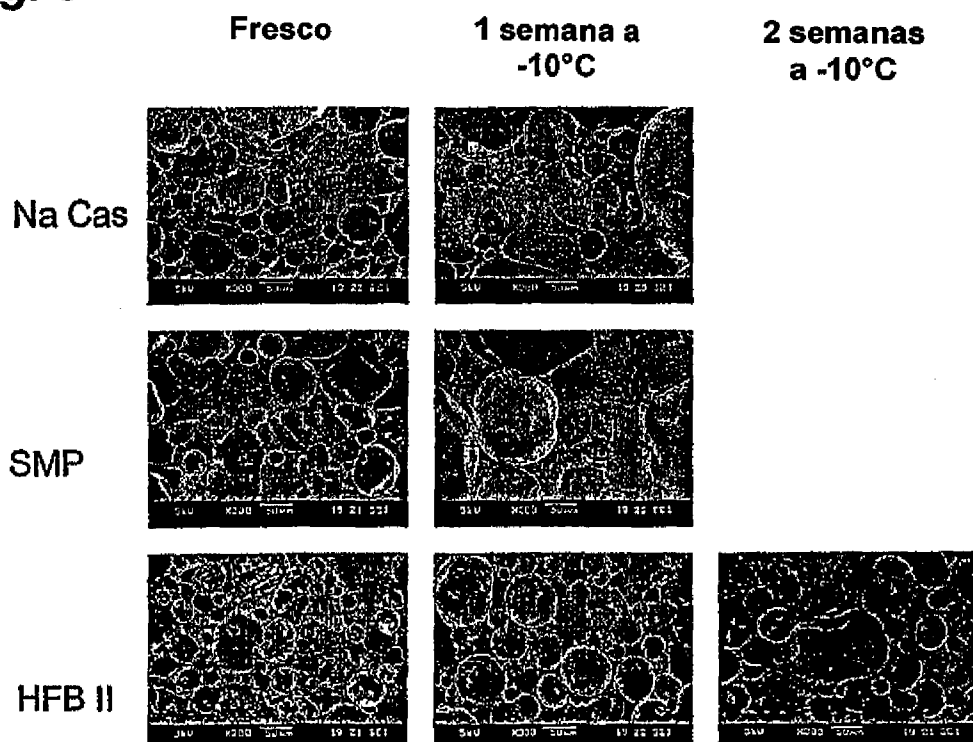
8.USO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a composição congelada é um produto alimentício.

9.USO DE HIDROFOBINA DE CLASSE II, caracterizado pelo fato de ser no aumento da temperatura de tolerância de uma composição congelada.

10.USO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a composição congelada é um produto alimentício.

