



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

(11) PI 0513613-0 B1



(22) Data de Depósito: 27/06/2005

(45) Data da Concessão: 21/07/2015
(RPI 2324)

(54) Título: PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, COMPOSIÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, COMPOSIÇÃO SECA PARA A OBTENÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO E USOS DE UMA HIDROFOBINA

(51) Int.Cl.: A23L2/66; A23L2/54; A23C9/154; A23C11/06; A23G1/44; A23G3/44; A23G9/38; A23L1/305; A23C9/152

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

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

(72) Inventor(es): Andrew Richard Cox, Deryck Jozef Cebula, Mark Emmett Malone, Mark John Berry, Matthew Duncan Golding, Robert Daniel Keenan, Sarah Twigg

**“PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, COMPOSIÇÃO PARA A OBTENÇÃO
DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, COMPOSIÇÃO SECA PARA A
OBTENÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO E USOS DE UMA
HIDROFOBINA”**

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a produtos alimentícios aerados que incluem hidrofobinas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma ampla variedade de produtos alimentícios contém gás
10 introduzido, tal como o ar, o dióxido de carbono e/ou o nitrogênio. Tais alimentos incluem produtos alimentícios congelados e resfriados, por exemplo, sorvetes e mousses. Duas considerações-chaves se manifestam na produção e na armazenagem de produtos alimentícios aerados, ou seja, a capacidade de incorporar o gás no produto durante a manufatura
15 (capacidade de formação de espuma) e a estabilidade subsequente das bolhas de gás durante a armazenagem (estabilidade da espuma). Uma série de aditivos é incluída em produtos alimentícios aerados para ajudar na criação e na manutenção da espuma. Estes incluem proteínas tais como o caseinato de sódio e o soro de leite, que têm alta capacidade de formar
20 espuma, e os biopolímeros, tais como as carrageninas, a goma guar, a goma de alfarroba, as pectinas, os alginatos, a xantana, a gelana, a gelatina, e as misturas destes, que são bons estabilizadores. No entanto, embora os estabilizadores usados no estado da técnica possam normalmente manter o volume total da espuma, eles são pobres na inibição
25 do engrossamento da micro-estrutura da espuma, isto é, o aumento no tamanho das bolhas de gás por processos tais como o desproporcionamento e a coalescência. Além disso, muitos dos ingredientes usados para estabilizar a fase de gás em produtos alimentícios aerados precisam ser adicionados a níveis

razoavelmente elevados, o que pode ter conseqüências de textura e/ou calóricas nocivas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Foi verificado que uma classe de proteínas encontradas nos
5 fungos, denominadas hidrofobinas, combina uma alta capacidade de formação de espuma e boas propriedades de estabilização da espuma. Em particular, foi verificado que as hidrofobinas conferem uma excelente estabilidade do volume da espuma e a inibição do engrossamento. Além disso, os níveis do hidrofobina
10 requeridos para atingir a estabilidade ideal do produto são relativamente baixos. Será, portanto, possível substituir alguns ou todos os ingredientes convencionais usados na formação e na estabilização dos produtos alimentícios aerados com quantidades menores de hidrofobina.

Por conseguinte, a presente invenção apresenta um produto alimentício aerado que compreende uma hidrofobina. Em um aspecto correlato,
15 a presente invenção apresenta um produto alimentício aerado em que a fase de ar é estabilizada pelo menos parcialmente com hidrofobina. Em outro aspecto correlato, a presente invenção apresenta um produto alimentício aerado que compreende hidrofobina, sendo que a hidrofobina é associada com a fase de ar.

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

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

Em um aspecto correlato, a presente invenção apresenta uma
25 composição para a obtenção de um produto alimentício aerado da invenção, em que a composição compreende hidrofobina, de preferência a hidrofobina na forma isolada, em conjunto com pelo menos um dos ingredientes restantes do produto alimentício. De preferência, a composição compreende todos os

ingredientes restantes do produto alimentício.

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

A presente invenção também apresenta o uso de uma hidrofobina
10 em um método de inibição do engrossamento de bolhas em um produto alimentício aerado.

Em um aspecto correlato, a presente invenção apresenta um método de inibição do engrossamento das bolhas em um produto alimentício aerado, sendo que o método compreende a adição de hidrofobina ao produto
15 alimentício antes e/ou durante a aeração do produto.

A presente invenção também apresenta o uso de uma hidrofobina em um método de estabilização de espuma em um produto alimentício aerado.

Em um aspecto correlato, a presente invenção também apresenta um método de estabilização de uma espuma em um produto alimentício
20 aerado, sendo que o método compreende a adição de hidrofobina ao produto alimentício antes e/ou durante a aeração do produto.

A presente invenção também apresenta o uso de uma hidrofobina em um método de aumento da retenção da forma e/ou da rigidez em um produto alimentício aerado.

25 Em um aspecto correlato, a presente invenção apresenta um método de aumento da retenção da forma e/ou da rigidez em um produto alimentício aerado, sendo que o método compreende a adição de hidrofobina ao produto alimentício antes e/ou durante a aeração do produto.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que esteja 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
 5 manufatura de confeitos resfriados e confeitos congelados, na química e na biotecnologia). As definições e as descrições de vários termos e técnicas empregados na manufatura de confeitos resfriados/congelados são encontradas em Ice Cream, 4ª Edição, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY. As técnicas padrão usadas para os métodos
 10 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).

15

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 automontagem em uma interface hidrofóbica/hidrofílica, e tem uma sequência conservada:

20 $X_n-C-X_{5-9}-C-C-X_{11-39}-C-X_{8-23}-C-X_{5-9}-C-C-X_{6-18}-C-X_m$ (SEQ ID No. 1)

onde X representa qualquer aminoácido, e n e m representam independentemente um número inteiro positivo. Tipicamente, uma hidrofobina 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
 25 hidrofobina tem um significado mais amplo para incluir as proteínas funcionalmente equivalentes que ainda exibem a característica de automontagem em uma interface hidrofóbica-hidrofílica, o que resulta em uma película de proteína, tais como as proteínas que compreendem a sequência:

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

ou partes da mesma que ainda exibem a característica de automontagem em uma interface hidrofóbica-hidrofílica que resulta em uma película de proteína. De acordo com a definição da presente invenção, a automontagem pode ser detectada mediante a adsorção da proteína ao Teflon e ao usar dicroísmo circular para estabelecer a presença de uma estrutura secundária (em geral, alfa-hélice) (De Vocht *et al.*, 1998, *Biophys. J.* 74: 2059 - 68).

A formação de uma película pode ser estabelecida ao incubar uma folha de Teflon na solução da proteína seguida por pelo menos três lavagens com água ou tampão (Wosten *et al.*, 1994, *Embo. J.* 13: 5848 - 54). A película de proteína pode ser visualizada por qualquer método apropriado, tal como a etiquetagem com um marcador fluorescente ou através do uso de anticorpos fluorescentes, tal como é bem estabelecido no estado da técnica. m e n têm tipicamente valores que variam de 0 a 2.000, mas mais comumente m e n no total são menores do que 100 ou 200. A definição de hidrofobina no contexto da presente invenção inclui proteínas de fusão de uma hidrofobina e outro polipeptídeo, bem como conjugados de hidrofobina e outras moléculas tais como polissacarídeos.

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

Proteínas parecidas com hidrofobinas também foram identificadas nas bactérias filamentosas, tais como *Actinomycete* e *Streptomyces sp.* (pedido de patente WO 01/74864). Estas proteínas bacterianas, ao contrário das hidrofobinas fúngicas, formam até somente uma ponte de bissulfeto, uma vez

que elas têm somente dois resíduos de cisteína. Tais proteínas constituem um exemplo de equivalentes funcionais para as hidrofobinas que têm as seqüências consenso mostradas nas SEQ ID no. 1 e 2, e estão dentro do âmbito da presente invenção.

