

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

(21) **PI0617106-0 A2**

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



(51) Int.Cl.:
A23G 9/20 2006.01
A23G 1/52 2006.01
C07K 14/37 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO AERADA E USOS DE UMA HIDROFOBINA**

(30) Prioridade Unionista: 23/09/2005 EP 05255943.2

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

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

(74) Procurador(es): Artur Francisco Schaal

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008992 de 13/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039065 de 12/04/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO AERADA E USOS DE UMA HIDROFOBINA presente invenção refere-se a uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5, cuja composição compreende a hidrofobina.

“COMPOSIÇÃO AERADA E USOS DE UMA HIDROFOBINA”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições aeradas de pH baixo, tais como produtos alimentícios, que incluem as hidrofobinas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma ampla variedade de produtos alimentícios contém gás introduzido, tal como o ar, o nitrogênio e/ou o dióxido de carbono. Tipicamente, os produtos alimentícios aerados tendem a serem de um pH relativamente neutro – aproximadamente pH 6,0 a 7,5. Os exemplos de tais produtos incluem o sorvete, as coberturas em creme e o creme chantilly.

A maior parte dos produtos alimentícios compreende proteínas e estas são essenciais tanto para a incorporação de bolhas de ar quanto para sua estabilidade subsequente. Entretanto, as proteínas lácteas, em particular, tendem a ser sensíveis ao pH. Isto é, sua carga, interações e sua conformação, podem alterar como uma função do pH. Isto afeta de maneira adversa tanto a capacidade de espumação como a estabilidade resultante das espumas feitas utilizando proteína, em particular para produtos aerados de pH 5,4 ou menos. Isto é porque tanto a atividade da superfície como a solubilidade de muitas proteínas são reduzidas conforme o pH é diminuído. Por exemplo, o caseinato de sódio se precipita com pH em cerca de 4,6 a 4,8. Isto resulta em baixa incorporação de ar resultando na instabilidade dos produtos aerados.

Este fato foi descrito extensivamente na literatura e a produção de espumas estáveis com pH baixo é um problema conhecido. Entretanto, embora haja maneiras descritas no estado da técnica que facilitam a formação de produtos alimentícios aerados em pH baixo, elas tendem a possuir limitações. Tais limitações são superadas pela presente invenção. Por exemplo, a gelatina é freqüentemente adicionada como um estabilizante que tanto espessa o produto como também auxilia na estabilidade do ar. A maior parte dos produtos

do tipo “mousses” levam vantagem da utilização da gelatina. Entretanto, a gelatina é um estabilizante de base animal que não é vista como um ingrediente apropriado por muitos consumidores. Além disso, o uso de gelatina normalmente significa que o produto irá assentar, isto é, não irá fluir. Isto
5 significa que ele é limitado ao tipo de produtos que podem ser feitos utilizando esta tecnologia de formulação.

Outros métodos usam as vantagens de outros sistemas emulsificantes químicos, tais como, ésteres de sacarose e/ou as variações de mono/ diglicerídeos de ácidos graxos saturados. Embora estas tecnologias de
10 formulação com base não láctea formem produtos aeráveis em pH baixo, freqüentemente quantidades significativas de emulsificantes são requeridas para a estabilidade de longo prazo (mais de 3 semanas). Isto pode possuir uma influência indesejável tanto no sabor quanto na textura. Além disso, quantidades significativas de emulsificantes químicos em alimentos não são
15 aceitáveis ao consumidor.

De modo ideal, um agente de aeração apropriado seria insensível ao pH (em termos do comportamento de sua espuma), seria funcional em baixas concentrações de forma que não seria evidente nenhum impacto indesejável no sabor e na textura, e poderia ser utilizado para formar os
20 produtos alimentícios nos quais a espuma ficava estável por mais do que 3 semanas à temperatura resfriada ou ambiente.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

No pedido de patente WO 06/010425, foram identificadas proteínas fúngicas, designadas hidrofobinas, como sendo altamente eficazes
25 na estabilização dos produtos alimentícios aerados. Foi constatado agora, de maneira inesperada, que baixas concentrações de proteína hidrofobina (< 0,5% em peso) podem ser misturadas com ácidos para formar soluções em pH baixo que são capazes de espumar rapidamente e formam espumas em

temperaturas baixas e ambiente, que são estáveis por mais que 3 semanas. Uma vez que a hidrofobina não leva à gelificação da fase contínua ou a texturas indesejáveis na boca, isto significa que as espumas estáveis podem ser preparadas em pH baixos, independentemente da reologia da fase contínua. Portanto, os tipos de oportunidades de produto aerado são amplos, por exemplo, *smoothies* ácidos aerados e bebidas de chá aeradas.

Estas oportunidades não estão limitadas aos produtos alimentícios, mas podem ser aplicadas a outras composições aeradas que possuem um pH baixo.

Conseqüentemente, a presente invenção fornece uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5, cuja composição compreende a hidrofobina.

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

Em uma realização preferida, 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.

A presente invenção apresenta ainda o uso de uma hidrofobina em um método de inibição do espessamento das bolhas em uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5.

Em um aspecto relacionado, a presente invenção apresenta um método para a inibição do espessamento das bolhas de uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5, sendo que o método compreende a adição de hidrofobina à composição antes e/ou durante a aeração da composição.

A presente invenção também apresenta o uso de uma hidrofobina em um método para a estabilização de uma espuma em uma composição

aerada que possui um pH inferior a 5,5.

Em um aspecto relacionado, a presente invenção também apresenta um método para a estabilização de uma espuma em uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5, cujo método compreende a adição de hidrofobina à composição antes e/ou durante a aeração da composição.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Ao menos que seja definido de alguma outra maneira, todos os termos técnicos e científicos aqui empregados têm 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 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 Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. – e a versão completa intitulada *Current Protocols in Molecular Biology*).

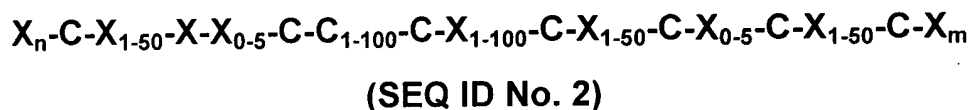
HIDROFOBINAS

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 sequência 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 IDNo. 1)

em que 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 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 sequência:



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.

5 As proteínas do tipo hidrofobinas também foram identificadas nas bactérias filamentosas, tais como *Actinomyces* 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
10 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
15 exemplo, as hidrofobinas podem ser obtidas através da cultura de fungos filamentosos que secretam a hidrofobina no meio de crescimento ou da 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 hipomicetos (por
20 exemplo, *Trichoderma*), basidiomicetos e ascomicetos. 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
25 tecnologia recombinante. Por exemplo, as células hospedeiras, tipicamente microorganismos, 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 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 de expressão pode ser utilizada para expressar a seqüência de codificação de polipeptídeo. Estes incluem, mas não estão limitados a, bactérias, fungos (incluindo leveduras), sistemas de células de insetos, sistemas de cultura de células vegetais, e plantas, todos transformadas 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 que ocorre naturalmente 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 hidrofobina 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 DE PH BAIXO

Pelo termo "composição de pH baixo" entende-se qualquer composição onde o pH da fase aquosa é inferior a 5,5 para algum ou todo o tempo de validade dos produtos. De preferência, o pH é inferior a 5,4, 5,2 ou 5,0. Tipicamente, o pH é igual ou maior a 1,0, de preferência, 3,0 ou mais, tal como 4,0 ou mais. Tipicamente, para um alimento aerado, um produto de pH baixo exibiria um pH de 3,0 a 5,4.

