



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

(21) **PI0617047-1 A2**



* B R P I 0 6 1 7 0 4 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 13/09/2006
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)

(51) Int.Cl.:

A23L 2/66 2006.01
A23L 2/54 2006.01
A23L 1/305 2006.01
A23L 1/054 2006.01
A23C 9/152 2006.01
A23C 9/154 2006.01
A23C 11/06 2006.01
A23G 1/44 2006.01
A23G 3/44 2006.01
A23G 9/38 2006.01
A23G 3/52 2006.01
A23G 3/42 2006.01
A23G 1/52 2006.01
A23G 1/42 2006.01
A23G 9/34 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO AERADA FLUIDA E PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO**

(30) Prioridade Unionista: 23/09/2005 EP 05255944.0

(73) Titular(es): Unilever N.V.

(72) Inventor(es): Andrew Richard Cox, Deborah Lynne Aldred, Simeon Dobrev Stoyanov

(74) Procurador(es): Carolina Nakata

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008989 de 13/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039064 de 12/04/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO AERADA FLUIDA E PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO A presente invenção refere-se a uma composição aerada fluida que compreende a hidrofobina e um agente de tensão de escoamento, a composição possuindo uma viscosidade de fase contínua, medida em uma taxa de cisalhamento de 101 s, de 0,01 a 2.000 Pa.s e uma tensão de escoamento aparente de fase contínua de pelo menos 4 Pa.

“COMPOSIÇÃO AERADA FLUIDA E PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições, tais como produtos alimentícios, que incluem a hidrofobina e que exibem cremeação reduzida.

5

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma ampla variedade de alimentos contém um gás introduzido, tal como o ar, o nitrogênio, o dióxido de carbono e/ou o óxido nitroso. Tipicamente, as espumas alimentícias são instáveis em períodos de tempo de mais do que alguns dias (isto é, as bolhas irão crescer e a espuma irá colapsar) exceto se o produto for congelado (por exemplo, o sorvete) ou exceto se a fase

10 contínua do produto for geleificada (por exemplo, o musse).

Atualmente, é difícil preparar um produto aerado onde a espuma é estável no decorrer de uma vida de prateleira de algumas semanas que, com alguma agitação caso necessário, irá então fluir. Há dois aspectos que

15 precisam ser considerados: (a) a estabilidade das bolhas no decorrer de algumas semanas; (b) a prevenção do surgimento das bolhas de ar na superfície devido à diferença de fluabilidade entre as duas fases (denominado cremeação). A cremeação pode levar a uma aparência insatisfatória de um produto e a perda do desempenho. Por exemplo, se a

20 espuma cremear, então as bolhas podem se tornar menos estáveis e o ar pode ser perdido. Além disso, um produto de “fase separada” pode aparentar muito menos desejável ao consumidor.

Idealmente, tal produto aerado conteria uma espuma onde as bolhas permanecem estáveis ao crescimento e à cremeação, ainda na

25 aplicação de uma quantidade relativamente pequena de agitação (por exemplo, sacudindo, mexendo ou por sucção), o produto irá fluir.

Há uma série de mecanismos que degradam a qualidade de um produto aerado: o desproporcionamento e a coalescência levam ao

crescimento da bolha, mudando as propriedades do produto, tal como sua textura e aparência física. A cremeação (devido à flutuação das bolhas de ar) leva à separação da fase vertical no recipiente resultando em uma grande proporção de bolhas próximas à superfície superior e a depleção das bolhas no fundo. Há produtos aerados onde a cremeação é desejável, por exemplo, a espuma na superfície da cerveja. Entretanto, para os produtos aerados que requerem uma espuma com um tempo de vida além de poucos minutos ou horas (por exemplo, aqueles que requerem uma vida de prateleira), a cremeação resulta em uma aparência indesejável. Ela também pode resultar em uma perda de ar subsequente devido ao empacotamento fechado das bolhas na espuma e o colapso da espuma que pode resultar do mesmo.

Para criar um produto em que a cremeação é evitada e as bolhas dentro da espuma permanecem estáveis por uma vida de prateleira prolongada (de 1 semana a pelo menos 3 ou mais semanas em resfriamento), há dois pré-requisitos: a fase contínua requer um agente de tensão de escoamento ou deve ser viscoelástica para evitar que as bolhas ascendam devido à flutuação. As bolhas dentro da espuma devem ser estáveis ao desproporcionamento e à coalescência por toda a vida útil do produto.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

No pedido de patente WO 06/010425, foi revelado que uma proteína fúngica, denominada hidrofobina, possibilita a produção de espuma com excelente estabilidade com relação ao desproporcionamento e a coalescência. Revelou-se que a hidrofobina é um agente de aeração que confere excelente estabilidade à espuma devido a sua natureza tensoativa. A hidrofobina também parece conferir uma natureza altamente viscoelástica na superfície das bolhas de ar. Isto leva a uma boa estabilidade ao desproporcionamento e a coalescência.

Foi revelado que o uso de hidrofobina em combinação com

estabilizantes que fornecem uma tensão de escoamento aparente à fase contínua conduz a produtos aerados que também mostram boa estabilidade à cremeação em mais do que 3 semanas quando mantido em temperaturas frias. Por sua vez, uma combinação de estabilizantes com outros agentes tensoativos, tais como caseinato de sódio, ao invés de hidrofobina não resultou em uma espuma estável.

Para diminuir a taxa de cremeação em uma espuma produzida utilizando a hidrofobina como o agente de aeração tensoativo, uma fase contínua precisa ser designada com uma viscosidade ou tensão de escoamento. O último irá apenas diminuir a taxa de cremeação (através da lei de Stoke), mesmo se a viscosidade for produzida de modo muito alta. O uso de uma fase contínua com uma tensão de escoamento, entretanto, pode resultar em uma situação onde a cremeação é evitada, todavia com uma quantidade relativamente pequena de agitação, o produto irá cisalhar de modo fino e fluir.

Conseqüentemente, a presente invenção apresenta uma composição aerada com capacidade de fluxo que compreende a hidrofobina e um agente de tensão de escoamento, em que a composição possui uma viscosidade de fase contínua, medida em uma taxa de cisalhamento de 10 s^{-1} , ou de 0,01 a 2.000 Pa.s, e uma tensão de escoamento aparente de fase contínua de pelo menos 4 Pa.

Em uma realização, a hidrofobina está em uma forma substancialmente isolada.

De preferência, a hidrofobina está presente em uma quantidade de pelo menos 0,001% em peso e, de mais preferência, de pelo menos 0,01% em peso.

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

Em uma realização preferida, o agente de tensão de escoamento é um polissacarídeo, de maior preferência, um polissacarídeo bacteriano, tal como xantana ou gelana.

Em uma realização, a composição aerada compreende um espessante.

Em uma realização preferida, a composição aerada é fluida.

De preferência, a composição aerada é um produto alimentício aerado, tal como um produto alimentício resfriado.

Em outro aspecto, a presente invenção apresenta o uso de uma hidrofobina e um agente de tensão de escoamento para inibir a cremeação em uma composição aerada fluida.

Em um aspecto relacionado, a presente invenção apresenta um método de inibição de cremeação em uma composição aerada cujo método compreende a adição de uma hidrofobina e um agente de tensão de escoamento à composição antes e/ou durante a aeração da composição.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que esteja definido de alguma outra maneira, todos os termos técnicos e científicos aqui empregados possuem o mesmo significado que é normalmente compreendido por um técnico no assunto (por exemplo, na fabricação, na química e na biotecnologia de confeitos gelados e confeitos congelados). As definições e as descrições dos diversos termos e técnicas empregados na fabricação de confeitos gelados/ congelados são encontradas em *Ice Cream*, 4ª Edição, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY. As técnicas padrão utilizadas 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 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. Microbiol.* 55: 625 - 646) com capacidade de auto-organização em uma interface hidrofóbica/ hidrofílica, e possui uma seqüência conservada:

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

onde X representa qualquer aminoácido, e n e m representam independentemente um número inteiro positivo. Tipicamente, uma hidrofobina possui um comprimento de até 125 aminoácidos. Os resíduos de cisteína (C) na seqüência conservada fazem parte de pontes de bissulfeto. No contexto da presente invenção, o termo hidrofobina possui um significado mais amplo para incluir as proteínas funcionalmente equivalentes que ainda exibem a característica de auto-organização em uma interface hidrofóbica – hidrofílica, o que resulta em um filme de proteína, tais como as proteínas que compreendem a seqüência:

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

ou partes da mesma que ainda exibem a característica de auto-organização em uma interface hidrofóbica – hidrofílica que resulta em um filme de proteína. De acordo com a definição da presente invenção, a auto-organização pode ser detectada mediante a adsorção da proteína ao Teflon e ao utilizar o Dicroísmo Circular para estabelecer a presença de uma estrutura secundária (em geral, alfa-hélice) (De Vocht et al., 1998, *Biophys. J.* 74: 2059 – 68).

A formação de um filme 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). O filme de proteína pode ser visualizado por qualquer método apropriado, tal como a marcação com um marcador fluorescente ou através do uso de anticorpos

fluorescentes, tal como é bem estabelecido no estado da técnica. Tipicamente, m e n possuem 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 um outro polipeptídeo, bem como os conjugados de hidrofobina e outras moléculas, tais como os 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-organizam em interfaces hidrofóbicas em filmes anfipáticos. As organizações de hidrofobinas da classe I são relativamente insolúveis, enquanto que aquelas hidrofobinas de classe II se dissolvem de imediato em uma variedade de solventes.