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

Alternativamente, as hidrofobinas podem ser obtidas pelo uso de tecnologia recombinante. Por exemplo, células hospedeiras, tipicamente micro-organismos, podem ser modificadas para que expressem hidrofobinas, e as hidrofobinas podem então ser isoladas e usadas de acordo com a presente
20 invenção. As técnicas para introduzir os construtos de ácido nucléico que codificam hidrofobinas em células hospedeiras são bem conhecidas no estado da técnica. Mais de 34 genes que codificam para hidrofobinas foram clonados, de mais de 16 espécies fúngicas (consultar, por exemplo, o pedido de patente WO 96/41882 que fornece a seqüência de hidrofobinas identificadas em
25 *Agaricus bisporus*; e em Wosten, 2001, *Annu Rev. Microbiol.* 55: 625 - 646). A tecnologia recombinante também pode ser usada para modificar seqüências de hidrofobina ou sintetizar novas hidrofobinas que têm propriedades desejadas/incrementadas.

Tipicamente, uma célula ou um organismo hospedeiro apropriado é transformado por um construto de ácido nucléico que codifica a hidrofobina desejada. A sequência codificadora do nucleotídeo para o polipeptídeo pode ser inserida em um vetor de expressão apropriado que codifica os elementos
5 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 sequências apropriadas de seleção e de expressão). Os métodos requeridos para construir estes vetores de expressão são bem conhecidos dos técnicos no assunto.

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

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

As sequências que codificam as hidrofobinas são de preferência pelo menos 80% idênticas ao nível de aminoácido em relação a uma
25 hidrofobina identificada na natureza, com mais preferência pelo menos 95% ou 100% idênticas. No entanto, os elementos versados na técnica podem fazer substituições conservadoras ou outras mudanças de aminoácidos que não reduzem a atividade biológica da hidrofobina. Para a finalidade da invenção,

estas hidrofobinas que possuem este nível elevado de identidade com uma hidrofobina que ocorre naturalmente também estão englobadas dentro do termo "hidrofobinas".

As hidrofobinas podem ser purificadas de meios de cultura ou de extratos celulares, por exemplo, o procedimento descrito no pedido de patente WO 01/57076 que envolve a adsorção da hidrofobina presente em uma solução que contém hidrofobina na superfície e então o contato da superfície com um tensoativo, tais como Tween 20, para eluir a 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.

PRODUTOS ALIMENTÍCIOS AERADOS

Os produtos alimentícios aerados da invenção se enquadram tipicamente em um de quatro grupos - quentes, ambientes, frios ou congelados. O termo "alimento" inclui bebidas. Os produtos alimentícios quentes incluem bebidas tais como o café do tipo cappuccino. Os produtos alimentícios aerados ambientes incluem o creme batido, marshmallows e produtos de padaria, por exemplo, o pão. Os produtos alimentícios aerados frios incluem o creme batido, mousses e bebidas tais como a cerveja, *milk shakes* e *smoothies*. Os produtos alimentícios aerados congelados incluem confeitos congelados tais como sorvetes, leite cremoso, iogurte congelado, sorvete de fruta, pastas moles, sorvete mole, picolé de fruta, sorvete de creme, granitas e purês congelados.

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

O termo "aerado" significa que um gás foi incorporado intencionalmente no produto, tal como por meios mecânicos. O gás é de preferência qualquer gás da classe alimentício, tal como o ar, o nitrogênio ou o

dióxido de carbono. A extensão da aeração, especialmente no contexto dos produtos alimentícios aerados, é definida tipicamente em termos de "expansão" (*overrun*). No contexto da presente invenção, a % de expansão é definida em termos do volume como:

$$5 \quad ((\text{volume do produto aerado final} - \text{volume da mistura}) / \text{volume da mistura}) \times 100$$

A quantidade de expansão presente no produto irá variar dependendo das características desejadas do produto. Por exemplo, o nível de expansão no sorvete é tipicamente de cerca de 70 a 100%, e em confeitos tais como mousses a expansão pode ser tão elevada quanto 200 a 250% em peso, 10 ao passo que a expansão em sorvetes de fruta varia de 25 a 30%. O nível de expansão em alguns produtos frios, em produtos ambientes e em produtos quentes pode ser mais baixo, mas geralmente de cerca de 10%, por exemplo, o nível de expansão nos milk shakes é tipicamente de 10 a 40% em peso.

15 A quantidade de hidrofobina presente no produto irá variar geralmente dependendo da formulação do produto e do volume da fase de ar. Tipicamente, o produto irá conter pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina, e com mais preferência pelo menos 0,005 ou 0,01% em peso. Tipicamente, o produto irá conter menos de 1% em peso de hidrofobina. A hidrofobina pode 20 ser de uma única fonte ou uma pluralidade de fontes, por exemplo, a hidrofobina pode ser uma mistura de dois ou mais polipeptídeos de hidrofobina diferentes.

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

A presente invenção também engloba composições para a 25 obtenção de um produto alimentício aerado da invenção, sendo que a composição compreende uma hidrofobina. Tais composições incluem pré-misturas líquidas, por exemplo, pré-misturas usadas na obtenção de produtos de confeitaria congelados, e misturas secas, por exemplo, pós, às quais um

líquido aquoso, tal como o leite ou a água, é adicionado antes ou durante a aeração.

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

As composições para a obtenção de um produto alimentício congelado da invenção irão compreender outros ingredientes, além da hidrofobina, que são incluídos normalmente no produto alimentício, por
10 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, ou seja, aerada, para formar um produto alimentício aerado da invenção. As composições secas para a obtenção de um produto alimentício aerado da
15 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 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
20 aquoso, tal como a água ou o leite, e a composição está pronta para ser processada para formar um produto alimentício aerado da invenção. Estas composições secas, cujos exemplos incluem pós e grânulos, podem ser projetadas para o uso industrial e de varejo, e são beneficiadas com um volume reduzido e uma vida útil mais longa.

25 A hidrofobina é adicionada a uma composição em uma forma e em uma quantidade tais que fica disponível para estabilizar a fase de ar. Pelo termo "adicionada", entenda-se que a hidrofobina é introduzida deliberadamente no produto alimentício com a finalidade de tirar vantagem de

suas propriedades de estabilização da espuma. Conseqüentemente, onde estão presentes ou são adicionados ingredientes que contêm contaminadores 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 tais que tem a capacidade de automontagem em uma superfície de ar-líquido.

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

 Em uma realização, a hidrofobina é adicionada ao produto alimentício 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
20 formas, e com mais preferência pelo menos 75, 80, 85 ou 90% em peso. Uma vez adicionada, a hidrofobina é tipicamente submetida à montagem na interface de ar/líquido e, portanto, a quantidade de monômero, dímero e oligômero devem diminuir.

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

 A hidrofobina adicionada pode ser usada para estabilizar a fase de ar em um produto alimentício aerado, geralmente ao inibir o engrossamento

das bolhas, isto é, foi verificado 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 limitadores.

5

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um gráfico que mostra a expansão como uma função da concentração de proteína de hidrofobina, caseinato de sódio e leite em pó desnatado na água.

A Figura 2 é um gráfico que mostra a estabilidade de espuma de
10 0,1% em peso de hidrofobina expressa como expansão. A estabilidade da espuma é mostrada para o hidrofobina (1) na água (2) em uma solução de sacarose a 20% em peso e (3) em uma solução a 20% em peso de sacarose e 1% em peso de goma de guar.

A figura 3a é um gráfico que compara a estabilidade da espuma
15 de 0,1% em peso de hidrofobina na água com soluções aquosas de 2% em peso de caseinato de sódio, 2,86% em peso de leite em pó desnatado (equivalente a cerca de 1% em peso de proteína) e 6,67% em peso de proteína do soro de leite coalhado (equivalente a cerca de 2% em peso de proteína). As espumas produzidas ao usar a hidrofobina são consideravelmente mais
20 estáveis do que aquelas de proteínas convencionais.

A Figura 3b é um gráfico que compara a estabilidade da espuma de 0,1% em peso de hidrofobina e 2% em peso de caseinato de sódio em uma solução de sacarose a 20% em peso. A espuma produzida ao usar a hidrofobina é consideravelmente mais estável do que aquela do caseinato de
25 sódio a 2%.

A Figura 3c é um gráfico que compara a estabilidade da espuma de 0,1% em peso de hidrofobina e 2% em peso de caseinato de sódio em uma solução de 20% em peso de sacarose e 1% em peso de goma de guar. A

espuma produzida ao usar a hidrofobina é consideravelmente mais estável do que aquela do caseinato de sódio a 2%.