O termo "aerado" significa que um gás foi incorporado

intencionalmente ao 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:

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

A quantidade de expansão presente no produto irá variar dependendo das características desejadas do produto. Por exemplo, o nível de expansão no iogurte congelado é tipicamente de cerca de 70 a 100%, e em confeitos tais como mousses, a expansão pode ser tão elevada quanto de 200 a 250% em peso. O nível de expansão em alguns produtos gelados, produtos ambientes e produtos quentes pode ser mais baixo, mas geralmente de mais de 10%, por exemplo, o nível de expansão nos *milk shakes* é tipicamente de 10 a 40% em peso.

O nível de expansão em outros produtos é, de preferência, de 100 a 800%.

Não é necessário que a mistura seja homogênea dentro do produto. Contudo, em uma realização, a espuma é substancialmente homogênea.

As composições aeradas da presente invenção incluem os produtos alimentícios aerados. Outras composições incluem aqueles onde a espuma é requerida dentro de uma fase contínua de pH baixo que pode manter sua estabilidade através do tempo requerido do uso do produto.

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 (tipicamente,

medida após o armazenamento em temperaturas frias (cerca de 5° C)). A expansão não precisa ser dispersa de modo homogêneo através do produto.

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 $= t$.

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 (Formulation, France) pode ser utilizado de maneira conveniente, que analisa ambas a difusão retrógrada e a luz transmitida da amostra aerada de interesse.

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 $\lambda = 880$ 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 difusão retrógrada como uma função da altura e do tempo da amostra. Portanto, o fenômeno de migração (tal como formação de creme) 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 melhor observadas pelas variações da luz de difusão retrógrada através de uma área da amostra onde outras mudanças (tais como colapso da espuma ou cremação das bolhas) não estão ocorrendo. No presente, foram utilizadas áreas centrais da espuma. O nível de luz de difusão retrógrada (BS) está ligado à via livre do meio de transporte de fóton, λ^* , através da espuma através da relação:

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

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.

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. A cremeação (devido à flutuação das bolhas de ar) é um processo que 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.

PRODUTOS ALIMENTÍCIOS AERADOS

Os produtos alimentícios aerados da invenção se enquadram tipicamente em um de quatro grupos - quentes, ambientes (ou seja, produtos armazenados e/ou servidos à temperatura ambiente sem requerer refrigeração/ congelamento), frios ou congelados. O termo "alimento" inclui bebidas. Os produtos alimentícios aerados frios incluem os *smoothies* e chá. Os produtos alimentícios aerados congelados incluem confeitos congelados, tal como iogurte congelado.

Os ácidos apropriados para o uso em produtos de Ph baixo da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido carbônico, ácido succínico, ácido málico, ácido glucônico e suas misturas.

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; corantes e flavorizantes; emulsificantes químicos, tais como monoglicerídeos, chá ou café, purê/ extratos/ sucos de frutas ou vegetais; estabilizantes ou espessantes, tais como polissacarídeos; conservantes; inclusões, tais como nozes, frutas, balas de caramelo. De preferência, os produtos alimentícios da presente invenção não contêm gelatina.

Alguns exemplos particulares das realizações da presente invenção são estabelecidos abaixo.

Em uma realização, o produto é uma bebida aerada, tal como *milkshake*, *smoothie*, bebida com gás, cerveja, ou chá, onde uma espuma é
5 requerida em um pH baixo e que mantém a estabilidade ao longo da vida útil do produto. Neste caso, a expansão do produto aerado pode estar entre 5 a 300% e, de maior preferência, entre 10 e 200%. O gás não precisa ser disperso de modo homogêneo por todo o produto.

Em uma segunda realização, o produto é uma série de alimentos
10 aerados, tais como um mousse, torta de queijo, geléia, cobertura de creme ou *chantilly*, onde uma espuma é requerida em um pH baixo e que mantém a estabilidade ao longo da vida útil do produto. Neste caso, a expansão preferida está entre 50 a 400%.

Em uma terceira realização, o produto é uma sobremesa
15 congelada aerada, tal como um *sorbet*, sorvete ou iogurte congelado, onde uma espuma é requerida em um pH baixo e que mantém a estabilidade ao longo da vida útil do produto. Neste caso, a expansão preferida está entre 50 a 300%.

De preferência, o produto alimentício aerado é um produto de
20 confeitaria aerado.

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, de maior preferência, pelo menos 0,005 ou 0,01% em peso. Tipicamente, o
25 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 de classe II.

A presente invenção também engloba as composições para a produção de um produto alimentício aerado da presente invenção, sendo que a composição compreende uma hidrofobina. Tais composições incluem pré-
5 misturas líquidas, por exemplo, pré-misturas usadas na produção de produtos de confeitaria congelados e misturas secas, por exemplo, os pós aos quais um líquido aquoso, tal como o leite ou a água é adicionado antes ou durante a aeração.

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

As composições secas para a obtenção de um produto alimentício aerado da presente invenção também irão compreender outros ingredientes, além da hidrofobina, que são normalmente incluídos no produto alimentício, por exemplo, açúcar, gordura, emulsificantes, flavorizantes, etc. As composições
20 podem incluir todos os ingredientes não líquidos restantes requeridos para obter o produto alimentício, 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 alimentício aerado da presente invenção. Estas composições secas, cujos exemplos incluem pós e grânulos,
25 podem ser projetadas para o uso industrial e de varejo, e são beneficiadas com um volume reduzido e uma vida útil mais longa.

As composições para a produção de um produto alimentício aerado da presente invenção irão possuir tipicamente um pH inferior a 5,5, ou

no caso das composições secas, formam uma composição que possui um pH inferior a 5,5 quando a água ou o leite é adicionado para reconstituir o produto a sua forma final usual.

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 alimentício 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.

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 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 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 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 parcialmente purificada.

5 A hidrofobina adicionada pode ser utilizada para estabilizar a fase de ar em uma composição aerada, em geral, ao inibir o espessamento das bolhas, isto é, foi descoberto que as hidrofobinas estabilizam não somente o volume da espuma mas também o tamanho das bolhas dentro da espuma.

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

10

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é o diâmetro médio das bolhas em relação aquela no tempo $t = 0$ como uma função do tempo.

15 A Figura 2 são espumas criadas utilizando HFBII a 0,1% e xantana a 0,5% em pH de 3,5 e 5,2 (esquerda e direita, respectivamente) e armazenadas à 5° C por 3 semanas. Após este período de tempo, nenhuma perda do volume de espuma ou crescimento de bolha visível da bolha ocorreu.