As proteínas do tipo hidrofobinas também foram identificadas nas bactérias filamentosas, tais como *Actinomyce* e *Streptomyces* sp. (documento WO 01/74864). Estas proteínas bacterianas, ao contrário das hidrofobinas fúngicas, formam somente até uma ponte de dissulfeto, uma vez que elas possuem apenas dois resíduos de cisteína. Tais proteínas são um exemplo de equivalentes funcionais para as hidrofobinas que possuem as seqüências de consenso mostradas nas SEQ ID no. 1 e 2, e estão dentro do escopo 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 da cultura de fungos filamentosos que secretam a hidrofobina no meio de crescimento ou pela extração das micelas fúngicas com etanol a 60%. É particularmente preferível o isolamento das hidrofobinas a partir de organismos hospedeiros que secretam hidrofobinas naturalmente. Os hospedeiros preferidos são os hipomicetes (por exemplo, *Trichoderma*), basidiomicetes e ascomicetes. Os hospedeiros

particularmente preferidos são organismos de grau alimentício, tais como o *Cryphonectria parasitica*, que secreta uma hidrofobina denominada criparina (MacCabe e Van Alfen, 1999, *App. Environ. Microbiol.* 65: 5431 – 5435).

Alternativamente, as hidrofobinas podem ser obtidas pelo uso da tecnologia recombinante. Por exemplo, as células hospedeiras, tipicamente micro-organismos, podem ser modificadas para que expressem hidrofobinas, e as hidrofobinas podem então ser isoladas e utilizadas de acordo com a presente invenção. As técnicas para introduzir as construções de ácido nucléico que codificam hidrofobinas em células hospedeiras são bem conhecidas no estado da técnica. Mais de 34 genes que codificam as hidrofobinas foram clonados, mais de 16 espécies fúngicas (vide, por exemplo, o documento 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 utilizada para modificar as seqüências de hidrofobina ou sintetizar novas hidrofobinas que possuem propriedades desejadas/ aprimoradas.

Tipicamente, uma célula ou um organismo hospedeiro apropriado é transformado por uma construção 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 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 pelos técnicos no assunto.

Uma série de sistemas da expressão pode ser utilizada para expressar a seqüência de codificação de polipeptídeo. Estes incluem, mas não

estão limitados a, bactérias, fungos (incluindo leveduras), sistemas celulares de insetos, sistemas de cultura de células vegetais e plantas, todos transformados com os vetores de expressão apropriados. Os hospedeiros preferidos são aqueles que são consideradas de grau alimentício - 'geralmente considerados como seguros' (GRAS).

As espécies fúngicas apropriadas incluem as leveduras, tais como (mas sem ficar a elas limitadas) aquelas dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*, e similares, e espécies filamentosas, tais como (mas sem ficar a elas limitadas) aquelas dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Neurospora*, *Fusarium*, e similares.

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, de maior preferência, pelo menos 95% ou 100% idênticas. No entanto, os técnicos no assunto podem fazer substituições conservativas ou outras mudanças de aminoácidos que não reduzem a atividade biológica da hidrofobina. Para a finalidade da presente invenção, estas hidrofobinas que possuem este nível elevado de identidade com uma hidrofobina de ocorrência natural também estão englobadas dentro do termo "hidrofobinas".

As hidrofobinas podem ser purificadas a partir dos meios de cultura ou dos extratos celulares, por exemplo, o procedimento descrito no documento 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 hidrofobia da superfície. Consultar também *Collen et al., 2002, Biochim Biophys Acta 1569: 139 - 50; Calonje et al., 2002, Can. J. Microbiol. 48: 1030 - 4; Askolin et al., 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 124 - 30; e De Vries et al., 1999, Eur. J. Biochem. 262: 377 - 85.*

COMPOSIÇÕES AERADAS FLUIDAS E PRODUTOS

Pelos termos "composição fluida" ou "produto fluido", que são utilizados intercambiavelmente no presente, entende-se uma composição em que a composição irá fluir seguindo uma quantidade relativamente pequena de agitação (por exemplo, sacudindo, mexendo ou por sucção), em contraposição a uma composição sólida ou firme. As composições com capacidade de fluxo incluem as composições fluidas e composições semi-sólidas. A temperatura em que a capacidade de fluxo da composição ou produto é considerada, é a temperatura em que o produto é normalmente servido. Por exemplo, a capacidade de fluxo de um produto resfriado é tipicamente determinada a 5° C enquanto a capacidade de fluxo de um produto ambiente é tipicamente determinada à temperatura ambiente (20° C). A capacidade de fluxo dos produtos contendo gelo é tipicamente determinada a -10° C. As medidas são geralmente realizadas a 1 atm de pressão.

O termo "aerado" significa que o gás foi incorporado intencionalmente no produto tal como por meios mecânicos. O gás pode ser qualquer gás, mas é, de preferência, no contexto particular dos produtos alimentícios, um gás de grau alimentício, tal como o ar, o nitrogênio ou o dióxido de carbono. A extensão da aeração é tipicamente definida em termos de "expansão". No contexto da presente invenção, a % de expansão é definida em termos do volume como:

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

A quantidade de expansão presente no produto irá variar dependendo das características desejadas do produto. Por exemplo, o nível de expansão nos confeitos, tais como musses pode ser até o máximo de 200 a 250%. O nível de expansão em alguns produtos resfriados, produtos ambiente e produtos quentes pode ser inferior, mas em geral, superior a 10%, por exemplo, o nível de expansão em *milkshakes* é tipicamente de 10 a 40%.

De preferência, o nível de expansão é de pelo menos 10%, de maior preferência, pelo menos 25 ou 50%. De preferência, o nível de expansão é inferior a 400%, de maior preferência, inferior a 300 ou 200%.

De preferência, a espuma é substancialmente homogênea.

5 De preferência, uma composição aerada da presente invenção irá reter pelo menos 50% de sua fase original de volume de ar, de maior preferência, 75%, por um período de pelo menos 3 semanas, de maior preferência, ainda, pelo menos um mês (tipicamente, medida após o armazenamento em temperaturas frias (cerca de 5° C)).

10 De preferência, o diâmetro médio da bolha na composição não irá mudar de modo considerável por um período de 3 semanas (tipicamente medido após o armazenamento em temperaturas frias (cerca de 5° C)) a partir do tamanho médio quando ele estava inicialmente preparado no tempo $t = 0$. De preferência, o diâmetro relativo médio da bolha (d_r) irá mudar menos do que um fator de 2,5 por um período de 3 semanas, e de maior preferência, menos do que um fator de 2. O diâmetro relativo da bolha (d_r) no tempo $= t$ é conforme determinado nos exemplos através da equação:

$$d_r = \frac{d_t}{d_0}$$

onde d_0 é o diâmetro médio imediatamente após a preparação, isto é, $t = 0$ e d_t é o diâmetro médio da bolha no tempo $= t$.

20 Um método apropriado para medir as mudanças no tamanho da bolha e no volume da bolha é pela utilização de uma técnica de difusão da luz. O sistema de medida Turbiscan Tlab (Formulacion, France) pode ser utilizado de maneira conveniente, que analisa ambas a retrodifusão e a luz transmitida da amostra aerada de interesse.

25 A espuma a ser analisada está contida dentro de uma célula de amostra cilíndrica (por exemplo, com um diâmetro de 25 mm, preenchido com 20 mL

de espuma). Uma fonte de luz de comprimento de onda $\lambda = 880 \text{ nm}$ é utilizada para fornecer a luz incidente, e dois sensores ópticos recebem a luz transmitida através da amostra (180° da luz incidente) e a luz de difusão retrograda (45° da luz incidente) da amostra. No modo de varredura, os sensores ópticos escaneiam a altura do tubo adquirindo os dados de transmissão e de retrodifusão como uma função da altura e do tempo da amostra. Portanto, o fenômeno de migração (tal como a cremação) e as mudanças no tamanho da partícula (tal como tamanho da bolha) podem ser monitorados ao longo do tempo. A teoria relevante e os exemplos do uso do sistema de medida *Turbiscan* podem ser encontrados em: *Mengual et al., Colloids and Surfaces A, 1999, 152, 112-123; Rouimi et al., Food Hydrocolloids, 2005, 19, 467 – 478*. Da mesma maneira, anotações de aplicativos e informações úteis podem ser obtidas a partir do website do fabricante: www.turbiscan.com.

De modo experimental, as mudanças no tamanho médio das bolhas são observadas da melhor maneira pelas variações da luz de retrodifusão através de uma área da amostra onde outras mudanças (tais como o colapso da espuma ou a cremação das bolhas) não estão ocorrendo. No presente, foram utilizadas áreas centrais da espuma. O nível de luz de retrodifusão (BS) está ligado à via livre do meio de transporte de fóton, λ^* , através da espuma através da relação:

$$BS = \frac{1}{(\lambda^*)^{3/2}}$$

λ^* é dependente da fração de volume do gás, Φ , e o diâmetro médio da bolha d através:

$$\lambda^* = \frac{2d}{3\Phi(1-g)Q}$$

Q e g são ambos parâmetros ópticos da teoria de Mie, onde Q é o fator de eficiência de difusão e g é um fator de assimetria. Para uma espuma de fração de volume de ar conhecido, a mudança no diâmetro médio da bolha

pode ser monitorada ao longo do tempo. Isto é automaticamente calculado através do software Turbiscan.

Os parâmetros de medida exatos que podem ser utilizados são definidos nos Exemplos.