A Figura 4 é uma micrografia eletrônica de varredura de um produto alimentício aerado da invenção após (A) um dia e (B) duas semanas à temperatura fria.

A Figura 5 é um gráfico que mostra as propriedades reológicas interfaciais (G' e G'') da interface de ar/água na presença de hidrofobina. Deve ser observado que os valores aumentam a uma extensão tal que vão além da capacidade do instrumento.

A Figura 6 é um gráfico que mostra a elasticidade interfacial (G') na interface de ar/água de 0,00035% em peso de hidrofobina em comparação com 0,0007% em peso de caseinato de sódio e proteína do soro de leite coalhado. Embora a leitura da hidrofobina fique fora da escala, o resultado mostra que a elasticidade interfacial da hidrofobina é significativamente maior do que aquelas formadas por proteínas convencionais.

A Figura 7 é um diagrama que mostra os regimes de cisalhamento para os produtos congelados aerados.

A Figura 8 é uma micrografia eletrônica de varredura das microestruturas do produto - fresco e após o abuso (ampliação de 100 vezes).

A Figura 9 é uma micrografia eletrônica de varredura das microestruturas do produto - fresco e após o abuso (ampliação de 300 vezes).

EXEMPLO 1 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA

(a) Caseinato de Sódio, Proteína de Leite Desnatado ou Hidrofobina na Água

A capacidade de formação de espuma de hidrofobina II de *Trichoderma reesei* (HFB II) foi comparada àquela da proteína do leite, espumável utilizada extensamente, o caseinato de sódio (DMV International, Holanda. 88 a 90% de proteína, 1,5% de gordura e 6% de umidade) e leite

desnatado (United Milk, Reino Unido. 33 a 36% de proteína, 0,8% de gordura, 3,7% de umidade). A HFBII foi obtida junto à VTT Biotechnology, Finlândia (purificada de *Trichoderma reesei* essencialmente tal como descrito no pedido de patente WO 00/58342 e em Linder *et al.*, 2001, *Biomacromolecules* 2: 511 - 517).

A tabela abaixo mostra as concentrações das soluções de proteína que foram preparadas.

TABELA 1 - SOLUÇÕES PREPARADAS

	Fonte	Concentração	Tempo de
		% em peso	Cisalhamento (s)
10	<u>de proteína</u>		
	HFB II ex. <i>T. Reesei</i>	0,05	600
	HFB II ex. <i>T. Reesei</i>	0,08	600
	HFB II ex. <i>T. Reesei</i>	0,1	600
	Caseinato de sódio	0,1	600
15	Caseinato de sódio	0,5	300
	Caseinato de sódio	1	120
	Caseinato de sódio	2	60
	SMP	0,29	600
	SMP	1,43	345
20	SMP	2,86	165
	SMP	5,71	60

As soluções da proteína do leite foram preparadas ao usar um agitador magnético e a proteína foi borrifada na água à temperatura ambiente. A solução foi então aquecida até 60°C, mantida por cinco minutos e a seguir resfriada até 5°C. As soluções de HFB II foram preparadas ao usar um banho

25 ultra-sônico Sonicor modelo SC-42 (Sonicor Instrument Corp). A HFB II foi adicionada como uma alíquota ou um pó seco que foi sonificado durante 30 segundos a 1 minuto à temperatura ambiente até que toda a HFB ficasse

dispersa, e obtido um líquido transparente. Esta solução também foi resfriada até 5°C antes da aeração.

Espumas foram produzidas ao cisalhar cada solução por até um máximo de dez minutos em um recipiente cilíndrico revestido por aço inoxidável montado verticalmente resfriado (2°C) com proporções internas de 105 mm de altura e um diâmetro de 72 mm. A tampa do recipiente preenche 54% do volume interno, restando 46% (180 ml) para a amostra. O rotor usado para cisalhar a amostra consiste em um impulsor retangular das proporções corretas para raspar a borda da superfície do recipiente enquanto ele gira (dimensões de 72 mm x 41,5 mm). Ao rotor, também são unidas duas lâminas de elevado cisalhamento semicirculares (diâmetro de 60 mm) posicionadas a um ângulo de 45 graus ao acessório retangular.

80 ml da solução foram despejados no recipiente, o bastante para cobrir a metade do rotor, e a tampa foi fixada. A solução foi então cisalhada a 1.250 rpm para o período acima mencionado (Tabela 1). A solução aerada foi então despejada de imediato em um cilindro de medição, desse modo resultando uma medida de expansão de volume. A capacidade de formação de espuma que se refere ao volume da espuma é indicada em termos da porcentagem de "expansão", e baseada na definição de Arbuckle (ibid).

$$\% \text{ de expansão} = 100 \times (\text{volume da espuma} - \text{volume da solução não aerada}) / (\text{volume da solução não aerada})$$

A Figura 1 mostra as expansões obtidas para o caseinato de sódio, SMP e HFB II.

Estes resultados mostram que a hidrofobina é pelo menos tão espumável quanto o caseinato de sódio e o SMP, com uma concentração mais baixa necessária para gerar uma expansão similar.

(b) Caseinato de sódio e HFB na presença de outros ingredientes

O caseinato de sódio e a HFB II também foram aerados na presença

de 20% de sacarose (Tate & Lyle) e de 20% de sacarose + 0,5% de goma de guar (Willy Benecke, Alemanha, 78% de goma, 14% de umidade, 7% de proteína, 4% de resíduo insolúvel em ácido, 1% de gordura e 1% de cinza). No caso do caseinato de sódio com sacarose, os pós secos foram combinados e então adicionados

5 lentamente à água à temperatura ambiente que estava sendo misturada em um agitador magnético. A solução foi aquecida então até 60°C, mantida por cinco minutos e a seguir resfriada até 5°C. Quando a goma guar estava presente, o guar foi adicionado à solução em primeiro lugar com metade da sacarose à temperatura ambiente. Essa solução foi então aquecida até 80°C e mantida por cinco minutos

10 antes de ser resfriada até 60°C. O caseinato de sódio foi adicionado neste momento com restante da sacarose. A agitação foi continuada à temperatura por trinta minutos antes de ser resfriada até 5°C. No caso da HFB II, ela foi adicionada separadamente a uma solução de sacarose ou de sacarose e guar resfriada tanto como uma alíquota ou um pó seco. A mistura inicial foi executada em um agitador

15 magnético, seguida por trinta segundos no banho ultra-sônico. A Tabela 2 mostra as soluções preparadas.

Estas soluções foram aeradas por dez minutos tal como descrito na seção (a) e a expansão obtida pelo volume em um cilindro de medição. A Tabela 2 mostra a expansão obtida para cada amostra.

20

TABELA 2

<u>Amostra</u>	<u>Concentração de Proteína (% p/p)</u>	<u>Expansão média</u>
0,1% de NaCas + sacarose	0,1	78,75
0,1% de NaCas + sacarose + 0,5% de goma de guar	0,1	70
25 0,1% de NaCas + sacarose	0,1	55
0,1% de HFB + sacarose	0,1	75
0,1% de HFB + sacarose	0,1	83
0,1% de HFB + sacarose	0,1	96

Estes resultados mostram que a hidrofobina tem uma capacidade de formação de espuma similar ao caseinato de sódio em um sistema mais complexo que inclui o açúcar, e opcionalmente guar.

EXEMPLO 2 - ESTABILIDADE DA ESPUMA

5 A estabilidade de uma espuma de HFB II foi comparada a algumas proteínas do leite normalmente usadas: soro de leite coalhado, leite em pó desnatado e caseinato de sódio. Após a produção, as espumas foram despejadas em um cilindro de medição para avaliar a sua estabilidade em termos do volume da espuma como uma função do tempo. O volume da
10 espuma é indicado em termos da porcentagem de "expansão", e baseada na definição de Arbuckle (ibid).