20 A figura 3 são espumas criadas em pH 3,5 contendo xantana a 0,5% e (esquerda) HFBII a 0,1% - 3 semanas de armazenamento, (centro) 1,5% de Lactem – 2 semanas de armazenamento e, (direita) hifoama a 0,5% - 3 semanas de armazenamento. Todas armazenadas a 5° C.

25 A Figura 4 é uma figura aproximada de espumas criadas em pH 3,5 contendo xantana a 0,5% e (esquerda) HFBII a 0,1% - 3 semanas de armazenamento, (direita) 1,5% de Lactem – 2 semanas de armazenamento. Note que o exemplo com HFBII mostra onde as bolhas não são visíveis enquanto a espuma com o Lactem mostra as bolhas visíveis que cresceram durante o armazenamento.

A Figura 5 é o diâmetro médio da bolha em relação ao tempo $t = 0$ como uma função do tempo para a espuma contendo chá verde.

A Figura 6 são imagens SEM de microestruturas de *sorbets* criados utilizando Hygel a 0,2% e HFBII a 0,1%, ambos frescos e após a temperatura de abuso.

A Figura 7 são imagens SEM em maior aumento das microestruturas de *sorbets* criados utilizando Hygel a 0,2% e HFBII a 0,1%, após a temperatura de abuso.

A Figura 8 são fotografias de *sorbets* criados utilizando Hygel a 0,2% e HFBII a 0,1%, após 2 semanas da temperatura de abuso.

A Figura 9 são fotografias de um produto de *smoothie* de fruta aerado contendo HFBII a 0,1% e xantana a 0,41% feitos recentemente (esquerda) e após 3 semanas de armazenamento a 5° C (direita) mostrando pouca cremeação ou crescimento das bolhas.

A Figura 10 são fotografias de um produto de vinagrete aerado contendo HFBII a 0,1% e goma xantana a 0,25% feitos recentemente (esquerda) e após 3 semanas de armazenamento a 5° C (direita) mostrando pouca cremeação ou crescimento das bolhas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

PRODUTOS AERADOS DE PH BAIXO

Os produtos aerados foram preparados compreendendo soluções contendo um ácido, goma xantana e um de três agentes de aeração (A-C) listados abaixo.

A: Hyfoama DS

B: éster de ácido láctico de monoglicerídeo (Grinsted Lactem P22, Lactem).

C: Hidrofobina (HFBII) de *Trichoderma reesei* (HFBII foi obtido pela VTT Biotechnology, Finlândia, purificada da *Trichoderma reesei* essencialmente conforme descrito no documento WO 00/58342 e Linder et al.,

2001, *Biomacromolecules* 2: 511 – 517).

Os detalhes dos materiais utilizados estão resumidos na Tabela 1 e as formulações, das quais cada uma das amostras de espuma foi preparada, estão mostradas na Tabela 2 (Misturas de A a C).

5 A goma xantana foi adicionada a cada mistura para evitar o aspecto cremoso da espuma. Isto permite a análise completa do tamanho da bolha como uma função do tempo sem a complicação de outros fatores de desestabilização, tal como aspecto cremoso. Em outras palavras, se está medido a estabilidade das espumas para os mecanismos de desestabilização,
10 tal como desproporcionamento e coalescência.

PREPARAÇÃO DA MISTURA

Para a mistura A, a proteína e a goma xantana foram misturadas e adicionadas lentamente na água de agitação à temperatura ambiente. As soluções foram subsequentelemente aquecidas a 40° C para assegurar que as proteínas fossem
15 dissolvidas adequadamente, com um tempo de mistura total de 30 minutos. As misturas foram resfriadas e armazenadas a 5° C até o próximo uso.

Para a mistura B, o Lactem e a goma xantana foram dispersos na água de agitação à temperatura ambiente. Esta dispersão foi então aquecida a 60° C para assegurar que o Lactem fosse dispersado adequadamente, com um
20 tempo de mistura total de 30 minutos. As misturas foram resfriadas e armazenadas a 5° C até o próximo uso.

Para a mistura C, a goma xantana foi adicionada lentamente em água gelada com agitação e misturada por pelo menos 30 minutos para assegurar que o polímero fosse totalmente hidratado. Então, a concentração
25 requerida de HFBII foi adicionada como uma alíquota. A solução foi então sonicada suavemente em um banho sônico por 30 segundos para dissolver completamente o HFB II. A mistura foi resfriada e armazenada a 5° C até o próximo uso.

TABELA 1**MATERIAIS UTILIZADOS**

Ingrediente	Composição	Fornecedor
Hyfoama DS	65% de proteína	Quest
Grinsted Lactem P22 (éster de ácido láctico)	100% de gordura (teor de ácido láctico de 20 a 25%)	Danisco
Hydrophobin HFBII	Purificado de <i>T. reesei</i>	VTT Biotechnology, Finlândia
Goma xantana (Keltrol RD)	Polissacarídeo	CP Kelco

TABELA 2**FORMULAÇÕES BASE UTILIZADAS ANTES DA ADIÇÃO DE ÁCIDO**

	Mistura A	Mistura B	Mistura C
Ingrediente	Concentração/ % em peso		
Hyfoama DS	0,5	-	-
Lactem	-	1,5	-
HFB II	-	-	0,1
Goma xantana	0,5	0,5	0,5
Água	99,0	98,0	99,4

5

PROCESSO DE AERAÇÃO

Antes da aeração, as soluções da amostra foram acidificadas ao pH desejado a 5,4 ou 3,5 utilizando 10% em peso de solução de ácido cítrico. Estes estão resumidos na Tabela 3.

TABELA 3**PH DAS MISTURAS APÓS A ADIÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO**

Mistura/ Produto Aerado	pH
A1 (da Mistura A)	5,4
A2 (da Mistura A)	3,5
B1 (da Mistura B)	5,4
B2 (da Mistura B)	3,5
C1 (da Mistura C)	5,2
C2 (da Mistura C)	3,5

10

80 mL da mistura acidificada foi cisalhada utilizando um equipamento

com recipiente de agitação por um período de tempo que correspondeu à obtenção de 100% de expansão. Este equipamento consiste em um recipiente de aço inoxidável cilíndrico, montado verticalmente, revestido com proporções internas de 105 mm de altura e 72 mm de diâmetro.

5 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 laminas semi-circulares (60 mm de diâmetro) de alto cisalhamento posicionadas em um ângulo de 45° ao ligamento retangular. A
10 velocidade era de 1.200 rpm e o recipiente de aço contendo o rotor foi resfriado a 5° C durante a aeração.

Depois da aeração, as amostras foram armazenadas a 5° C em frascos Turbiscan ou em cilindros de medida de 100 mL antes das análises posteriores.

15 MEDIDA DA ESTABILIDADE DA ESPUMA E DA BOLHA

A estabilidade da espuma e das bolhas no presente foi medida utilizando o Turbiscan Tlab, os quais os detalhes de operação foram discutidos acima. 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) A média
20 do tamanho da bolha.