5 A estabilidade da espuma (volume de espuma como uma função do tempo) e a extensão da cremeação também podem ser determinadas por um método visual pela observação destes fenômenos em amostras de espumas em cilindros de medida.

De preferência, a extensão da cremeação é tal que após o
10 armazenamento por 3 semanas a 5° C, a camada de soro visível em repouso abaixo do líquido aerado que forma no fundo do recipiente do produto devido à depleção das bolhas de ar na região através da cremeação não perfaz mais do que 25% do peso total do produto dentro do recipiente. De maior preferência, ele não perfaz mais do que 15 a 20%
15 do peso total do produto dentro do recipiente. É preferível medir utilizando um método visual pela observação deste fenômeno em amostras de espumas em cilindros de medida.

Os produtos alimentícios aerados da invenção se enquadram tipicamente em um de três grupos - ambientes (isto é, produtos
20 armazenados e/ou servidos à temperatura ambiente sem requerer refrigeração/ congelamento), frios ou congelados (isto é, tipicamente contendo gelo). O termo "alimento" inclui bebidas. Os produtos alimentícios aerados frios incluem os *smoothies* e o chá. Os produtos alimentícios aerados parcialmente congelados incluem as bebidas contendo gelo e
25 outros produtos contendo gelo que são fluidos a -10° C (vide, por exemplo, o documento WO 06/010426).

Em uma realização, o produto alimentício é um produto de confeitaria.

AGENTES DE TENSÃO DE ESCOAMENTO

A tensão de escoamento requerida, de natureza viscosa e viscoelástica, irá depender não apenas da necessidade de evitar a cremeação, mas também irá depender do tipo de produto aerado de interesse. Em uma
5 realização, esta é uma espuma fluida que irá possuir uma tensão de escoamento e uma viscosidade relativamente baixa no cisalhamento (isto é, cisalhamento de diminuição). Por exemplo, uma viscosidade inferior a 1 Pa.s dentro do regime de cisalhamento de 10 a 100 s⁻¹.

A formulação requer um agente(s) de tensão de escoamento que
10 é definido no presente como um ingrediente(s) (molecular ou particulado) que fornecem uma tensão de escoamento aparente à fase contínua, diminuindo ou evitando, deste modo, a cremeação das bolhas de ar. Os agentes de tensão de escoamento também podem aumentar a viscosidade no cisalhamento zero ou durante o fluxo. Sob agitação branda (por exemplo, ao sacudir ou mexer
15 brevemente), entretanto, o produto irá fluir ou transbordar porque a fase contínua exibe o comportamento de cisalhamento de diminuição.

As composições da presente invenção irão possuir uma tensão de escoamento aparente de fase contínua de pelo menos 4 Pa, de preferência, pelo menos 4,2, 4,5 ou 5 Pa. Em uma realização, a tensão de escoamento
20 aparente de fase contínua é inferior a 1 MPa, de preferência, inferior a 100.000 Pa. A tensão de escoamento aparente de fase contínua para a composição da presente invenção pode ser determinada conforme estabelecido nos Exemplos.

As composições da presente invenção também irão possuir uma viscosidade de fase contínua, medida em uma taxa de cisalhamento de 10 s⁻¹,
25 de 0,01 a 2.000 Pa.s, de preferência, inferior a 1.000 Pa.s, de maior preferência, inferior a 500, 200 ou 100 Pa.s. A viscosidade de fase contínua para uma composição da presente invenção pode ser determinada conforme estabelecido nos Exemplos.

A temperatura em que a capacidade de fluxo, a tensão de escoamento aparente e a viscosidade da composição ou produto é considerada é a temperatura em que o produto é normalmente servido. Por exemplo, para um produto resfriado, estes parâmetros são tipicamente determinados a 5° C enquanto que para um produto ambiente, estes parâmetros são tipicamente determinados à temperatura ambiente (20° C) e para o produto contendo gelo, estes parâmetros são tipicamente determinados à -10° C. As medidas são, em geral, realizadas a 1 atm de pressão.

Os ingredientes apropriados que podem ser utilizados como agentes de tensão de escoamento, em particular, nos sistemas alimentícios, incluem os polissacarídeos geleificantes, alguns exemplos não limitantes dos quais são resumidos abaixo:

- Biopolímeros gelificantes termorreversíveis, tais como gelatina, iota e kappa carragenas, e Agar;

- Biopolímeros gelificantes quimicamente definidos que derivam sua estrutura em gel de uma interação entre o polissacarídeo e um íon apropriado, tal como o Ca^{2+} . Os exemplos incluem o alginato de sódio e a pectina;

- Polissacarídeos bacterianos, tais como xantana ou gelana que podem formar o comportamento fraco do tipo gel que é rompido pelo cisalhamento.

De preferência, tais polissacarídeos são adicionados para fornecer uma quantidade final de pelo menos 0,4% em peso, na mistura prévia aerada.

- Polissacarídeos fúngicos, tais como schizophyllan;

- Géis sinérgicos que compreendem dois ou mais biopolímeros que podem ser individualmente não geleificantes, mas na mistura irão formar um gel ou um gel de um módulo maior. Os exemplos incluem: alginato de sódio com pectina, xantana com goma de alfarroba, Agar com goma de alfarroba e kappa carragena com goma de alfarroba.

Uma série de agentes de tensão de escoamento descritos acima

é utilizada convencionalmente para produtos em gel, tal conforme eles são definidos, por exemplo, a gelatina. No contexto da presente invenção, para assegurar que o produto resultante é fluido, eles serão tipicamente incluídos em níveis mais baixos.

5 As fontes de referências úteis que descrevem os polissacarídeos e seu comportamento em solução são: "*Food polysaccharides and their applications*", ed A. M. Stephen, Marcel Dekker Inc., 2005. "*Food Gels*", ed. P. Harris, Elsevier, 1990.

Os polissacarídeos geleificantes não são os únicos ingredientes
10 que podem ser utilizados como agentes de tensão de escoamento no contexto da presente invenção. Qualquer ingrediente (molecular ou partícula) que resulta em uma tensão de escoamento aparente da fase contínua pode ser utilizado. Outros exemplos de agentes de tensão de escoamento incluem:

- Lipogéis. Estes incluem, mas não estão limitados a, ésteres de
15 poliglicerol de ácidos graxos saturados e misturas de monoglicerídeos de ácidos graxos com ésteres de ácido cítrico de ácidos graxos saturados, ésteres de ácido láctico de ácidos graxos saturados ou ésteres de ácido diacetil tartárico de ácidos graxos saturados. Tipicamente, a quantidade do ingrediente lipogel seria menos de cerca de 2 a 5% em peso na mistura previamente
- 20 aerada. Os exemplos de como produzir os lipogéis podem ser encontrados em Heertje et al., *Food Science and Technology*, 1998, 31, 387 – 396.

- Proteínas geleificantes (termicamente ou quimicamente), por exemplo, proteína do soro do leite.

- Emulsões óleo-em-água em que as partículas de óleo dispersas
25 interagem entre si, de modo a apresentar a fase contínua com uma natureza geleificada.

- Fibras, por exemplo, de frutas ou de origem vegetal, celulose modificada etc.

INGREDIENTES NÃO GELEIFICANTES QUE AUMENTAM A VISCOSIDADE DA FASE

CONTÍNUA (ESPESSURA)

Em adição aos agentes de tensão de escoamento mencionados acima, os espessantes também podem ser adicionados para aumentar a viscosidade da mistura previamente aerada, permitindo, deste modo, o controle das propriedades de fluxo do produto aerado no uso. Estes não dão origem à tensão de escoamento quando utilizados individualmente, mas irão contribuir para a espessura total e para o comportamento de fluxo do produto. Entretanto, eles precisam ser utilizados em conjunto com um(uns) agente(s) de tensão de escoamento. Tais espessantes podem ser utilizados para aumentar o “corpo” de um *milkshake* aerado no consumo, por exemplo.

Os exemplos não limitantes de espessantes são: amido não geleificado, proteína do soro de leite, goma de alfarroba, goma guar, goma arábica ou carbóxi metil celulose. O espessamento ou uma maior viscosidade da mistura previamente aerada pode ser obtido ao utilizar uma série de outras vias de moléculas ou partículas. Por exemplo, adição de polpa de fruta ou vegetal, açúcares de elevado peso molecular, tal como xarope de milho, ou uso de proteínas, por exemplo, proteína do soro. Algumas emulsões com base em sistemas também podem ser produzidas para espessar, por exemplo: coberturas de *chantilly* e creme. Os lipogéis também podem ser utilizados abaixo da concentração requerida para formar uma tensão de escoamento.

O(s) agente(s) de tensão de escoamento e os espessantes, quando presentes, são selecionados e adicionados em quantidades apropriadas para apresentar um produto, antes da aeração, que possui a tensão de escoamento aparente e a viscosidade apropriadas, conforme discutido acima.

Os produtos alimentícios podem conter opcionalmente outros ingredientes, tais como um ou mais dos seguintes: outras proteínas tais como

proteínas lácteas, como ingredientes puros ou como ingredientes líquidos, por exemplo, leite ou creme; óleo ou gordura, notadamente na forma de uma fase emulsificada; açúcares; sais; colorantes e flavorizantes; emulsificantes químicos, tais como monoglicerídeos, chá ou café, purê/ extratos/ sucos de
 5 frutas ou vegetais; estabilizantes ou espessantes, tais como polissacarídeos; conservantes; inclusões, tais como nozes, frutas, balas de caramelo.

