



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

(21) **PI0617053-6 A2**

(22) Data de Depósito: 13/09/2006
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



(51) Int.Cl.:

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

(54) Título: **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO AERADA CONGELADA E USO DE UMA HIDROFOBINA**

(30) Prioridade Unionista: 23/09/2005 EP 05255944.0,
10/11/2005 EP 05256960.5, 10/11/2005 EP 05256960.5, 23/09/2005
EP 05255944.0

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

(72) Inventor(es): Andrew Baxter Russel, Andrew Richard Cox,
Jennifer Elizabeth Homan

(74) Procurador(es): Paola Calabria Mattioli

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006008993 de 13/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039066 de 12/04/2007

(57) Resumo: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO AERADA CONGELADA E USO DE UMA HIDROFOBINA. A presente invenção refere-se a um processo para a produção de uma composição aerada congelada, sendo que o processo compreende a aeração de uma mistura aquosa, seguida pelo congelamento quiescente da mistura aerada, caracterizado em que a mistura compreende a hidrofobina.

“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO AERADA CONGELADA E USO DE UMA HIDROFOBINA”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos processos para a produção das
5 composições aeradas congeladas, em particular, aos processos que
compreendem as etapas de aeração da mistura aquosa para formar uma espuma,
seguido pelo congelamento quiescente da espuma.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As composições aeradas congeladas, por exemplo, sorvetes,
10 sorbet e iogurte congelado, são produzidas convencionalmente por um
processo onde a aeração e o congelamento ocorrem simultaneamente. A fim
de obter a aeração, deve ser aplicado o cisalhamento ou a agitação à
composição durante o congelamento. Isto requer equipamentos de
processamento caros e complexos, tais como trocadores de calor de superfície
15 raspada, e a restrição de seu uso; por exemplo, tal equipamento não está, em
geral, disponível aos consumidores em suas cozinhas.

Uma abordagem alternativa é separar as etapas de aeração e
congelamento, isto é, formando uma mistura aerada (isto é, uma espuma) e
então congelando sua espuma em uma etapa do processo subsequente. A
20 etapa de congelamento pode, portanto, ser quiescente, isto é, sem
cisalhamento ou agitação, uma vez que a aeração já foi obtida. O
documento US 6.187.365 descreve um processo para a produção de uma
barra congelada aerada moldada pela preparação de uma mistura de
ingredientes apropriados para uma barra aerada congelada, espumando a
25 mistura para obter uma mistura aerada possuindo um aumento de volume
(*overrun*) entre cerca de 20% e cerca de 250%, moldando a mistura aerada
para gerar uma mistura moldada e congelando a mistura aerada moldada
para produzir a barra aerada congelada moldada.

Há dois problemas com esta abordagem. Em primeiro lugar, as espumas não congeladas são instáveis por longos períodos de tempo. O desproporcionamento e a coalescência levam ao crescimento da bolha, e a cremeação (devido à flutuabilidade das bolhas de ar) leva à separação da fase vertical resultando em uma grande proporção de bolhas próximas à superfície superior e à depleção das bolhas no fundo. Isto normalmente significa que a etapa de congelamento deve seguir a etapa de aeração quase que imediatamente para minimizar o efeito desta instabilidade no produto final. Em segundo lugar, uma perda significativa de gás pode ocorrer durante o congelamento quiescente conforme os cristais de gelo que crescem empurram fisicamente as bolhas de gás para fora da mistura. Este efeito é mais pronunciado para bolhas de gás grandes porque os cristais de gelo são menos capazes de crescer ao redor das bolhas. Assim, ainda permanece uma demanda por um método simples e barato de produção de composições congeladas aeradas por congelamento.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

No nosso pedido de patente WO 06/010425, foi revelado que uma proteína fúngica, designada hidrofobina, possibilita a produção de espuma com excelente estabilidade com relação ao desproporcionamento e a coalescência. A hidrofobina é um ativo de superfície que age como um agente de aeração, enquanto que também parece conferir uma natureza altamente viscoelástica na superfície das bolhas de ar.

É revelado agora que é possível reter o gás durante um processo que compreende uma etapa de aeração seguida por uma etapa de congelamento quiescente quando a hidrofobina é utilizada. A hidrofobina estabiliza as bolhas de gás durante o armazenamento entre as etapas de aeração e congelamento, e também durante o congelamento. Conseqüentemente, a presente invenção fornece um processo para a produção de uma composição aerada congelada, em que o processo compreende a aeração de uma mistura aquosa, seguida pelo

congelamento quiescente da mistura aerada, caracterizado pelo fato de que a mistura compreende a hidrofobina.