A espuma produzida foi dosada em um tubo amostra de vidro Turbiscan até uma altura de cerca de 42 mm, correspondendo a cerca de 20 mL de espuma. O equipamento então escaneia e mede ambas a luz de difusão retrógrada e transmitida entre a altura de 2 e 5 mm. As medidas foram feitas em
25 um período de diversas semanas, dependendo da estabilidade da espuma. Uma vez que os dados são coletados no decorrer da altura total da amostra, com base nestes, os valores médios dos perfis de difusão retrógrada entre os limites definidos (altura inferior e superior) apresentam informação específica com relação

às mudanças na amostra naquela área, por exemplo, tamanho da bolha.

Tamanho da bolha: A partir dos dados de difusão retrógrada medidos entre 20 e 30 mm, o tamanho médio a bolha foi calculado automaticamente a partir da luz de difusão retrógrada. 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 (igualando a 100% de expansão). Embora a fração volumétrica da fase ar da espuma possa mudar ao longo do tempo, em particular, se não for estável e a ocorrer aspecto cremoso, descobriu-se que as medidas entre 20 e 30 mm de altura das amostras fornecem dados de 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTABILIDADE COMO UMA FUNÇÃO DO TEMPO

O tamanho médio da bolha (relativo àquele medido a $t = 0$ min), medido para cada uma das misturas com espumas como uma função do tempo, é mostrado na Figura 1. Em ambos os pH 3,5 e 5,2, o HFBII forma uma espuma onde as bolhas permanecem estáveis muito mais do que aquelas nas espumas aeradas utilizando o Hyfoama ou o Lactem. A espuma estabilizou por HFBII permanecendo estável por mais do que 3 semanas.

Bem como o crescimento significativo da bolha, as espumas criadas utilizando o Hyfoama e o Lactem colapsaram (perda de volume da fase ar) nos estágios posteriores de sua meia-vida curta. No caso do HFBII, nenhum volume da fase ar medido foi perdido do produto.

As Figuras 2 e 3 mostram imagens de espumas criadas utilizando o HFBII, Lactem ou Hyfoama como o agente de aeração. A Figura 2 demonstra claramente que a espuma criada utilizando o HFBII é altamente estável em ambos o pH 3,5 e 5,4. Mesmo após 3 semanas de armazenamento, não pode

ser observado nenhum colapso da bolha ou crescimento de bolha visível.

As Figuras 3 e 4 demonstram novamente a estabilidade da espuma criada utilizando o HFBII. A espuma feita utilizando o Lactem em pH 3,4 mostra estabilidade razoável em termos de retenção do volume da fase ar, mas está claro que o crescimento da bolha significativo ocorreu, como pode ser visto a partir da foto aproximada na Figura 4 mostrando bolhas de ar visíveis. No caso de Hyfoama, o crescimento de bolhas significativo ocorreu, mas também o volume da fase ar foi perdido.

Portanto, está claro que a hidrofobina pode ser utilizada para formar espumas altamente estáveis na presença de ácidos. Estas espumas retêm seu volume da fase ar por um período de 3 semanas resfriadas, e o tamanho da bolha não muda significativamente durante este tempo.

EXEMPLO 2

PRODUTO AERADO CONTENDO EXTRATO DE CHÁ

PREPARAÇÃO DO PRODUTO AERADO

Uma mistura contendo extrato de chá da seguinte formulação foi feita. HFBII a 0,1%, xantana a 0,5%, 0,16% de chá verde em pó, e o restante de água. A mistura foi preparada conforme segue: a xantana e o chá verde em pó foram adicionados lentamente à água fria com agitação e misturados por pelo menos 30 minutos para assegurar que o polímero fosse totalmente hidratado. Então, a concentração requerida de HFBII foi adicionada 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 até o próximo uso.

Antes da aeração, a solução foi acidificada ao pH desejado de 5,4 utilizando uma solução de ácido cítrico a 10% em peso. A mistura foi então aerada a 100% de expansão utilizando o recipiente de agitação da mesma maneira conforme descrito nas misturas do Exemplo 1. A mistura aerada foi então armazenada a 5° C e

a análise do tamanho da bolha e o volume da espuma foram feitos como uma função do tempo utilizando o Turbiscan com a mesma configuração experimental conforme descrito no Exemplo 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 A estabilidade da espuma em termos do diâmetro médio da bolha é mostrada na Figura 5. Obviamente, em um período de tempo, há uma mudança mínima no tamanho da bolha indicando que as bolhas são estáveis à mudanças significativas. Além disso, o volume da espuma total permaneceu constante neste período de tempo.

EXEMPLO 3

SORBET DE FRUTA CONGELADO E AERADO

Dois *sorbets* foram produzidos utilizando os ingredientes listados na Tabela 4. O produto J foi produzido utilizando a formulação para a Mistura J, descrita na Tabela 5. O agente estabilizante de ar neste produto era um agente de aeração
15 disponível comercialmente denominado Hygel, uma proteína hidrolisada do leite. O produto K foi produzido utilizando a formulação mostrada para a Mistura K. A proteína estabilizante de ar neste produto era a hidrofobina, HFBII.

TABELA 4

MATERIAIS UTILIZADOS

Ingrediente	Detalhes e Fornecedor
Sacarose	Tate e Lyle
LF9	Xarope de milho 63DE, C* Trusweet 017Y4, Cerestar, Reino Unido
Goma xantana (Keltrol RD)	CPKelco
Ácido cítrico	Jungbunzlauer AG
Purê de morango	SVZ International BV
Hidrofobina HFBII	Purificada do <i>Trichoderma reesei</i> , adquirido da VTT Biotechnology, Finlândia
Hygel 8293	Uma proteína do leite hidrolisada, mínimo de 80% de proteína, adquirida da Kerry Bioscience, Reino Unido

TABELA 5
FORMULAÇÕES

Ingrediente	Mistura J	Mistura K
	Concentração/ % em peso	
HFBII	0	0,1
Hygel	0,2	0
Goma xantana	0,2	0,2
Ácido cítrico	0,2	0,2
Sacarose	10,5	10,5
LF9	17,3	17,3
Purê de morango	20,0	20,0
Água	51,6	51,7

PREPARAÇÃO DA MISTURA

Para a Mistura J, todos os ingredientes foram adicionados à água
 5 fria, dispersos utilizando um agitador magnético e aquecidos a 80° C com
 mistura contínua. A solução foi resfriada rapidamente a 5° C utilizando um
 banho frio fixado em -18° C. Para a Mistura K, que compreende a hidrofobina, o
 mesmo procedimento foi seguido exceto que o HFBII foi adicionado à solução
 resfriada como uma alíquota. As misturas foram armazenadas a 5° C antes de
 10 processamentos adicionais. O pH da mistura não aerada foi medido como
 sendo pH 4.