Aos produtos não alimentícios aerados, em adição à hidrofobina e um agente espessante apropriado, podem ser incluídos outros ingredientes para criar o tipo específico de produto. Estes incluem, mas não estão limitados a:

- 10 - Tensoativos aniônicos, catiônicos e não iônicos;
- Ácidos graxos, tais como ácido esteárico e palmítico e ácidos graxos de mono-, di- ou triglicerídeos;
- Ácidos ou bases, tais como, ácido clorídrico e hidróxido de sódio;
- 15 - Conservantes, por exemplo, o ácido benzóico;
- Álcoois de açúcar, por exemplo, o glicerol e o sorbitol;
- Polímeros, tais como os PEGs e o carbômero.

A quantidade de hidrofobina presente no produto irá variar geralmente dependendo da formulação do produto e do volume da fase de ar.
 - 20 Tipicamente, o produto irá conter pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina, de maior 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.

25 De preferência, a hidrofobina é uma hidrofobina de classe II.

A presente invenção também engloba as composições para a produção de um produto alimentício aerado, tipicamente um produto alimentício, da presente invenção, em que a composição compreende uma

hidrofobina e um agente de tensão de escoamento. Tais composições incluem pré-misturas líquidas, por exemplo, pré-misturas utilizadas na produção de produtos de confeitaria resfriados ou parcialmente congelados e as misturas secas, por exemplo, os pós aos quais um líquido aquoso, tal como o leite ou a
5 água é adicionado antes ou durante a aeração.

As composições para a produção de um produto resfriado ou parcialmente congelado da presente invenção irão compreender outros ingredientes, além da hidrofobina e do agente de tensão de escoamento, que são incluídos normalmente no produto, por exemplo, nos caso dos produtos
10 alimentícios, açúcar, gordura, emulsificantes, flavorizantes, etc. As composições podem incluir todos os ingredientes restantes requeridos para obter o produto de maneira tal que a composição fique pronta para ser processada, isto é, aerada, para formar um produto aerado da presente invenção.

As composições secas para a obtenção de um produto aerado da
15 presente invenção também irão compreender outros ingredientes, além da hidrofobina e do agente de tensão de escoamento, que são normalmente incluídos nos produtos alimentícios, por exemplo, açúcar, gordura, emulsificantes, flavorizantes, etc. As composições podem incluir todos os ingredientes não líquidos restantes requeridos para obter o produto, de maneira
20 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 aerado da presente 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.

25 A hidrofobina é adicionada em uma forma e em uma quantidade tal que fica disponível para estabilizar a fase de ar. Pelo termo "adicionada", entende-se que a hidrofobina é introduzida deliberadamente no produto para o propósito de se tirar vantagem de suas propriedades de estabilização da

espuma. Conseqüentemente, onde estão presentes ou são adicionados ingredientes que contêm contaminantes fúngicos, que podem conter polipeptídeos de hidrofobina, isto não constitui a adição de hidrofobina dentro do contexto da presente invenção.

5 Tipicamente, a hidrofobina é adicionada ao produto alimentício em uma forma tal que é capaz de auto-organização em uma superfície de ar-líquido.

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

 Em uma realização, a hidrofobina é adicionada ao produto na forma monomérica, dimérica e/ou oligomérica (isto é, que consiste em 10 unidades monoméricas ou menos). De preferência, pelo menos 50% em peso da hidrofobina adicionada estão em pelo menos uma dessas formas, de maior preferência, pelo
20 menos 75, 80, 85 ou 90% em peso. Uma vez adicionada, a hidrofobina, tipicamente passará por uma organização na interface de ar/ líquido e, portanto, a quantidade de monômero, dímero e oligômero deve diminuir.

 Em uma realização, a hidrofobina é adicionada às composições aeradas da presente invenção em uma forma isolada, tipicamente pelo menos
25 parcialmente purificada.

 A combinação de hidrofobina e de um ou mais agentes de tensão de escoamento pode ser utilizada para estabilizar a fase de ar em uma composição aerada fluida (em geral, ao inibir o espessamento das bolhas, isto

é, foi revelado que as hidrofobinas estabilizam não somente o volume da espuma mas também o tamanho das bolhas dentro da espuma) e para inibir a cremeação na composição ao proporcionar propriedades reológicas apropriadas à fase contínua.

5 Em outro aspecto, a presente invenção pode ser aplicada para conjuntos ou composições aeradas congeladas, onde a cremeação é um problema no tempo requerido para o produto endurecer ou congelar. Conseqüentemente, a presente invenção também fornece um método para inibir a cremeação em um conjunto ou composição aerada congelada antes de
10 endurecer ou congelar a composição, cujo método compreende a adição de hidrofobina e um agente de tensão de escoamento à composição antes ou durante o endurecimento ou o congelamento do produto. De preferência, o tempo utilizado para o produto congelar ou endurecer é superior a 1 hora. Em uma realização preferida, o produto, imediatamente após a aeração, possui
15 uma viscosidade de fase contínua inferior a 100 Pa.

A presente invenção será descrita agora com referência aos seguintes exemplos que são apenas ilustrativos e não limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 A Figura 1 é a viscosidade como uma função da tensão de cisalhamento para as soluções contendo hidrofobina classe II (HFBII) a 0,1% e xantana a 0,3, 0,4 e 0,5%.

A Figura 2 é a viscosidade como uma função da taxa de cisalhamento para as soluções contendo HFBII a 0,1% e xantana a 0,3, 0,4 e 0,5%.

25 A figura 3 é o diâmetro médio das bolhas em relação aquela no tempo $t = 0$ como uma função do tempo para o caseinato de sódio (Na Cas), o leite em pó desnatado (SMP), o éster de poliglicerol (PGE) e as espumas estabilizadas por HFBII.

A Figura 4 é estabilidade das espumas à cremeação para as espumas

estabilizadas por um agente tensoativo com xantana a 0,5% na fase aquosa.

A Figura 5 é o diâmetro médio da bolha em relação ao tempo $t = 0$ como uma função do tempo produzido utilizando HFBII com diferentes concentrações de goma xantana.

5 A Figura 6 é estabilidade à cremeação por HFBII com xantana na fase contínua.

A Figura 7 são imagens contendo HFBII a 0,1% com xantana a 0,3% (esquerda) após 5 meses de armazenamento, xantana a 0,4% (centro) após 6 semanas de armazenamento, xantana a 0,5% (direita) após 5 meses de
10 armazenamento a 5° C.

A Figura 8 são imagens contendo HFBII a 0,1% e xantana a 0,5% após 5 meses de armazenamento a 5° C. A espuma colocada em um cilindro de medida de 100 mL (esquerda) e a aproximação (direita) mostrando um grau muito pequeno ($< 5\%$ em volume) de separação de fase (cremeação).

15 A Figura 9 são imagens de um produto de *milkshake* aerado contendo HFBII a 0,1% e xantana a 0,41% produzidas recentemente (esquerda) e após 3 semanas de armazenamento a 5° C (direita) mostrando pouca cremeação ou crescimento de bolha.

A Figura 10 são imagens de um produto de *smoothie* de fruta
20 aerado contendo HFBII a 0,1% e xantana a 0,41% produzidas recentemente (esquerda) e após 3 semanas de armazenamento a 5° C (direita) mostrando pouca cremeação ou crescimento de bolha.

EXEMPLOS

METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

25 Está descrita no presente, a base dos métodos experimentais utilizada para medir as propriedades da espuma e a reologia da solução dos produtos que são englobados dentro da presente invenção. Os parâmetros experimentais exatos selecionados para a medida são descritos nos Exemplos.

MEDIDAS DA ESTABILIDADE DA ESPUMA, TAMANHO DA BOLHA E CREMEAÇÃO

O principal método da medida de mudanças no tamanho da bolha e no grau de cremeação em amostras com espumas foi ao utilizar uma técnica de difusão da luz. Foi utilizado o sistema de medida Turbiscan
5 TLab (Formulation, França), que analisa tanto a luz de retrodifusão quanto a transmitida da amostra aerada de interesse. Isto é descrito com mais detalhes acima.

Também foram observados a estabilidade da espuma (volume da espuma como uma função do tempo) e o grau de cremeação pelo
10 método visual ao observar este fenômeno em amostras de espumas em cilindros de medida.

MEDIDA DA VISCOSIDADE DA FASE CONTÍNUA E A TENSÃO DE ESCOAMENTO

APARENTE

Uma medida da viscosidade da fase contínua e da tensão de escoamento aparente das misturas não aeradas foi determinada pela
15 reologia. Os detalhes experimentais exatos estão resumidos nos Exemplos. Para determinar uma medida da tensão de escoamento aparente e uma viscosidade de cisalhamento zero das misturas do log da tensão de cisalhamento *versus* o log dos dados de viscosidade, o regime
20 de cisalhamento de diminuição das curvas foi ajustado em um modelo Hershel-Bulkley. Foi considerada a viscosidade de tensão aparente como sendo a tensão de cisalhamento mínima que causa o início do cisalhamento de diminuição. Este é um método comum utilizado pelos técnicos no assunto. As referências úteis que descrevem este
25 comportamento podem ser encontradas em Stokes and Telford (*Journal of Non-newtonian Fluid Mechanics*, 2004, 124, 137 – 146) e Barnes, Hutton e Walters (*An Introduction to Rheology, Rheology Series 3, Elsevier Science*, 1989).