% de Expansão = $100 \times (\text{volume da espuma} - \text{volume da solução não aerada}) /$
(volume da solução não aerada)

A estabilidade destas espumas foi medida ao monitorar as
15 amostras contidas em cilindros de medição de 250 ml e ao registrar o nível de soro e a altura da espuma com o passar do tempo à temperatura ambiente. O líquido nas espumas drena com o passar do tempo, conduzindo a duas camadas separadas e distintas: uma espuma em cima, e a solução aquosa em baixo. Isto ocorre porque a fase aquosa não
20 contém uma quantidade significativa ou qualquer agente de viscosidade. No entanto, é a estabilidade da fase da espuma que é o ponto de interesse neste caso. Para o cálculo da expansão, o volume da espuma é tomado como o volume inteiro do sistema, isto é, ambas a fase de ar (espuma) e a fase líquida, independente do fato se elas se separaram em duas camadas
25 distintas. O valor de expansão fornece, portanto, uma indicação quantitativa da estabilidade da espuma para os mecanismos de rompimento típicos, tal como a coalescência (com eles mesmos e a atmosfera) e o desproporcionamento.

As proteínas foram dispersas em água apenas e na presença de 20% de sacarose e 20% de sacarose + 1% de goma de guar. A Tabela 3 mostra as amostras que foram preparadas. O pó do soro de leite coalhado (Avonol 600 - 30% em peso de proteína, 3,5% em peso de umidade, 2,5% em peso de gordura, 7% em peso de cinza e 53% em peso de lactose) foi obtido junto à Glanvia, Irlanda.

TABELA 3

Fonte	Concentração	Tempo de
<u>de proteína</u>	<u>de proteína</u>	<u>cisalhamento (s)</u>
HFB II	0,1	600
10 HFB II + 20% de sacarose	0,1	600
HFB II + 20% de sacarose e 1% de goma de guar	0,1	600
Caseinato de sódio	2	60
Caseinato de sódio + 20% de sacarose	2	60
Caseinato de sódio + 20% de sacarose e 1% de goma de guar	2	60
15 Leite em pó desnatado	2,86	165
Pó de soro de leite coalhado	6,67	45

As soluções da proteína do leite foram preparadas ao usar um agitador magnético e a proteína foi borrifada na água à temperatura ambiente. A solução foi então aquecida até 60°C, mantida por cinco minutos e a seguir resfriada até 5°C. As soluções de HFB II foram preparadas ao usar um banho ultra-sônico Sonicator modelo SC-42 (Sonicator Instrument Corp). A HFB II foi adicionada como uma alíquota ou um pó seco que foi sonicado por 30 segundos a 1 minuto à temperatura ambiente até que toda a HFB ficasse dispersa, e obtido um líquido transparente. Esta solução também foi resfriada até 5°C antes da aeração.

Quando 20% de sacarose e 20% de sacarose + 0,5% de guar estavam presentes, a preparação foi ligeiramente diferente. No caso do caseinato de sódio com sacarose, os pós secos foram combinados e então

borrifados na água à temperatura ambiente que estava sendo misturada em um agitador magnético. A solução foi então aquecida até 60°C, mantida por cinco minutos e então resfriada até 5°C. Quando a goma de guar estava presente, o guar foi adicionado à solução em primeiro lugar com metade da sacarose à temperatura ambiente. Esta solução foi então aquecida até 80°C e mantida por 5 minutos antes de ser resfriada até 60°C. O caseinato de sódio foi adicionado neste momento com o restante da sacarose, e a agitação foi continuada à temperatura por trinta minutos antes do resfriamento até 5°C. No caso da HFB II, ela foi adicionada separadamente a uma solução de sacarose ou sacarose e guar resfriada como uma alíquota ou um pó seco. A mistura inicial foi executada em um agitador magnético, seguida por trinta segundos no banho ultra-sônico. Espumas foram produzidas tal como descrito no Exemplo 1, exceto pelo fato que termos diferentes desse cisalhamento foram usados de modo a gerar em cada caso cerca de 100% de expansão.

A micro-estrutura da espuma de hidrofobina foi visualizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura a Baixa Temperatura (LTSEM). A amostra de espuma foi cisalhada em primeiro lugar a +5°C e mergulhada em nitrogênio líquido. A amostra foi mantida a -80°C em gelo seco antes da preparação da amostra de SEM. Uma seção da amostra foi cisalhada com cuidado por causa de sua estrutura muito frágil. Esta seção, com um tamanho de cerca de 6 mm x 6 mm x 10 mm, foi montada em um suporte de amostra ao usar um composto: OCT TM no ponto de congelamento (fornecido pela Agar Scientific). A amostra incluindo o suporte é mergulhada em uma lama de nitrogênio líquido e transferida para uma câmara de preparação a baixa temperatura: Oxford Inst. CT1500HF. A câmara está sob vácuo, cerca de 0,01 a 0,001 Pa (10^{-4} a 10^{-5} mbars). A amostra é mantida em uma temperatura abaixo de -110°C em um estágio frio. A amostra é fraturada dentro da câmara ao usar uma lâmina de bisturi e revestida com ouro ao usar plasma de argônio.

Este processo também ocorre sob vácuo com uma pressão aplicada de 10 Pa (10^{-1} milibars) e uma corrente de 5 miliamperes por trinta segundos. A amostra é então transferida para um microscópio eletrônico de varredura convencional (JSM 5600), equipado com um estágio frio da Oxford Instruments a uma
5 temperatura de -150°C . A amostra é examinada e as áreas de interesse são capturadas através de um software de aquisição de imagem digital.

Resultados - Estabilidade de espuma da espuma criada ao usar a hidrofobina

A espuma produzida ao usar a hidrofobina permaneceu estável
10 por um período de tempo longo em todos os três sistemas testados (água, + sacarose + sacarose e guar) - vide a Figura 2.

Resultados - Comparação da estabilidade da espuma das proteínas na água.

As espumas produzidas a partir de caseinato de sódio, leite em pó desnatado e a proteína do soro de leite coalhado são todas muito instáveis em
15 comparação com a espuma produzida ao usar a hidrofobina (vide a figura 3A). Além disso, concentrações mais altas de soluções de leite em pó desnatado e de proteína do soro de leite coalhado são requeridas para obter uma expansão inicial de 100% do que a concentração necessária para a hidrofobina.

Resultados - Comparação da estabilidade de espuma de
20 hidrofobina e caseinato de sódio na presença de sacarose/goma de guar.

As espumas produzidas ao usar a hidrofobina permaneceram muito estáveis por um período de tempo considerável (duas semanas), ao passo que as espumas produzidas ao usar o caseinato de sódio eram estáveis por menos de vinte minutos na presença da sacarose (Figura 3b) e menos de duas horas na presença da
25 sacarose e da goma de guar (Figura 3c).

Portanto, a hidrofobina pode ser usada a uma concentração baixa para criar quantidades significativas de espuma que permanecem muito estáveis em relação às outras proteínas normalmente usadas.

Em resumo, os dados mostram que a espuma que é criada com 0,1% de HFB II é mais estável que aquelas produzidas pelas outras proteínas testadas. Todas as espumas drenam com o passar do tempo (o que pode ser reduzido pela adição de espessantes), mas as bolhas para as espumas de hidrofobina ainda permanecem estáveis, isto é, o sistema da espuma ainda retém o ar (expansão). Além disso, foi verificado que as bolhas presentes nas espumas feitas com hidrofobina permanecem estáveis ao engrossamento das bolhas a temperaturas frias por pelo menos duas semanas (vide a Figura 4, que mostra as micrografias de SEM que demonstram que o tamanho da bolha fica substancialmente inalterado depois de duas semanas). Desse modo, a hidrofobina melhora a estabilidade de espuma em termos do volume da espuma e do tamanho da bolha. Deve ser observado que as fraturas observadas na superfície das bolhas devem ser peculiaridades do procedimento de preparação de SEM.

EXEMPLO 3 - MEDIÇÃO DA VISCOSIDADE DA SUPERFÍCIE E DA ELASTICIDADE AO USAR

15

A REOMETRIA DE SUPERFÍCIE

Um reômetro interfacial Camtel CIR-100 (Camtel Instruments Limited, Royston, Herts, Reino Unido), foi usado para medir a viscosidade superficial e a elasticidade. Tais dados fornecem uma indicação de quão bem uma molécula adsorvida irá estabilizar uma espuma.

20

O instrumento foi usado no modo de ressonância normalizada, ao usar um anel du Nouy de 13 mm de diâmetro na superfície do líquido em um prato de amostra de 46 mm de diâmetro. O anel oscila na superfície da amostra, e um sensor de deslocamento de alta resolução é usado para monitorar a amplitude da tensão na faixa de ± 1 .