ETAPA DE AERAÇÃO E CONGELAMENTO

80 mL da mistura fria foram transferidos para o recipiente de
 agitação (descrito no Exemplo 1) para a aeração e o congelamento. O
 15 congelamento foi obtido ao circular o refrigerante através do revestimento ao
 redor do recipiente de agitação. A mistura foi aerada e congelada para produzir
 um produto de *sorbet* utilizando o seguinte cisalhamento e regime de
 temperatura: 100 rpm para 1 minuto, ativação da circulação do refrigerante (a -
 18° C), então 1.000 rpm por 2 minutos, então 300 rpm até o torque atingir 1 Nm

(isto ocorreu em uma temperatura do produto de -5°C). Os *sorbets* foram coletados em recipientes apropriados que foram resfriados a abaixo de -20°C . A expansão do Produto J foi medida como sendo 113% e a expansão do Produto K foi de 101%.

5 ARMAZENAMENTO E REGIMES DA TEMPERATURA DE ABUSO

Os produtos de *sorbet* foram armazenados subsequenteiramente sob dois regimes de temperatura:

(a) As amostras “frescas” foram armazenadas a -80°C até elas serem analisadas (cerca de 1 semana). A -80°C , não ocorreu nenhuma
10 mudança estrutural, tal que a microestrutura é essencialmente a mesma de uma amostra fresca.

(b) As amostras de “temperatura de abuso” foram armazenadas a -10°C por 1 semana. Algumas amostras também foram armazenadas por uma semana adicional a -10°C .

15 Após o armazenamento, os produtos foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) bem como por inspeção visual da qualidade do produto total.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microestrutura dos produtos foi visualizada ao utilizar
20 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) a baixa temperatura. Para preparar os espécimes para a microscopia, a amostra foi resfriada até -80°C em gelo seco e uma seção da amostra foi cortada. Essa seção, cerca de 6 mm x 6 mm x 10 mm, foi montada em um suporte de amostra ao utilizar um composto de Tissue Tek : OCT™ (11% de PVA, 5% de Carbowax e 85% de componentes
25 não reativos) no ponto de congelamento. A amostra incluindo o suporte foi imersa em lama de nitrogênio líquido e transferida a uma câmara de preparação de baixa temperatura (Oxford Instrument CT1500HF), mantida sob vácuo, a cerca de 10^{-4} mbar. A amostra foi então aquecida até -90°C , por cerca

de 60 a 90 segundos, tal que o gelo sublimou lentamente para revelar os detalhes da superfície. Ela foi então resfriada até -110°C para encerrar a sublimação. A amostra foi depois revestida com ouro ao usar plasma de argônio. Este processo também ocorre sob vácuo com uma pressão aplicada de 10^{-1} milibars e uma corrente de 6 miliamperes por 45 segundos. A amostra foi então transferida então a um Microscópio Eletrônico de Varredura convencional (JSM 5600), dotado de um estágio frio da Oxford Instruments a uma temperatura de -150°C . A amostra foi examinada e as áreas de interesse foram capturadas através de um software de aquisição de imagem digital.

RESULTADOS

A Figura 6 mostra as imagens SEM das microestruturas de: (esquerda) produto J, o produto comparativo; e (direita) produto K, de acordo com a presente invenção. As imagens superiores mostram os produtos frescos e as inferiores mostram os produtos com temperatura de abuso.

Os produtos frescos possuem microestruturas similares com bolhas de ar esféricas e pequenas. Entretanto, após a temperatura de abuso, o produto comparativo J mostra grandes canais de ar e muito poucas células de ar separadas, indicando que ocorreu grave coalescência das bolhas. O produto K de acordo com a presente invenção (isto é, contendo hidrofobina) mostra muito menos coalescência e canalização da fase ar e retém um grande número de pequenas bolhas separadas.

A Figura 7 mostra a microestrutura das amostras com temperatura de abuso em um maior aumento. O *sorbet* K mostra a presença de pequenas bolhas de ar (inferior a $100\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro) onde o *Sorbet* J não mostra.

A Figura 8 mostra uma fotografia de um produto de *sorbet* comparativo (J) e o produto de *sorbet* compreende a hidrofobina (K) após a temperatura de abuso por 2 semanas. O *sorbet* J é mais escuro do que o *sorbet* K devido ao aumento do

tamanho da bolha na amostra. Além disso, o *sorbet* J diminuiu em volume devido à perda de ar, onde o *sorbet* K não diminuiu.

A partir destas imagens, fica evidente que um *sorbet* de baixo pH que contém a hidrofobina (K) possui uma fase de ar substancialmente mais estável do que um *sorbet* comparativo (J) contendo uma proteína do leite estabilizadora do ar padrão.

EXEMPLO 4

SMOOTHIE DE FRUTA AERADO

Um *smoothie* de fruta aerado foi preparado utilizando uma
10 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
15 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%
20 em peso foi aerada 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
25 aerado foi então armazenado a 5° C e sua estabilidade monitorada por um período de três semanas. A Figura 9 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.

EXEMPLO 5**MOLHO DE VINAGRETE**

Um molho aerado foi preparado utilizando o Hellman's[™] Light Vinaigrette como uma base. A base continha: água, vinagre, açúcar, amido de batata modificado, alho, sal, pimenta vermelha, conservante, salsa, pimenta preta, timo e corante. O pH foi medido (à temperatura ambiente) como sendo pH 3,58. A goma xantana foi adicionada lentamente ao vinagrete sob agitação, a uma concentração de 0,3% em peso. Ela foi então misturada 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 aerada a 400% de expansão utilizando um aparelho portátil aerolatte[™]. Este foi adicionado ao vinagrete para fornecer um produto de molho vinagrete 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 0,25% em peso. O produto foi então armazenado a 5° C e a estabilidade monitorada por um período de três semanas. A Figura 10 mostra que após 3 semanas, não houve colapso ou crescimento de bolha significativo. Também não houve quantidade significativa de cremeação. Portanto, a hidrofobina é capaz de estabilizar adequadamente uma espuma em um molho entornável de pH baixo por pelo menos 3 semanas.

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, caracterizada pelo fato de que possui um pH inferior a 5,5, cuja composição compreende pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina.

5 2. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende menos de 1% em peso de hidrofobina.

3. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a hidrofobina está na
10 forma isolada.

4. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a hidrofobina é uma hidrofobina de classe II.

5. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das
15 reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que é um produto alimentício aerado.

6. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é um produto alimentício resfriado.

7. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das
20 reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que possui um pH de 3,0 a 5,4.

8. COMPOSIÇÃO AERADA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que possui um pH de 3,0 a 5,0.

9. USO DE UMA HIDROFOBINA, caracterizado pelo fato de que é em um método de inibição do engrossamento da bolha em uma
25 composição aerada que possui um pH inferior a 5,5.

10. USO DE UMA HIDROFOBINA, caracterizado pelo fato de que em um método de estabilização da espuma em uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5.