EXEMPLO 1**ESPUMAS ESTÁVEIS FLUIDAS COM CREMEÇÃO REDUZIDA****MATERIAIS E FORMULAÇÕES**

Os exemplos de produtos congelados aerados foram preparados
 5 ao utilizar três tipos de proteínas tensoativas (A a C) e um emulsificante
 formador de lipogel (D):¶

A: Caseinato de Sódio (Na Cas)

B: Leite em Pó Desnatado (SMP)

C: Hidrofobina (HFBII) de *Trichoderma reesei*

10 D: Éster de poliglicerol de ácidos graxos saturados (PGE)

Os detalhes dos materiais usados estão resumidos na Tabela 1 e
 as formulações a partir das quais cada uma das amostras foi preparada são
 mostradas na Tabela 2.

As espumas foram preparadas e armazenadas em temperaturas
 15 frias (5° C). Sua estabilidade de espuma com relação ao tamanho das bolhas e
 a cremeação foi monitorada ao longo do tempo utilizando o instrumento
 Turbiscan.

TABELA 1**INGREDIENTES UTILIZADOS COM A INFORMAÇÃO DO FORNECEDOR**

Ingrediente	Detalhes	Fornecedor
Caseinato de sódio	88 a 90% de proteína, 1,5% de gordura e 6% de umidade	DMV International, Holanda
Leite desnatado é pó	33 a 36% de proteína, 0,8% de gordura, 3,7% de umidade	United Milk, Reino Unido
Éster de poliglicerol (PGE 55)	100% de gordura	Danisco
HFBII	Purificado a partir do <i>T. reesei</i>	VTT Biotechnology, Finlândia
Goma xantana (Keltrol RD)	Dispersível a frio	CP Kelco

*Hidrofobina classe II purificada a partir do *Trichoderma reesei* essencialmente conforme descrito no documento WO 00/58342 e Linder et al., 2001, Biomacromolecules 2: 511 – 517.

TABELA 2**FORMULAÇÕES**

5

	Mistura A	Mistura B	Mistura C	Mistura D	Mistura E	Mistura F	Mistura G
Ingrediente	Concentração/ % em peso						
Caseinato de sódio	3,4	0,5	-	-	-	-	-
Leite desnatado em pó	-	-	10,4	-	-	-	-
PGE 55	-	-	-	-	-	-	0,5
HFBII	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-
Goma xantana	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,5
Água	96,9	99,9	89,1	99,4	99,5	99,6	99,0

PREPARAÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS AERADOS**PREPARAÇÃO DA MISTURA**

Todas as misturas foram preparadas em bateladas de 100 g. Para as Misturas A, B e C (contendo caseinato de sódio e leite desnatado em pó, respectivamente) a proteína e a goma xantana foram misturadas e adicionadas lentamente na água agitada à temperatura ambiente. As soluções foram aquecidas subseqüentemente (a 55° C para Na Cas e a 40° C para SMP) para assegurar que as proteínas fossem devidamente hidratadas. As misturas foram então resfriadas e armazenadas a 5° C ante o próximo uso.

15

A Mistura G foi preparada pela mistura da goma xantana em pó e do pó de PGE juntos, dispersando em água fria deionizada e então aquecendo

a 60° C com agitação por 30 minutos. Esta solução foi então resfriada e armazenada a 5° C ante o próximo uso.

Para as Misturas D, E e F (contendo HFBII), a goma xantana foi primeiro dispersada em água fria com agitação por pelo menos 30 minutos.

5 Então, a concentração requerida de HFBII foi adicionada a mesma como uma alíquota. A solução foi então lentamente sonicada em um banho sônico por 30 segundos para dissolver completamente o HFBII. A mistura foi resfriada e armazenada a 5° C ante o próximo uso.

10 Os elevados níveis de Caseinato de Na e SMP foram selecionados uma vez que as concentrações de proteína são proporcionais aos níveis encontrados em bebidas de *milkshake* vendidas comercialmente.

PROCESSO DE AERAÇÃO

15 80 mL da mistura acidificada foi cisalhada em um equipamento com recipiente de agitação (resfriado a 5° C) em uma taxa de 1.200 rpm por um período de tempo que correspondeu à obtenção de 100% de expansão. Os tempos de aeração, para atingir a expansão de 100% são resumidos na Tabela 3. Este equipamento com recipiente de agitação consiste em um recipiente de aço inoxidável cilíndrico, montado verticalmente, revestido com proporções
20 internas de 105 mm de altura e 72 mm de diâmetro.

Um rotor utilizado para cisalhar a amostra consiste em um impulsor retangular de proporções corretas para raspar a superfície interna do recipiente conforme ele rotaciona (dimensões de 72 mm x 41,5 mm). Também está ligado ao rotor duas lâminas semicirculares (60 mm de diâmetro) de alto
25 cisalhamento posicionadas em um ângulo de 45° ao ligamento retangular. Depois da aeração, as amostras foram armazenadas a 5° C em frascos Turbiscan padrão ou em cilindros de medida de 100 mL antes das análises posteriores.

TABELA 3**TEMPO DE AERAÇÃO E EXPANSÃO DAS MISTURAS A – G**

Amostra	Tempo de aeração/ min	Expansão/ %
Mistura A	1	100
Mistura B	1,16	100
Mistura C	1	100
Mistura D	2	100
Mistura E	2	100
Mistura F	2	100
Mistura G	10	100

MEDIDAS DE VISCOSIDADE E DA TENSÃO DE ESCOAMENTO APARENTE

As medidas reológicas foram realizadas utilizando um reômetro
 5 AR-G2 (TA Instruments Ltda, Crawley, UK). Os experimentos de fluxo
 escalonados foram realizados em misturas não aeradas para determinar a
 viscosidade *versus* a tensão de cisalhamento e a viscosidade *versus* as curvas
 da taxa de cisalhamento. Todas as medidas foram realizadas a 5° C (utilizando
 o resfriamento controlado Peltier). Foi utilizada uma geometria de cone e placa.
 10 O cone era constituído de aço inoxidável e era de 6 mm em diâmetro com um
 ângulo de 2°. A partir destes dados, os pontos da viscosidade como uma
 função da tensão de cisalhamento e a viscosidade como uma função da taxa
 de cisalhamento poderiam ser determinados. Ao utilizar o modelo Hershel
 Bulkley (que se adequa aos dados no final da elevada tensão de cisalhamento
 15 dos dados), uma tensão de escoamento aparente pode ser determinado.

MEDIDA DA ESTABILIDADE DA ESPUMA E DA BOLHA E EXTENSÃO DA CREMEÇÃO DA**ESPUMA**

A estabilidade da espuma e das bolhas no presente foi medida
 utilizando o Turbiscan Tlab, os quais os detalhes de operação foram discutidos

previamente. Isto permite a determinação do seguinte como uma função do tempo: (1) O volume da espuma (isto é, medida da perda da fase ar total), (2) o tamanho médio da bolha, (3) o grau de cremeação da espuma.

A espuma produzida foi dosada em um tubo amostra de vidro
5 Turbiscan até uma altura de cerca de 42 mm, correspondendo a cerca de 20 mL de espuma. O equipamento então escaneia e mede ambas as luzes de retrodifusão e transmitida entre a altura de 2 e 55 mm. As medidas foram feitas em um período de diversas semanas. Uma vez que os dados são coletados no decorrer da altura total da amostra, com base nestes, os valores médios dos
10 perfis de retrodifusão entre os limites definidos (altura inferior e superior) apresentam informação específica com relação às mudanças na amostra naquela área, por exemplo, tamanho da bolha ou cremeação.

Tamanho da bolha: A partir dos dados de retrodifusão medidos entre 20 e 30 mm, o tamanho médio a bolha foi calculado automaticamente a
15 partir da luz de retrodifusão. Os índices de refração foram medidos como aqueles da água e do ar. A fração volumétrica da fase ar da espuma era de 0,5. Embora a fração volumétrica da fase ar da espuma possa mudar ao longo do tempo, em particular, se não for estável e a cremeação ocorrer, revelou-se que as medidas entre 20 e 30 mm de altura das amostras fornecem dados de
20 tamanho confiáveis a menos que a espuma fosse muito instável. Se a espuma fosse altamente instável, então os dados de tamanho precisariam ser tratados com cuidado em um sentido quantitativo, mas poderiam ser comparados com aqueles das outras espumas.

Cremeação da espuma: a extensão da cremeação na espuma foi
25 medida por dois métodos.

(1) Difusão da luz utilizando o Turbiscan: a quantidade cremeação da espuma ao longo do tempo foi determinada pela medida da mudança da luz de retrodifusão ao longo do tempo entre a altura da amostra de 0 a 10 m.

Conforme a espuma cremeia, espera-se que a intensidade da retrodifusão entre estas alturas diminua, uma vez que mais luz será difundida na presença de bolhas de ar. Estes dados são obtidos principalmente para as espumas HFBII porque a estabilidade das bolhas significa que as mudanças na difusão
5 podem ser atribuídas somente às mudanças no volume das bolhas de ar dentro de uma região da célula da amostra. Para as espumas menos estáveis que exibem ambos o crescimento rápido da bolha e a cremeação, é mais difícil de desenrolar quantitativamente os dois uma vez que ambos os processos ocorrem ao mesmo tempo.