25

Cada corrida foi executada ao usar as mesmas condições experimentais. As corridas eram varreduras do tempo, com a frequência de partida em 3 Hz, e a amplitude de partida em 10.000 μ radianos, e as medidas foram tomadas à temperatura ambiente. A duração do teste foi ajustada em

36.000 segundos, com 240 pontos de dados agrupados durante esse tempo. Os parâmetros físicos de interesse são G' (módulo de armazenagem) e G'' (módulo de perda) como uma função do tempo, os quais fornecem uma indicação da viscoelasticidade da camada de superfície adsorvida.

5 As amostras da proteína foram diluídas com água até a concentração requerida. As medições da reologia de superfície são feitas em relação à água pura, a qual foi medida antes da medição das soluções de proteína.

Os dados da reologia de superfície são mostrados nas Figuras 5 e 6. Para a proteína hidrofobina, G' e G'' aumentam gradualmente com o
10 passar do tempo, antes de um aumento rápido em ambos ser observado. Nos exemplos mostrados, os valores aumentam até uma extensão tal que vão além das capacidades de medição da configuração experimental. Até mesmo às concentrações muito baixas (menos de 0,001% em peso), os valores para G' e G'' atingem valores muito maiores do que aqueles das proteínas usadas como
15 comparações: a proteína do soro de leite coalhado e o caseinato de sódio.

Pode ser concluído a partir destes dados que a hidrofobina estabiliza as espumas eficazmente ao formar camadas de superfície viscoelásticas muito fortes em torno das bolhas. Estes conduzem a uma boa estabilidade versus os mecanismos de desestabilização de espuma típicos, tais como a coalescência e o
20 desproporcionamento. Acredita-se que as espumas de proteína do soro de leite coalhado e o caseinato de sódio são ambas menos estáveis do que a espuma de hidrofobina, uma vez que as camadas de superfície não exibem valores de G' e G'' tão elevados quanto à hidrofobina em concentrações comparáveis da solução.

Por conseguinte, as hidrofobinas podem ser usadas para inibir o
25 engrossamento das bolhas em um produto alimentício aerado, por exemplo, ao inibir ou reduzir o desproporcionamento e/ou a coalescência. Analogamente, as hidrofobinas podem ser usadas para estabilizar as espumas em um produto alimentício aerado. Além disso, devido ao fato que as hidrofobinas inibem o

engrossamento das bolhas, será possível melhorar a retenção da forma e a rigidez de produtos aerados.

EXEMPLO 4 - PRODUTOS CONGELADOS AERADOS

Os produtos congelados aerados foram preparados ao usar três

5 tipos de proteína:

A: Caseinato de Sódio (Na Cas)

B: Leite em Pó Desnatado (SMP)

C: Hidrofobina (HFBII) de *Trichoderma reesei*

As propriedades microestruturais e físicas dos produtos foram

10 comparadas, tanto antes quanto depois de regimes de abuso da temperatura.

MATERIAIS

Os detalhes dos materiais usados são resumidos na Tabela 4 e as formulações a partir das quais cada um dos produtos congelados aerados foi preparado são mostradas na Tabela 5.

<u>Ingrediente</u>	<u>Composição</u>	<u>Fornecedor</u>
Caseinato de sódio	88 – 90% de proteína, 1,5% de gordura, 6% de umidade	DMV International, Holanda
Leite em pó desnatado	33 – 36% de proteína, 0,8% de gordura, 3,7% de umidade	United Milk, Reino Unido
Hidrofobina do tipo II (HFB II)	Purificada de <i>Trichoderma reesei</i> essencialmente tal como descrito no pedido de patente WO 00/58342 e em Linder <i>et al.</i> 2001, <i>Biomacromolecules</i> 2: 511 – 517).	VIT Biotechnology, Finlândia
Óleo de coco refinado		Van den Bergh Foods, Ltd
Sacarose		Tate and Lyle, Reino Unido

TABELA 4. MATERIAIS USADOS

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

10 Tabela 5. Formulações usadas

PREPARAÇÃO DOS PRODUTOS CONGELADOS AERADOS

PREPARAÇÃO DA MISTURA (EMULSÃO)

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

Para a Mistura C (que contém HFB II), a sacarose foi dispersa em
 25 primeiro lugar em água fria com agitação. Em seguida, metade da concentração requerida de HFB II foi adicionada a esta como uma alíquota. A solução foi então sonificada suavemente em um banho sônico por trinta segundos para dispersar totalmente a HFB II. Esta solução foi então agitada

em um agitador magnético e aquecida até 40°C. Antes de a gordura derretida ser adicionada, a solução foi sonicada outra vez em um banho sônico por trinta segundos. A gordura derretida foi então adicionada e a mistura foi emulsionada e resfriadas tal como descrito para as misturas A e B. Outra alíquota de HFB II
 5 foi então adicionada a esta solução fria para elevar a concentração da HFB II até 0,2%. O primeiro 0,1% de HFB II foi para emulsionar e estabilizar a gordura. A segunda adição de HFB II deve fornecer o excesso adequado de HFBII para obter uma boa estabilidade de aeração e de espuma.

A análise do tamanho de partícula nas emulsões frias foi feita ao
 10 usar um Malvern Mastersizer 2000.

ANÁLISE DAS EMULSÕES

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

15 <u>Mistura</u>	<u>Diâmetro da gota de gordura</u>
	<u>D(3,2) / μm</u>
A (Na Cas)	0,4
B (SMP)	0,25
C (HFB II)	1,88

20 Tabela 6. Tamanho de partícula da emulsão tal como medido ao usar o Malvern Mastersizer 2000.

PROCESSO DE CONGELAMENTO COM CISALHAMENTO

80 ml da mistura foram cisalhados e congelados simultaneamente no recipiente descrito no Exemplo 1. Essencialmente, um protótipo aerado e
 25 congelado é produzido tal como segue: A mistura dentro do recipiente encerrado é misturada com um impulsor a uma taxa de cisalhamento elevada a fim de incorporar o ar. Simultaneamente, o agente refrigerante flui em torno da camisa do recipiente para resfriar e congelar a mistura. O impulsor também

raspa a parede interna, removendo o gelo que é ali formado e incorporando este ao restante da mistura. O elevado cisalhamento é usado para aerar inicialmente a mistura, e então a taxa de cisalhamento é desacelerada a fim de permitir resfriamento e congelamento melhores. Os regimes de cisalhamento
5 usados para cada mistura são apresentados graficamente na Figura 7.

Para a etapa de congelamento e aeração com as Misturas A e B (que contêm caseinato de sódio e leite em pó desnatado, respectivamente) o agente refrigerante (ajustado em -18°C) foi ajustado para circular a partir do tempo = 0 minuto. A agitação relativamente lenta no início para as Misturas A e
10 B permitiu o resfriamento da mistura e a geração de um pouco de viscosidade (através da formação e da incorporação de gelo) antes da aeração ao usar um cisalhamento mais elevado. Um tempo curto à alta velocidade incorporou o ar e a velocidade foi então reduzida para permitir que as amostras alcançassem pelo menos -5°C .

15 Para a Mistura C (que contém HFB II) o recipiente foi resfriado até cerca de 5°C e a amostra foi adicionada, e o cisalhamento elevado para a aeração foi iniciado. O agente refrigerante (ajustado em -18°C) não foi colocado para circular antes de nove minutos devido ao tempo aumentado requerido para gerar 100% de expansão. Uma vez que o agente refrigerante
20 foi colocado para circular (em nove minutos), foi adotado o mesmo padrão de cisalhamento-resfriamento que o anterior (para A e B).

Ao final do processo, a expansão foi medida e as amostras (cerca de 15 g) foram colocados em recipientes pequenos. Cada produto foi ainda resfriado por dez minutos em um freezer ajustado em -80°C antes de ser
25 armazenado a -20°C .

ANÁLISE DE PRODUTOS CONGELADOS AERADOS

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

(a) -20°C . A análise subsequente foi feita dentro de uma semana da produção e este produto foi julgado como o produto "fresco".

(b) As amostras submetidas a abusos de temperatura foram colocadas sob armazenagem a -10°C por uma ou duas semanas, e então armazenadas
5 subsequente a -20°C antes da análise.