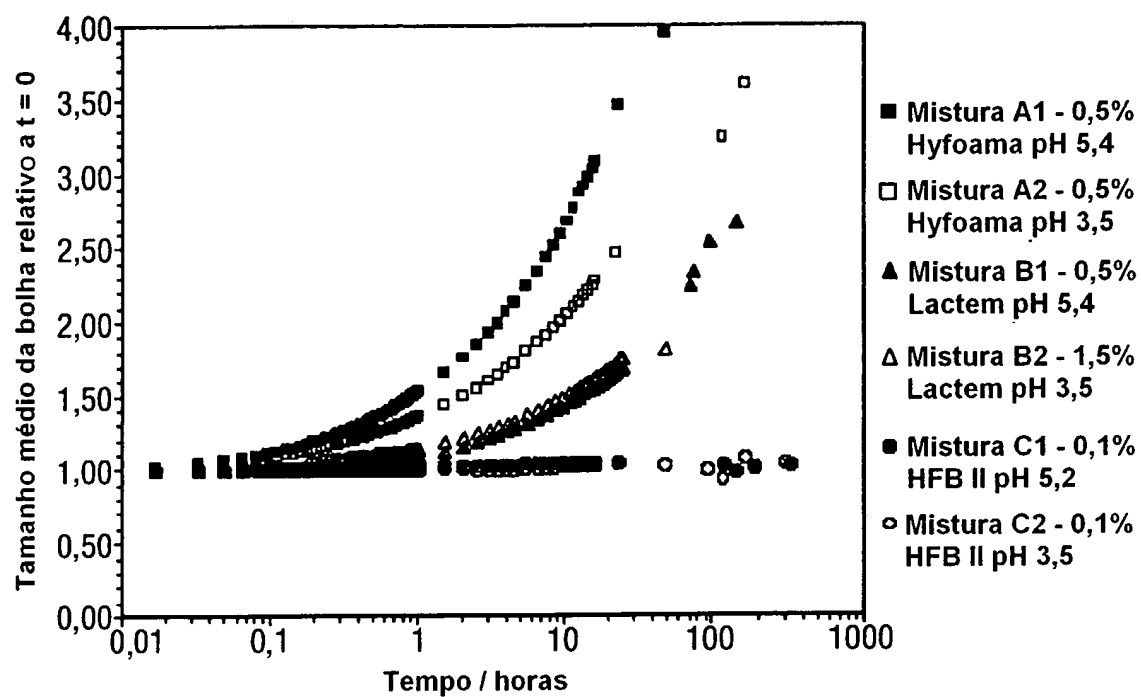


Fig. 1

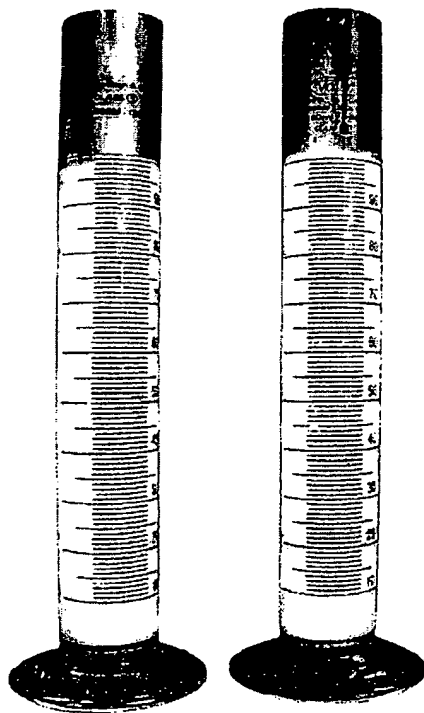


Fig. 2

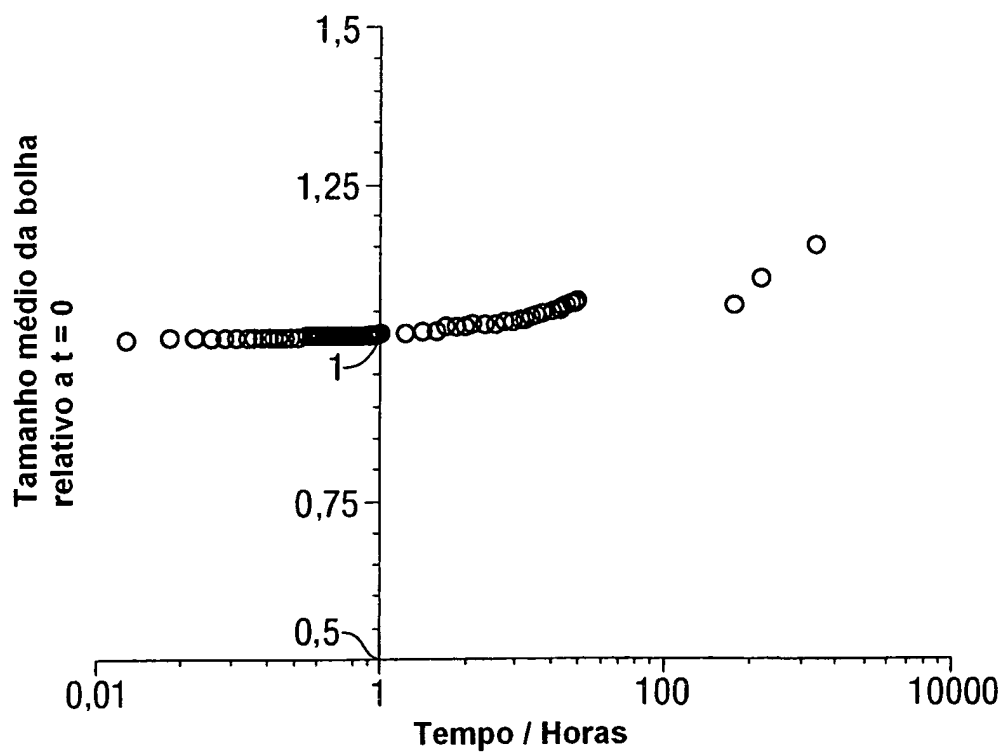
*Fig. 3**Fig. 5*



Fig. 4

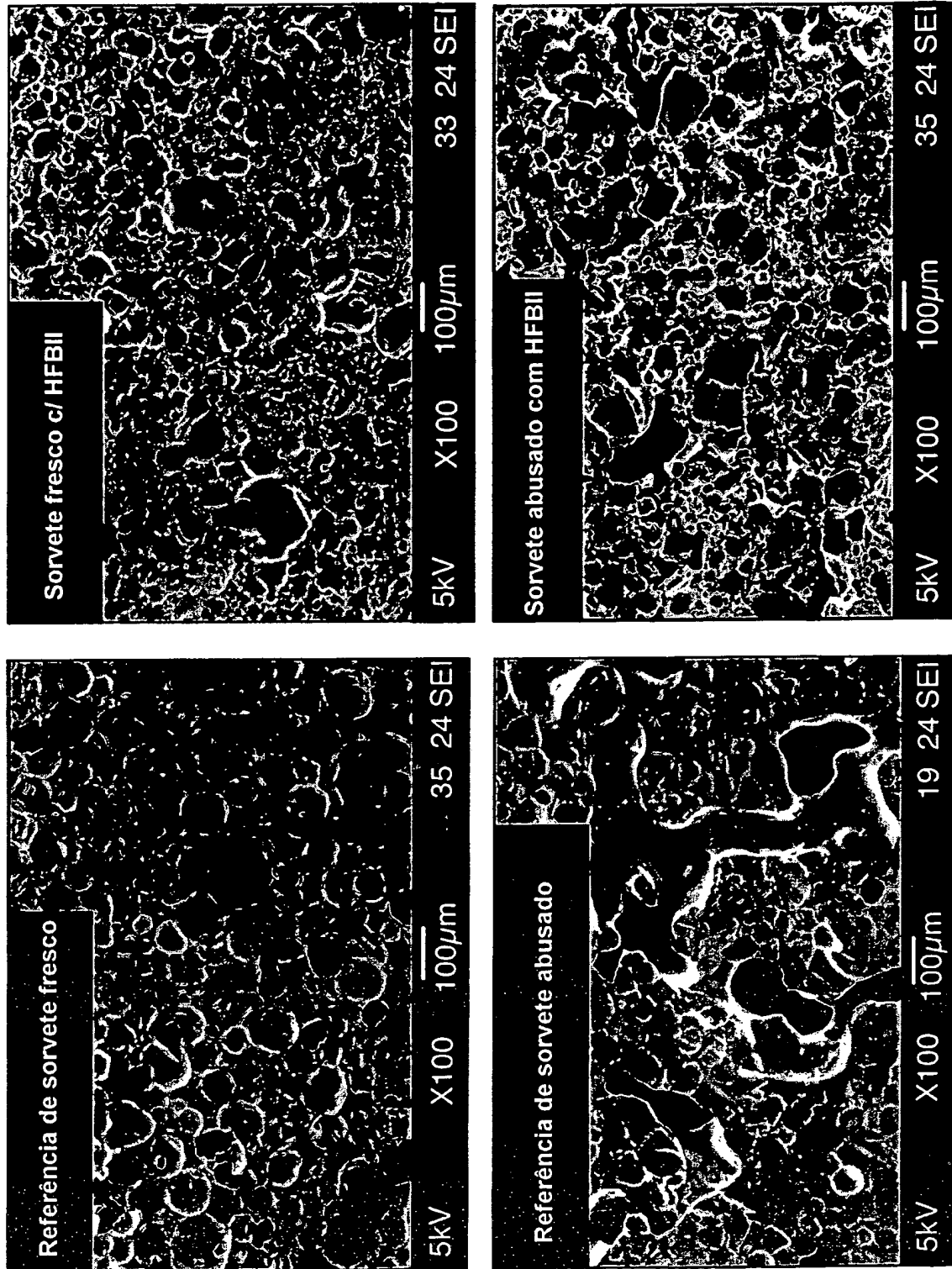