10 (2) Observações visuais em um cilindro de medida. 100 mL de espuma produzida foram colocados em um cilindro de medida de 100 mL e a superfície superior foi coberta com um filme de adesão para evitar a secagem da superfície superior da espuma. A altura da espuma e a altura do soro (fase contínua) conforme a espuma cremeia ao longo do tempo são registradas.
15 Mesmo quando a bolha cresce e a separação do soro (cremeação) ocorre ao mesmo tempo, o grau de cremeação pode ser determinado quantitativamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

VISCOSIDADE E TENSÃO DE ESCOAMENTO DAS MISTURAS

A viscosidade e a tensão de escoamento da mistura são
- 20 importantes na prevenção ou no controle da taxa de cremeação da bolha. Portanto, na formulação de produtos aerados em que a cremeação é interrompida, é apropriado realizar algumas análises da reologia para auxiliar na capacidade preditiva. No presente, são descritas algumas das principais características reológicas das Misturas D, E e F, contendo 0,1% em peso de
25 HFBII e 0,5, 0,4 e 0,3% em peso de xantana na solução, respectivamente.

As Figuras 1 e 2 mostram importantes condições reológicas para possibilitar as espumas fluidas. Os dados na Figura 1 mostram o efeito da concentração de xantana na tensão de escoamento aparente e na viscosidade

da solução. Ao utilizar o modelo Hershel Bulkley (que se adequa aos dados no final da elevada tensão de cisalhamento dos dados), uma tensão de escoamento aparente pode ser determinada. A partir destes dados, foi calculado para:

5 0,3% em peso de solução de xantana com hidrofobina a 0,1% -
tensão de escoamento aparente = 2,8 Pa

 0,4% em peso de solução de xantana com hidrofobina a 0,1% -
tensão de escoamento aparente = 4,5 Pa

10 0,5% em peso de solução de xantana com hidrofobina a 0,1% -
tensão de escoamento aparente = 5,5 Pa.

A tensão de escoamento aparente é o parâmetro principal que irá governar a taxa e o grau de cremação. Os dados na Figura 2 mostram o efeito da concentração de xantana na viscosidade das misturas em cisalhamento elevado. Sugere-se que a viscosidade da mistura em taxas de cisalhamento entre 10 e 100 s⁻¹ seja comparável à viscosidade que seria experimentada no
15 fluxo ou no consumo. Para cada uma das concentrações de xantana, a viscosidade da mistura sobre o regime da taxa de cisalhamento de 10 a 100 s⁻¹ é inferior a 1 Pa.s.

ESTABILIDADE DA BOLHA

20 A mudança no tamanho médio da bolha relativo (d_r) nas espumas como uma função do tempo é mostrada na Figura 3. No caso de HFBII, as bolhas são bastante estáveis e nenhuma mudança no tamanho médio é vista após algumas semanas de armazenamento a frio. O PGE a 0,5% também mostra boa estabilidade, embora o tamanho médio da bolha não aumente
25 gradualmente. Ainda, o nível de PGE utilizado (0,5% em peso é maior do que o permitido em gêneros alimentícios). Cada uma das proteínas não HFB mostra baixa estabilidade. O rápido crescimento da bolha ocorre no decorrer de apenas algumas horas para cada uma das misturas aeradas. O espessamento

destas espumas acelera no decorrer do curto tempo de vida, conduzindo, em ultima análise, ao completo colapso da espuma.

CREMEÇÃO DA ESPUMA

A Figura 4 mostra as mudanças na retrodifusão como uma função
5 do tempo no decorrer no intervalo de altura de 0 a 10 mm no recipiente da amostra. No caso do PGE e do HFBII, onde os tamanhos das bolhas mostraram-se ficar quase que constantes no decorrer de longos períodos de tempo (em particular com HFBII), é evidente que a retrodifusão também não muda significativamente. Apenas uma pequena quantidade de cremeação é
10 observada no decorrer de longas escalas de tempo (mais de 1.000 horas, o que equivale a mais do que um mês).

No caso das espumas estabilizadas pelas proteínas lácteas (SMP e Na Cas), a interpretação dos dados da luz de retrodifusão é, de alguma maneira, mais complexa uma vez que ambos a cremeação e o crescimento da bolha irão
15 ocorrer concomitantemente. Entretanto, algumas observações gerais podem ser feitas. Ao utilizar uma concentração de xantana a 0,5%, no tempo $t = 0$, as bolhas são de tamanho inicial comparáveis àquelas feitas com HFBII. Portanto, espera-se que a cremeação seja inibida neste ponto. Entretanto, o crescimento da bolha não ocorre (devido ao desproporcionamento e a coalescência) resultando em uma diminuição na
20 retrodifusão medida. Em última análise, as bolhas irão exceder um diâmetro médio crítico e, então, elas irão começar a cremear uma vez que a forma de flutuação excede a tensão de escoamento, mantendo as bolhas no lugar. Embora a presença da goma xantana forneça uma tensão de escoamento ao sistema que se espera evitar a cremeação e as pequenas bolhas (cerca de $< 200 \mu\text{m}$ de diâmetro),
25 eventualmente, as bolhas crescem além disto e a tensão de escoamento não é o suficiente para prevenir o surgimento das bolhas. Este processo e o crescimento da bolha adicional levam a uma taxa acelerada de diminuição na retrodifusão ao longo do tempo.

A espuma estabilizada por HFBII mostra claramente uma estabilidade superior a qualquer um dos outros tensoativos investigados no presente.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA XANTANA (ISTO É, EFEITO DA TENSÃO DE ESCOAMENTO APARENTE)

5 Os dados apresentados nas Figuras 5 e 6 demonstram o efeito da concentração de xantana e, portanto, a tensão de escoamento, no grau de cremeação em uma espuma que consiste em bolhas estáveis produzidas utilizando o HFBII a 0,1%.

Na Figura 5, fica claro que na concentração de xantana a 0,5%,
10 sobre um período de 1.000+ horas, o tamanho da bolha na área da amostra medida muda muito pouco. A diminuição da concentração de xantana a 0,4% leva a um pequeno decréscimo no tamanho da bolha medido no decorrer de longos períodos de tempo. Isto é provavelmente não devido à retração da bolha, mas devido à cremeação das bolhas. As bolhas maiores surgem fora da
15 zona de medida, deixando uma maior proporção de bolhas na zona de medida. Isto leva a uma diminuição aparente no tamanho médio da bolha. O mesmo efeito é visto na xantana a 0,3% no decorrer de um período de tempo menor. O efeito é mais rápido devido à menor tensão de escoamento. Entretanto, deve ser destacado que as mudanças observadas na concentração de xantana a 0,4
20 e 0,5% são muito pequenas.

As conclusões tiradas da Figura 5 são ainda demonstradas na Figura 6. Estas mostram o grau de cremeação através da medida da retrodifusão medida no fundo do recipiente da amostra (0 a 10 mm). Claramente, com xantana a 0,5%, a cremeação é inibida com apenas pequenas quantidades de camada de soro visíveis
25 aparentes após mais de um mês de armazenamento. A cremeação ocorre mais rapidamente e em um maior grau uma vez que a quantidade de xantana é reduzida e a tensão de escoamento é reduzida. Estas mudanças ocorrem ao mesmo tempo em que a mudança no tamanho da bolha, visto na Figura 5.

A aparência visual das espumas aeradas contendo HFBII e xantana após o armazenamento a 5° C é mostrada nas Figuras 7 e 8. Está claro que após um tempo de armazenamento prolongado, utilizando xantana a 0,5% como o agente espessante, a cremeação da bolha é quase que inteiramente inibida e apenas uma pequena separação de fase pode ser vista. Ao utilizar a xantana a 0,4%, há uma quantidade maior (embora ainda pequena) de cremeação. Ao utilizar a xantana a 0,3%, a tensão de escoamento aparente é não grande o suficiente para evitar a cremeação no decorrer no tempo de armazenamento. Este produto em particular, não seria aceitável (o nível da separação de soro registrado no fundo do recipiente excede 10% após 3 semanas), enquanto que a utilização de 0,4 e 0,5% de xantana seria aceitável (o nível de soro era inferior a 10% após 3 semanas).

Conseqüentemente, uma vez que a tensão de escoamento aparente da fase contínua calculada acima para a xantana a 0,3, 0,4 e 0,5% é de 2,8, 4,5 e 5,5 Pa, respectivamente, foi determinado que a tensão de escoamento aparente mínima deve ser de pelo menos cerca de 4 Pa.

EXEMPLO 2

MILKSHAKE DE CHOCOLATE AERADO

Um *milkshake* sabor chocolate aerado foi preparado conforme segue. Um *milkshake* disponível comercialmente (Frijj™ Thick Fresh Milkshake produzido pela Dairy Crest Ltda, Shropshire, Reino Unido) foi adquirido. Este é um produto não aerado e, de acordo com a lista de ingrediente, continha: leite em pó, leite integral, açúcar, amido de milho modificado, coco em pó de gordura reduzida, pó de soro do leite e estabilizantes (carragena e goma guar). A goma xantana foi adicionada lentamente ao *milkshake* sob agitação, a uma concentração de 0,5% em peso. Este foi então misturado por 20 minutos para permitir que a goma xantana se hidrate completamente. Um volume conhecido de solução de hidrofobina a 0,5% em peso foi aerado a 400% de expansão

utilizando um aparelho portátil aerolatte™. Este foi adicionado ao *milkshake* para fornecer um produto de *milkshake* aerado com cerca de 100% de expansão, uma concentração de hidrofobina total de 0,1% em peso e uma concentração de xantana total de cerca de 0,41% em peso. O produto de *milkshake* aerado foi então armazenado a 5° C e sua estabilidade foi monitorada por um período de três semanas. A Figura 9 mostra que após 3 semanas, o produto de *milkshake* aerado reteve uma fase ar estável que não cremeou ou colapsou e não mostrou crescimento da bolha significativo.