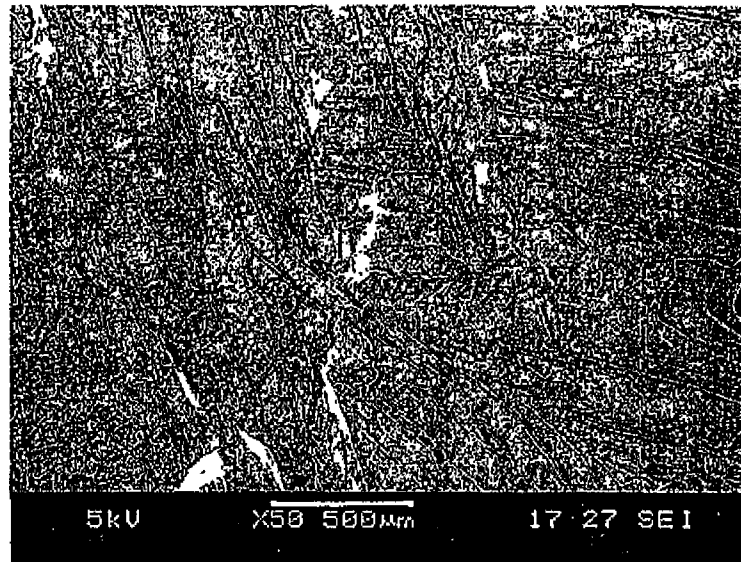
**Fig. 1**

○  
○ Refrigeração Ajustada em -18°C

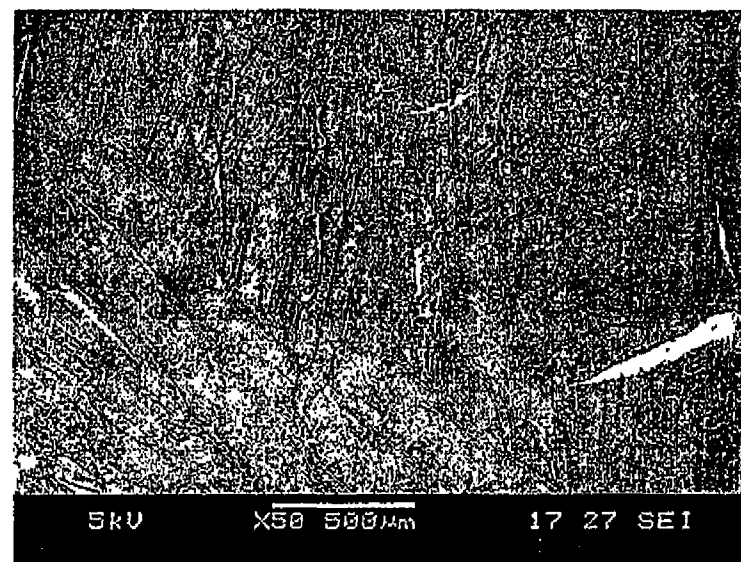
**Fig. 2****Fig. 3**

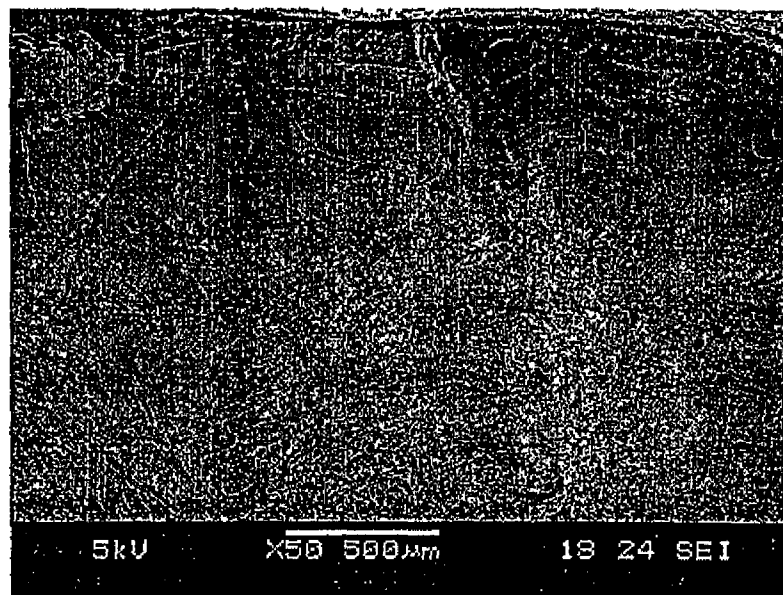
**Fig. 4**

**A**



**B**



**Fig. 5****A****B**

**RESUMO**

**“COMPOSIÇÃO CONGELADA, COMPOSIÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE  
UM PRODUTO ALIMENTÍCIO CONGELADO E USOS DE HIDROFOBINA DE  
CLASSE II”**

A presente invenção refere-se a uma composição congelada que inclui hidrofobina. A presente invenção refere-se também ao uso da hidrofobina na inibição do crescimento de cristais de gelo e/ou na modificação do hábito de cristais de gelo em produtos alimentícios congelados.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Unilever et al.  
 <120> Produtos Congelados  
 <130> F3383  
 <140> PCT/EP2005/006997  
 <141> 27-06-2005  
 <150> EP04254483.3  
 <151> 27-07-2004  
 <150> EP05251282.9  
 <151> 27-03-2005  
 <160> 2  
 <170> PatentIn Versão 3.3  
 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Hipotético  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n repetições  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 11 a 39 repetições  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 5 a 8 repetições  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (8)..(8)  
 <223> 8 a 23 repetições  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 5 a 9 repetições  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (13)..(13)  
 <223> 6 a 8 repetições  
  
 <220>  
 <221> Repetição  
 <222> (15)..(15)  
 <223> m repetições  
  
 <400> 1  
 Xaa Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Xaa Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Xaa  
 1 5 10 15