	<u>Amostra</u>	<u>Tempo de cisalhamento</u>	<u>Expansão</u>	<u>Temperatura do</u>
		a 1.200 rpm		produto final
		min	%	$^{\circ}\text{C}$
	A (Na Cas)	1	103	-5,3
10	B (SMP)	1	98	-8
	B (SMP)	1	94	-5,8
	C (HFB II)	10	75	-5

Tabela 8. Detalhes do processo e expansão do produto para os produtos preparados a partir das Misturas A, B, e C.

15 Os produtos finais foram analisados tal como segue:

Expansão do produto recém produzido

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

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

20 EXPANSÃO

A expansão para cada um dos produtos é resumido na Tabela 8.

Todas as misturas eram aeráveis e incorporaram quantidades significativas de ar.

ESTABILIDADE MICRO-ESTRUTURAL: METODOLOGIA

25 *Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)*

A micro-estrutura de cada um dos produtos foi visualizada ao empregar a Microscopia Eletrônica de Varreadura a Baixa Temperatura (LTSEM). A amostra foi resfriada até -80°C em gelo seco e uma seção da

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

ANÁLISE MICRO-ESTRUTURAL: RESULTADOS

A Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) foi usada para examinar a micro-estrutura dos produtos congelados frescos e submetidos a abusos de temperatura. As imagens representativas podem ser vistas nas Figuras 8 e 9 em ampliações diferentes.

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

mostram um engrossamento muito intenso da estrutura do gás e gelo quando submetidos a abusos de temperatura a -10°C depois de apenas uma semana.

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

COMPORTAMENTO EM FUSÃO: METODOLOGIA

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

COMPORTAMENTO EM FUSÃO: RESULTADOS

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

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

DIFERENÇAS TEXTURAIS ENTRE OS PRODUTOS A, B, E C

Diferenças evidentes na textura entre as três amostras também puderam ser observadas após uma armazenagem de uma semana a -10°C (isto é, as amostras submetidas a abusos de temperatura). Na manipulação do

produto obtido ao usar caseinato de sódio (A) e leite em pó desnatado (B), foi observado que estes têm uma textura muito macia e muito flocosa, o que era difícil de remover de maneira limpa do papel de silício usado para forrar o recipiente de amostra. O produto obtido ao usar a HFBII (C), por outro lado, era
5 muito firme e soltou de maneira bastante limpa o forro de papel usado para forrar o recipiente de amostra. Em outras palavras, o produto preparado ao usar HFBII exibe uma estabilidade muito maior aos abusos de temperatura em uma escala tanto microscópica quanto macroscópica do que o produto preparado ao usar caseinato de sódio ou leite em pó desnatado.

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

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

REIVINDICAÇÕES

1. PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina e menos de 1% em peso de hidrofobina.

5 2. PRODUTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende hidrofobina na forma isolada.

3. PRODUTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que a hidrofobina é uma hidrofobina da classe II.

10 4. PRODUTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é um produto alimentício congelado.

5. PRODUTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é um produto alimentício resfriado.

15 6. PRODUTO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é um produto de confeitaria aerado.

7. COMPOSIÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a composição compreende hidrofobina na forma isolada em conjunto com os ingredientes restantes do produto alimentício.

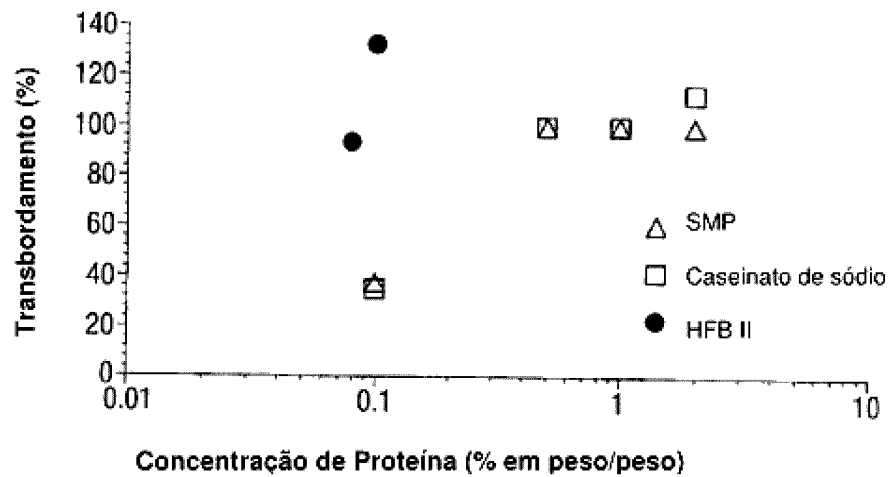
20 8. COMPOSIÇÃO SECA PARA A OBTENÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, conforme descrito em uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a composição compreende hidrofobina na forma isolada em conjunto com os ingredientes não líquidos restantes do produto alimentício.

9. USO DE UMA HIDROFOBINA, caracterizado pelo fato de ser em um método de inibição do engrossamento de bolhas em um produto alimentício aerado.

10. USO DE UMA HIDROFOBINA, caracterizado pelo fato de ser em um método de aumento da retenção da forma e /ou rigidez em um produto alimentício aerado.

FIG. 1

Transbordamento versus [Proteína]

**FIG. 2**

Estabilidade da espuma para 0,1% de HFB II expressa como transbordamento

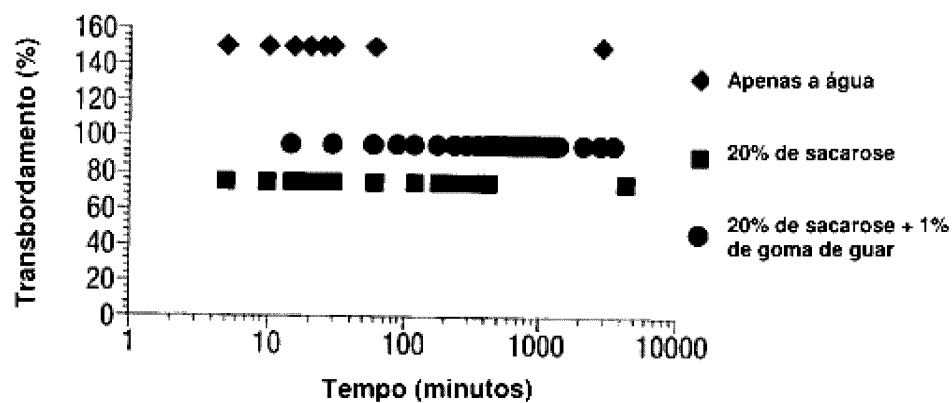
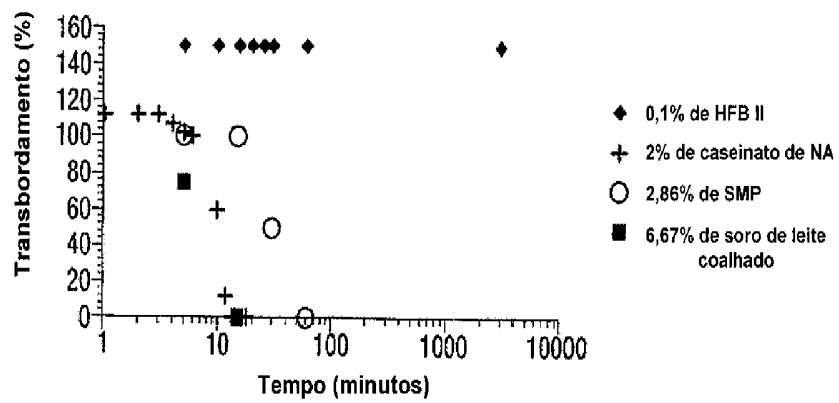


FIG. 3A

Estabilização da espuma como transbordamento

**FIG. 3B**

Estabilização da espuma em 20% de sacarose expressa como transbordamento

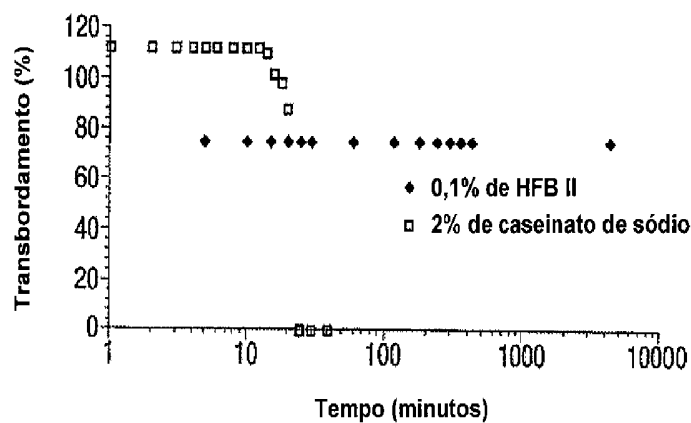


FIG. 3C

Estabilização da espuma em 20% de sacarose e 1% de goma de guar expressa
como transbordamento