EXEMPLO 3

SMOOTHIE DE FRUTA AERADO

Um *smoothie* de fruta aerado foi preparado utilizando uma bebida Vie Shots™, produzida pela Unilever, Reino Unido como uma base de purê de fruta. O Vie Shots™ continha: purê de banana (28%), concentrado de suco de laranja (26%), concentrado de suco de cenoura (23%), concentrado de suco de abóbora (14%), polpa de laranja (4%), concentrado de suco de limão, concentrado de acerola (1,5%) e pectina de maçã. O pH foi medido (à temperatura ambiente) como sendo o pH 4,17. A goma xantana foi adicionada lentamente ao purê de fruta sob agitação, a uma concentração de 0,5% em peso. Este foi então misturado lentamente por 20 minutos para permitir que a goma xantana se hidrate completamente. Um volume conhecido de solução de hidrofobina a 0,5% em peso foi aerado a 400% de expansão utilizando um aparelho portátil aerolatte™. Este foi adicionado ao purê de fruta para fornecer um produto *smoothie* de fruta aerado com cerca de 100% de expansão, uma concentração de hidrofobina total de 0,1% em peso e uma concentração de xantana total de cerca de 0,41% em peso. O produto *smoothie* de fruta aerado foi então armazenado a 5° C e sua estabilidade monitorada por um período de três semanas. A Figura 10 mostra que após 3 semanas, o produto *smoothie* de fruta aerado reteve uma fase de ar estável e que não ocorreu nenhum crescimento de bolha ou cremeação significativo.

As várias características e realizações da presente invenção citadas nas seções individuais acima se aplicam, tal como apropriado, a outras seções, com as mudanças necessárias. 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 incorporadas no presente a título de referência. As diversas modificações e variações dos métodos e dos produtos descritos da presente invenção serão evidentes aos técnicos no assunto sem que se desvie do escopo da presente invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com realizações preferidas específicas, deve ficar compreendido que a presente invenção, tal como reivindicada, não deve ficar indevidamente limitada a tais realizações específicas. De fato, as várias modificações dos modos descritos para a prática da presente invenção que são evidentes aos técnicos nos assuntos correspondentes devem estar enquadradas dentro do escopo das reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO AERADA FLUIDA, caracterizada pelo fato de que compreende a hidrofobina e um agente de tensão de escoamento, em que a composição possui uma viscosidade de fase contínua, medida em uma taxa de cisalhamento de 10 s^{-1} , de 0,01 a 2.000 Pa.s e uma tensão de escoamento aparente de fase contínua de pelo menos 4 Pa.
5
2. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos 0,001% em peso e menos de 1% em peso de hidrofobina.
- 10 3. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a hidrofobina está na forma isolada.
4. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a hidrofobina é uma hidrofobina de classe II.
- 15 5. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o agente de tensão de escoamento é um polissacarídeo.
6. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o polissacarídeo é xantana e/ou gelana.
- 20 7. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que compreende um espessante.
8. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo fato de que é fluida.
9. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é um produto alimentício aerado.
25
10. PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, conforme definido na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que é um produto alimentício resfriado.