Fig. 6

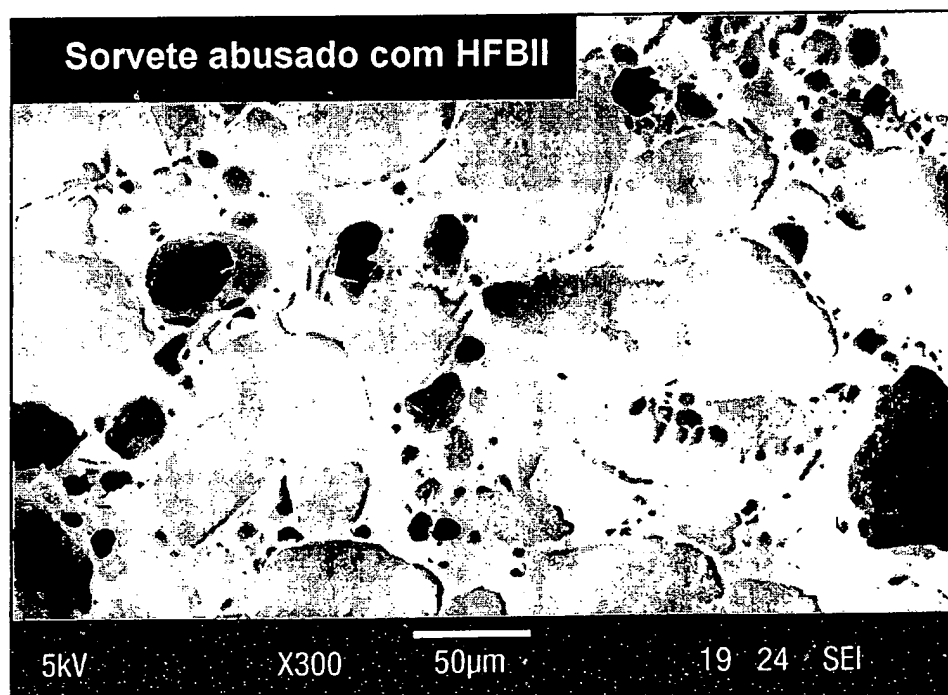
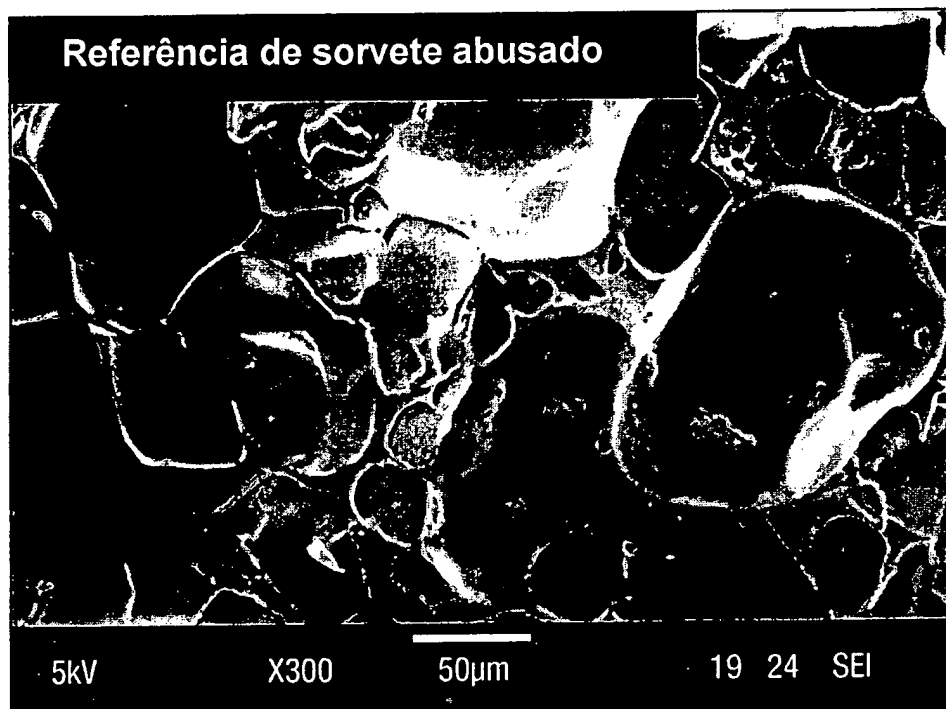
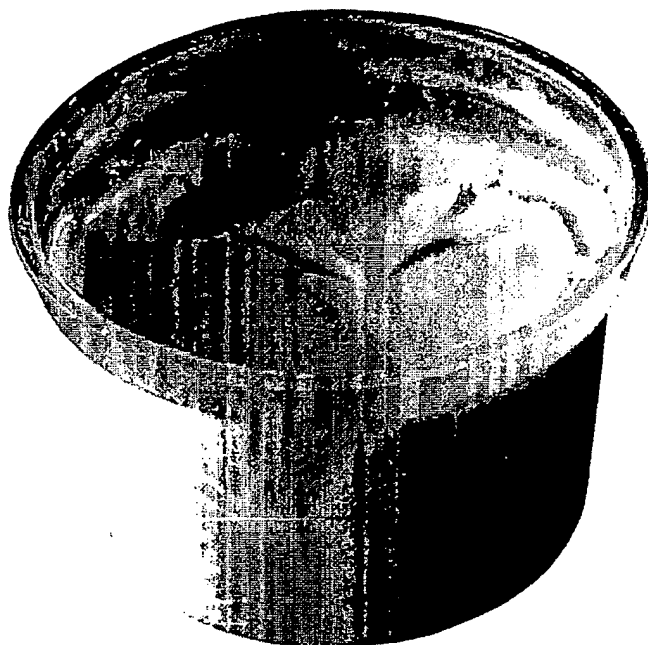
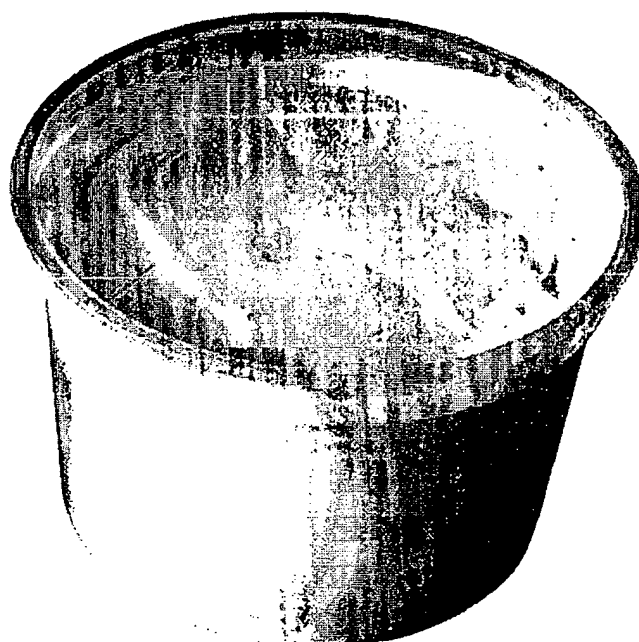