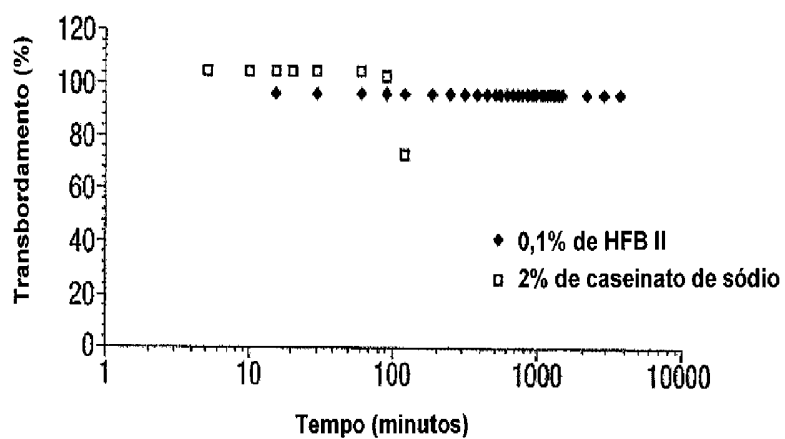
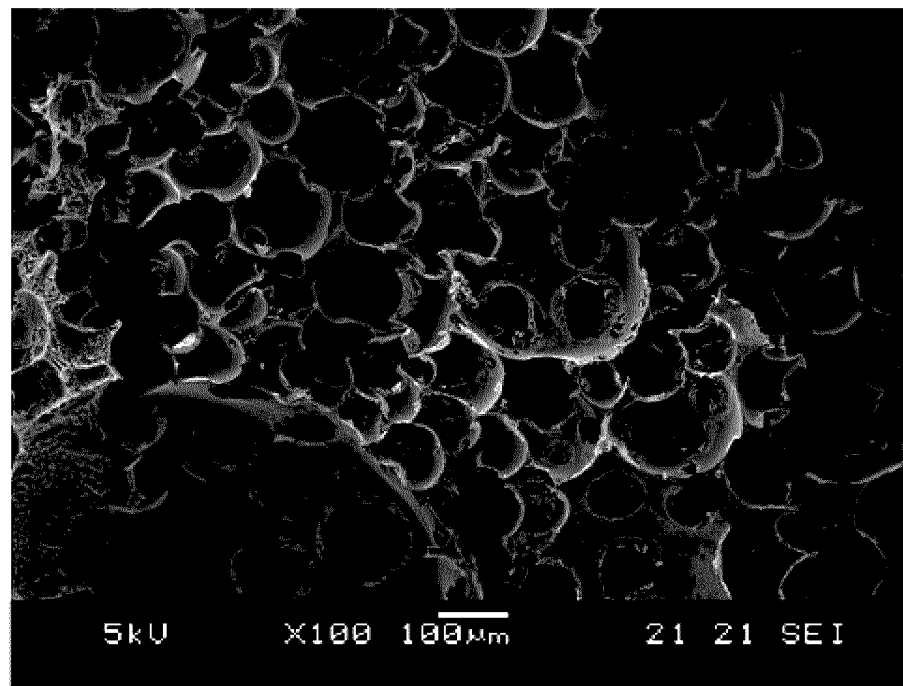


FIG. 4

A (1 dia à temperatura fria)



B (2 semanas à temperatura fria)