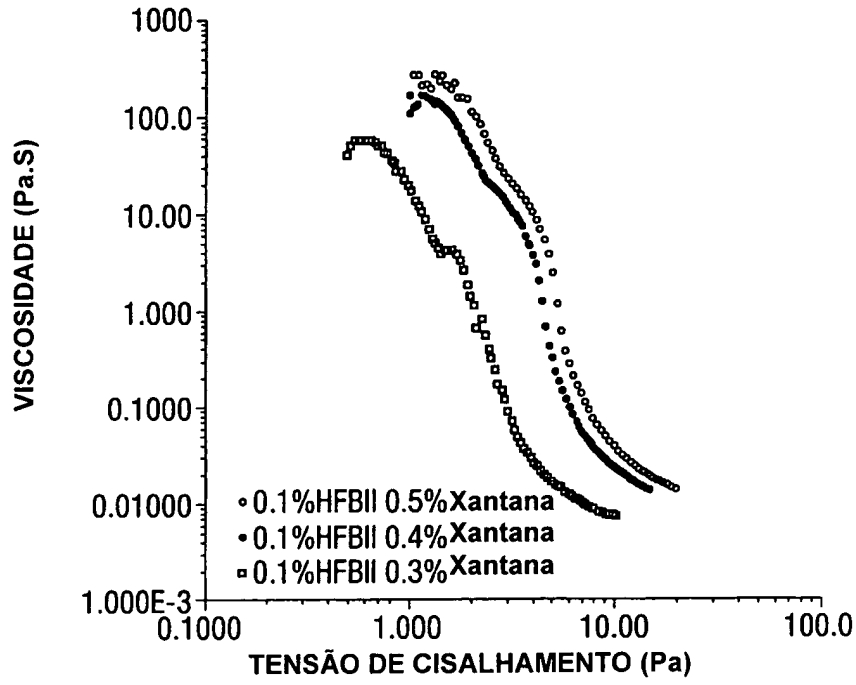


Fig. 1

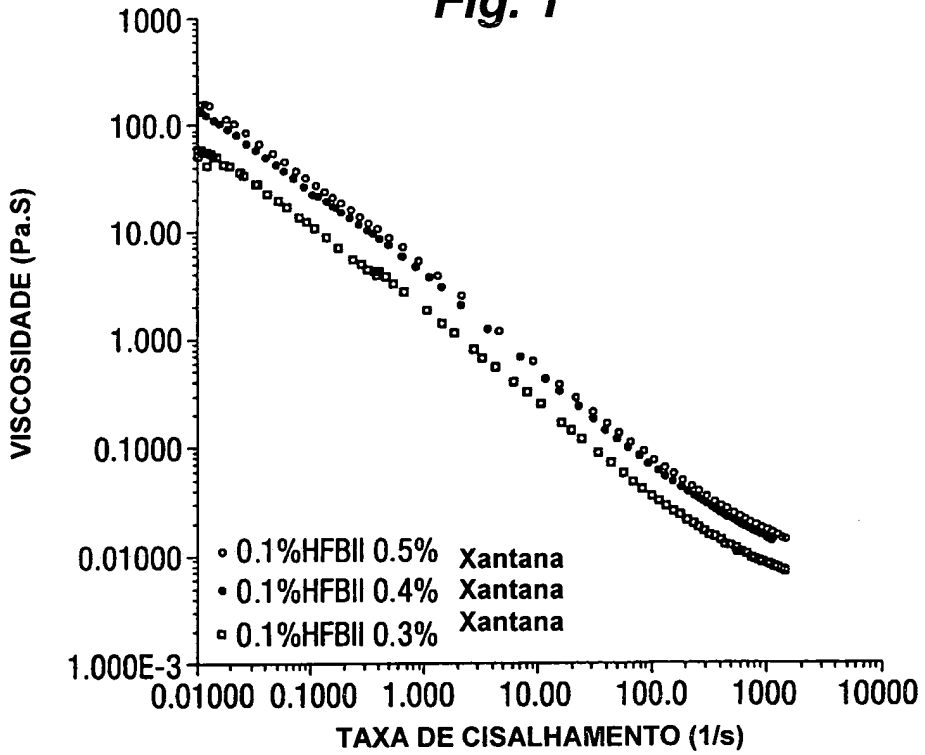


Fig. 2

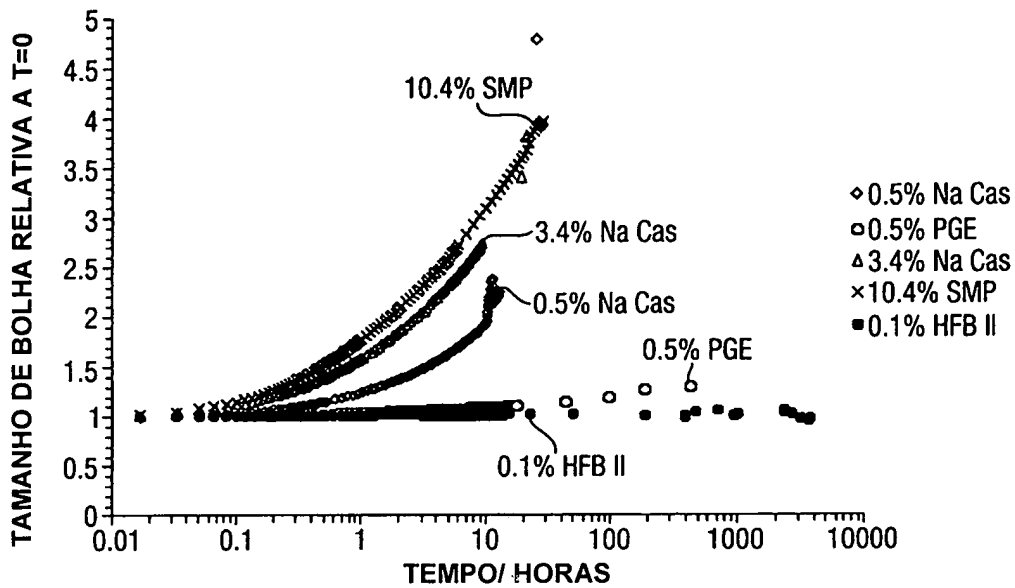


Fig. 3

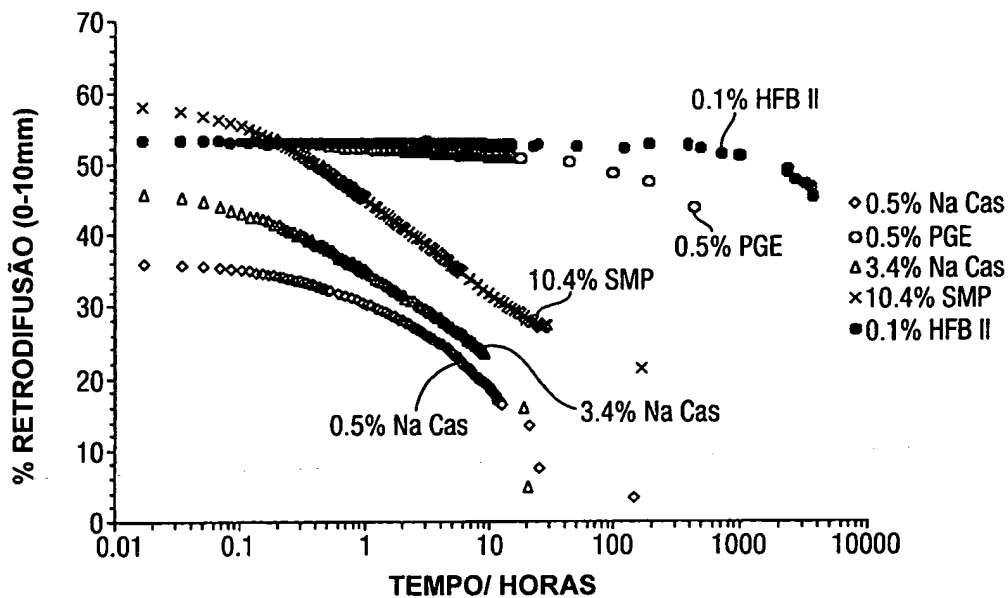


Fig. 4

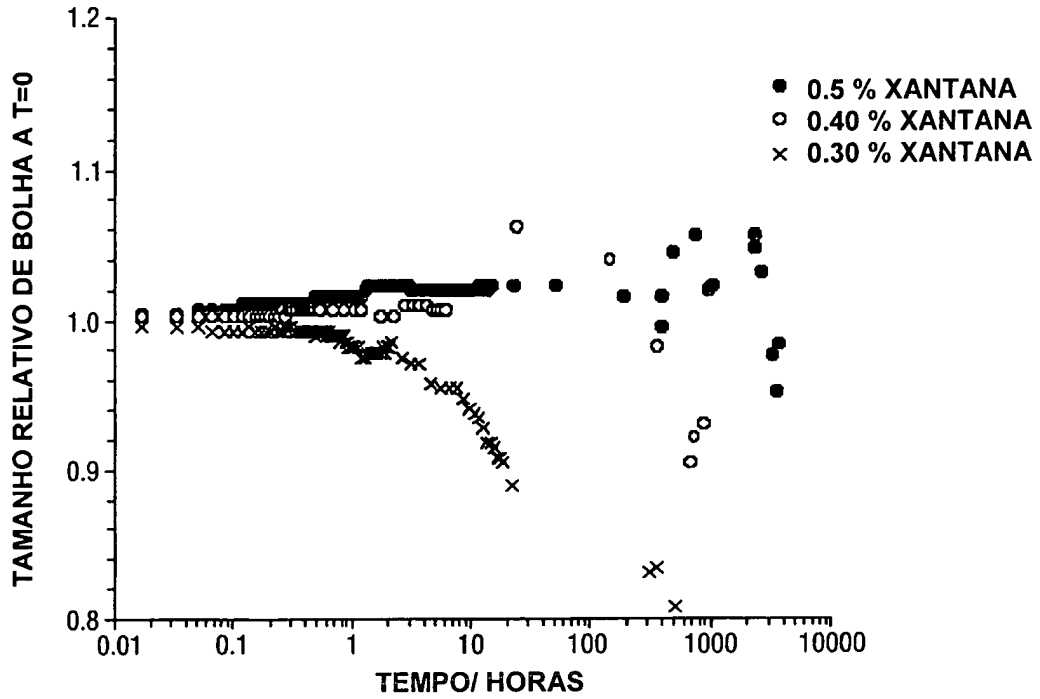


Fig. 5

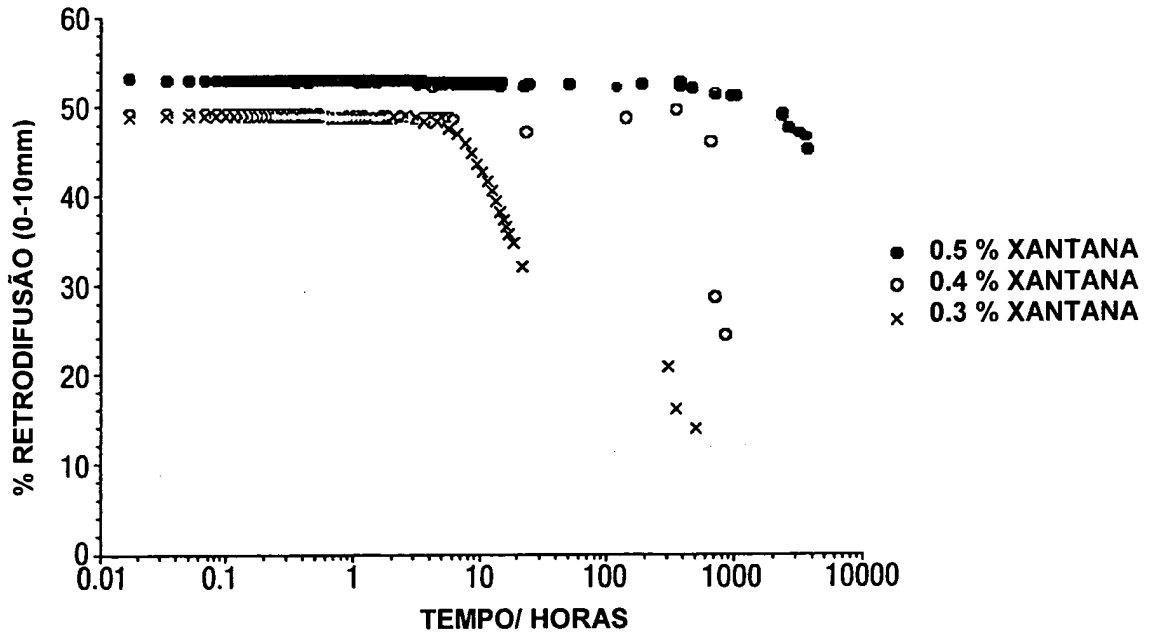


Fig. 6



Fig. 7

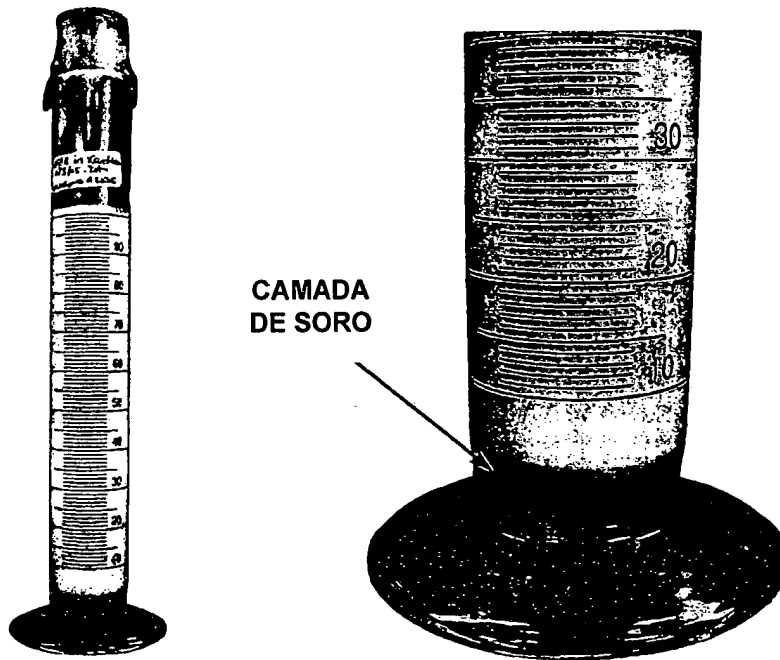
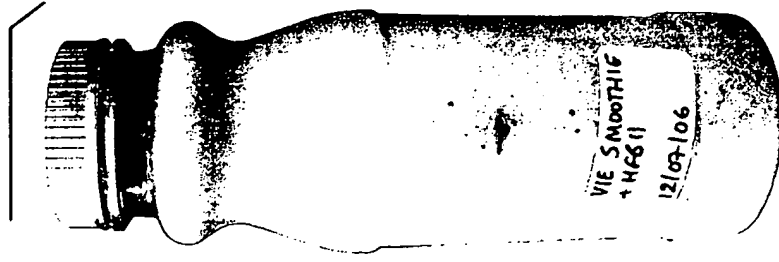


Fig. 8

Fig. 10



TEMPO = 3 SEMANAS



TEMPO = 0 DIAS

Fig. 9



TEMPO = 3 SEMANAS



TEMPO = 0 DIAS

RESUMO**“COMPOSIÇÃO AERADA FLUIDA E PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO”**

A presente invenção refere-se a uma composição aerada fluida que compreende a hidrofobina e um agente de tensão de escoamento, a
5 composição possuindo uma viscosidade de fase contínua, medida em uma taxa de cisalhamento de 10^{-1} s, de 0,01 a 2.000 Pa.s e uma tensão de escoamento aparente de fase contínua de pelo menos 4 Pa.