Fig. 7



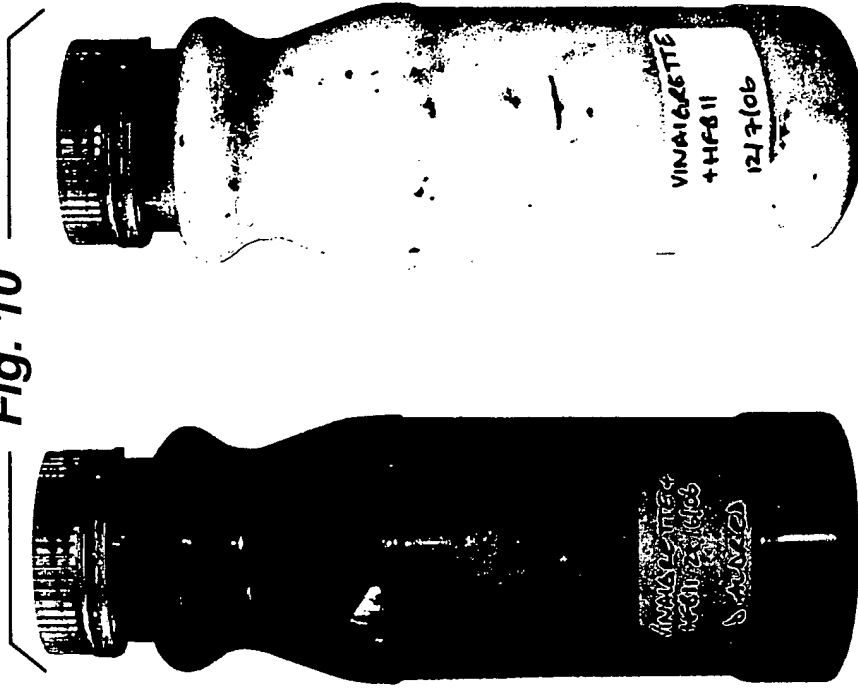
sorvete padrão
- abusado por 2 semanas



sorvete com Hidrofobina
- abusado por 2 semanas

Fig. 8

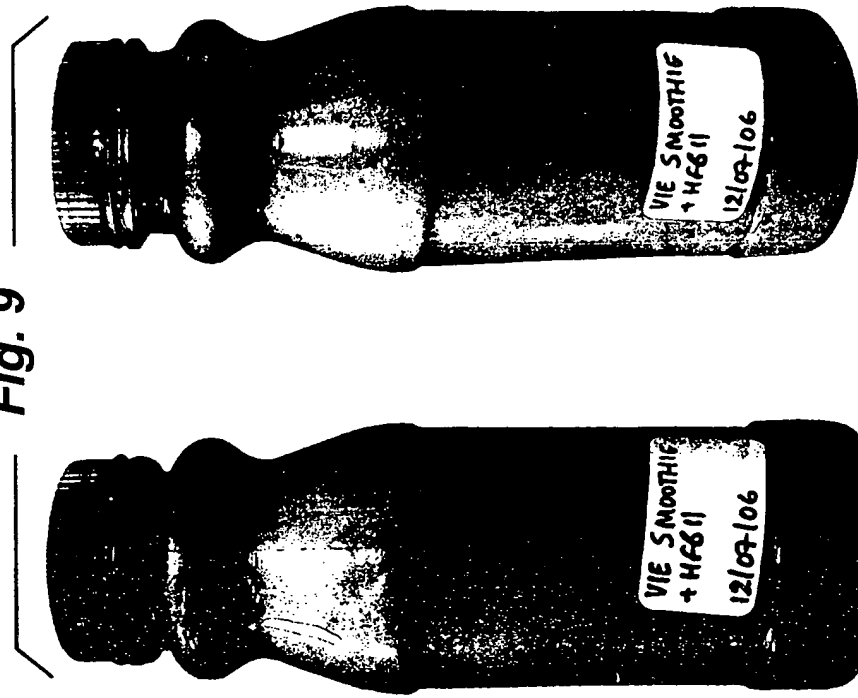
Fig. 10



Tempo = 3 semanas

Tempo = 0 dias

Fig. 9



Tempo = 3 semanas

Tempo = 0 dias

RESUMO**“COMPOSIÇÃO AERADA E USOS DE UMA HIDROFOBINA”**

A presente invenção refere-se a uma composição aerada que possui um pH inferior a 5,5, cuja composição compreende a hidrofobina.