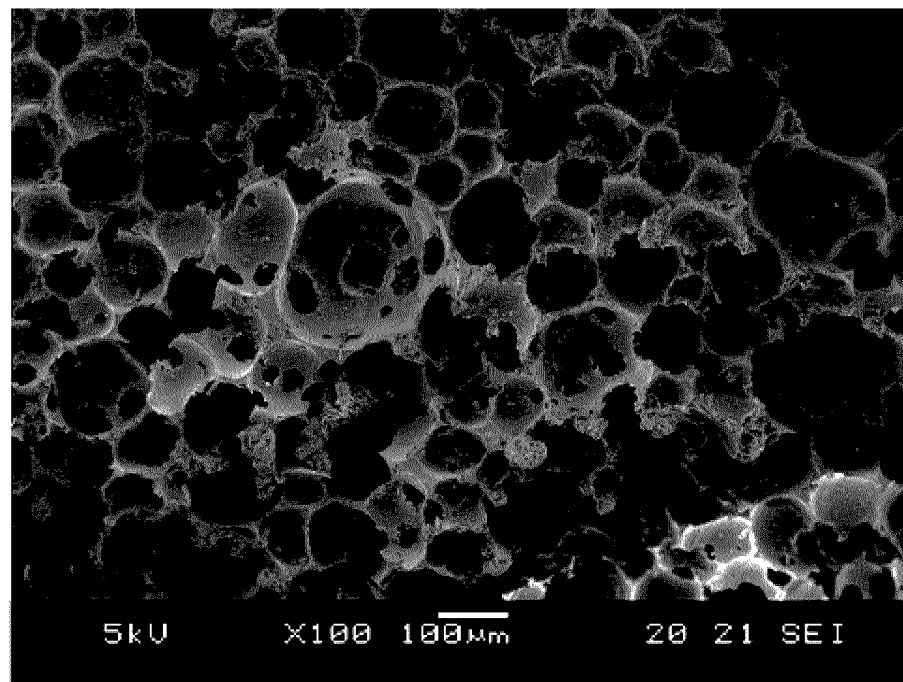


FIG. 5

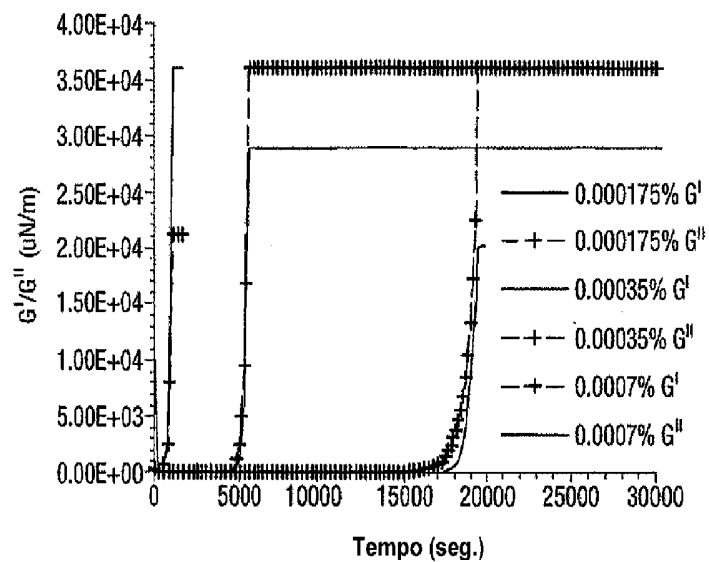


FIG. 6

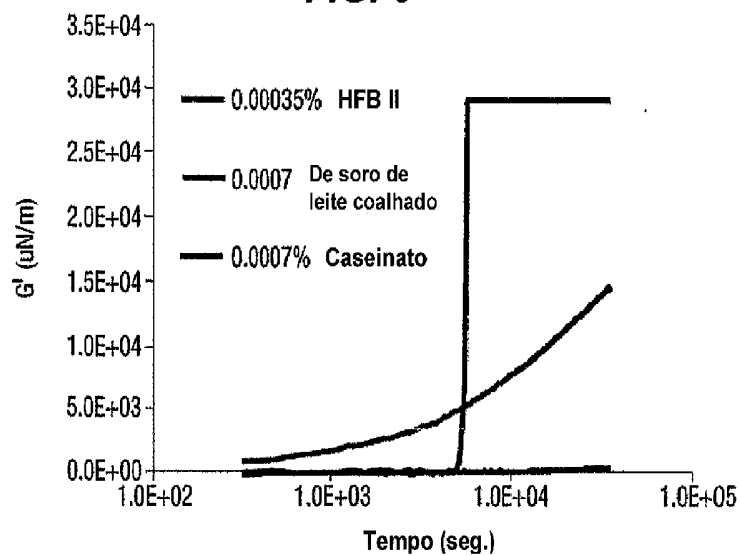
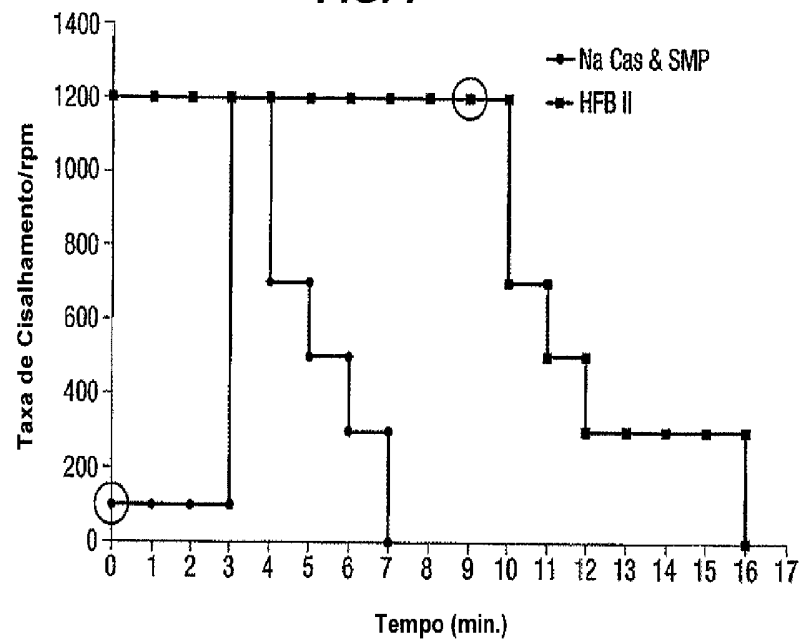
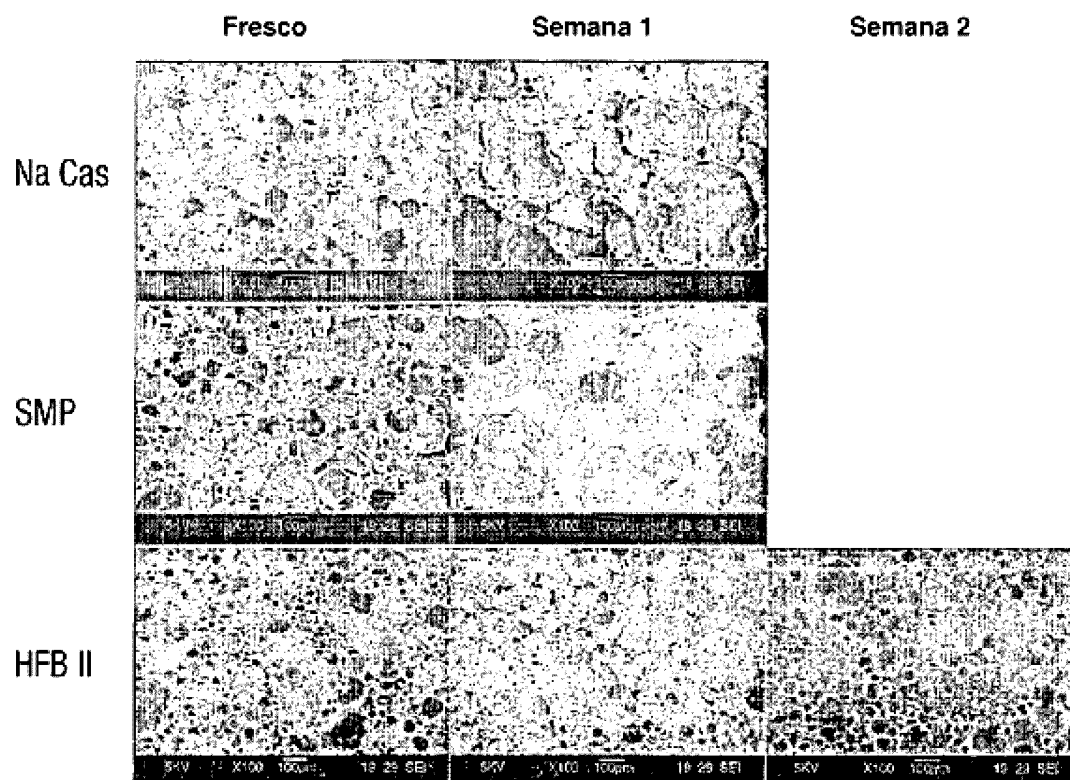
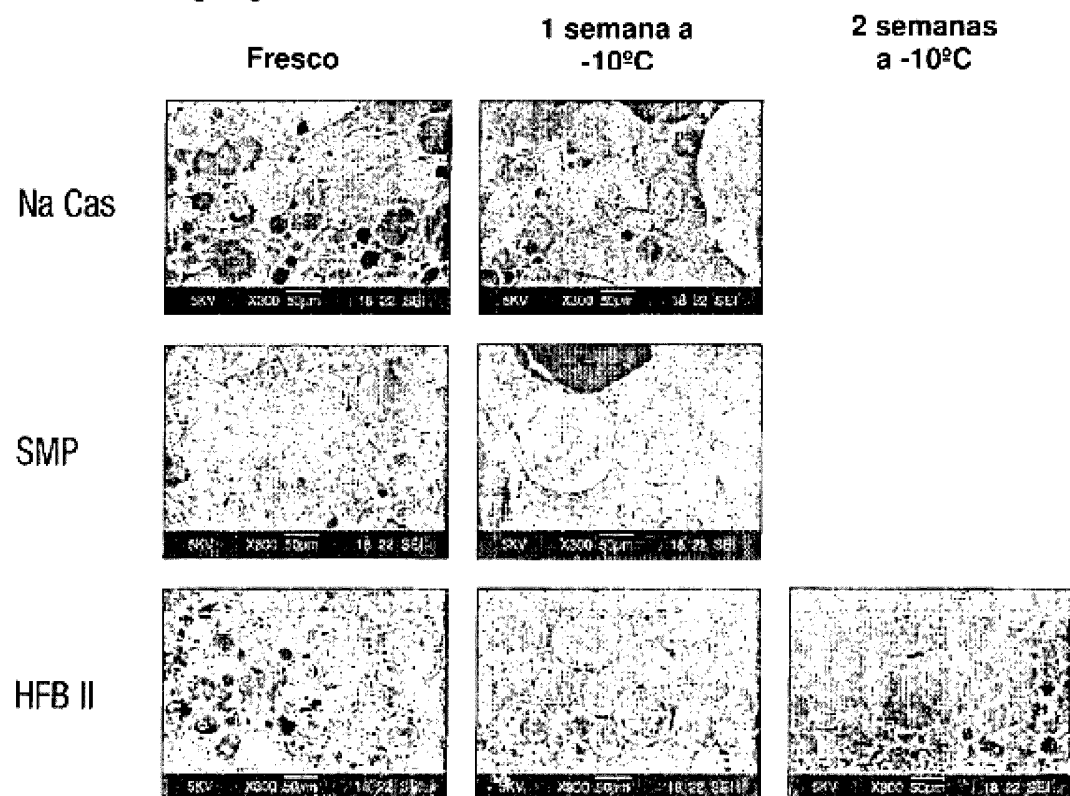


FIG. 7

○ Refrigeração ajustada em -18°C

FIG. 8**FIG. 9**

RESUMO

**“PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, COMPOSIÇÃO PARA A OBTENÇÃO
DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO, COMPOSIÇÃO SECA PARA A
OBTENÇÃO DE UM PRODUTO ALIMENTÍCIO AERADO E USOS DE UMA
HIDROFOBINA”**

5

A presente invenção se refere a um produto alimentício aerado que inclui hidrofobina. Também é apresentado o uso de uma hidrofobina em um método de inibição do engrossamento de bolhas em produtos alimentícios aerados.