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

5 De preferência, a hidrofobina está em uma forma substancialmente isolada.

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

De preferência, a composição aerada congelada possui um aumento de volume de pelo menos 25%.

10 De preferência, a composição aerada congelada é um produto alimentício. De maior preferência, o produto alimentício é um produto de confeito congelado. De maior preferência, o produto de confeito congelado é um sorvete.

De preferência, a etapa de aeração é selecionada a partir do grupo que consiste em mistura contínua, mistura em batelada, injeção de gás, gás em
15 transporte por uma corrente fluida, geração de gás por meio de uma reação química ou bioquímica e liberação do gás aprisionado em uma solução ou sólido.

De preferência, a etapa de congelamento é selecionada a partir do grupo que consiste em colocar um recipiente contendo a mistura aquosa em um ambiente frio; submergir um molde contendo a mistura em um banho de
20 refrigerante frio; colocar as porções da mistura diretamente em um banho de fluido criogênico; congelar o filme; e aspergir as gotas da mistura em um ambiente frio.

De preferência, a mistura adicional compreende um agente gerador de tensão. De preferência, o agente gerador de tensão é um polissacarídeo, de maior preferência, um polissacarídeo bacteriano, tal como a xantana e/ou a gelana.

25 Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece um processo para a produção de uma composição aerada congelada, em que o processo compreende o fornecimento de uma mistura aquosa que compreende a hidrofobina, aeração da mistura, seguido por congelamento quiescente da mistura aerada.

Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece uma composição aerada de congelamento quiescente contendo a hidrofobina.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um produto obtido pelos processos da presente invenção. Também é fornecido um produto capaz de ser obtido pelos processos da presente invenção.

Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece o uso de uma hidrofobina para a estabilização de uma composição aerada durante o congelamento quiescente.

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 fabricação, na química e na biotecnologia de confeitos gelados e confeitos congelados). As definições e as descrições dos diversos termos e técnicas empregados na fabricação de confeitos gelados/ congelados são encontradas em *Ice Cream*, 4ª Edição, Arbuckle (1986), Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY. As técnicas padrão utilizadas para os métodos moleculares e bioquímicos podem ser encontradas em Sambrook et al., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3ª ed. (2001) Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., e em Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. – e a versão completa intitulada *Current Protocols in Molecular Biology*). As fontes de referências úteis que descrevem os polissacarídeos e o comportamento de suas soluções são: "Food polysaccharides and their applications", ed. A. M. Stephen, Marcel Dekker Inc., 2005 "Food Gels", ed P. Harris, Elsevier, 1990.

HIDROFOBINAS

As hidrofobinas constituem uma classe bem definida de proteínas (Wessels, 1997, *Adv. Microb. Physio.* 38: 1 - 45; Wosten, 2001, *Annu Rev.*

Microbiol. 55: 625 - 646) com capacidade de auto-organização em uma interface hidrofóbica/ hidrofílica, e possui uma seqüência conservada:

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

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

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

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

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

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

As hidrofobinas identificadas até a presente data são, em geral, classificadas como classe I ou classe II. Ambos os tipos foram identificados nos
5 fungos como as proteínas secretadas que se auto-organizam em interfaces hidrofóbicas em filmes anfipáticos. As organizações de hidrofobinas da classe I são relativamente insolúveis, enquanto que aquelas hidrofobinas de classe II se dissolvem de imediato em uma variedade de solventes.

As proteínas do tipo hidrofobinas também foram identificadas nas
10 bactérias filamentosas, tais como *Actinomycete* e *Streptomyces sp.* (documento WO 01/74864). Estas proteínas bacterianas, ao contrário das hidrofobinas fúngicas, formam somente até uma ponte de dissulfeto, uma vez que elas possuem apenas dois resíduos de cisteína. Tais proteínas são um exemplo de equivalentes funcionais para as hidrofobinas que possuem as seqüências de consenso
15 mostradas nas SEQ ID no. 1 e 2, e estão dentro do escopo da presente invenção.

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

Alternativamente, as hidrofobinas podem ser obtidas pelo uso da tecnologia recombinante. Por exemplo, as células hospedeiras, tipicamente

micro-organismos, podem ser modificadas para que expressem hidrofobinas, e as hidrofobinas podem então ser isoladas e utilizadas de acordo com a presente invenção. As técnicas para introduzir as construções de ácido nucléico que codificam hidrofobinas em células hospedeiras são bem conhecidas no estado da técnica. Mais de 34 genes que codificam as hidrofobinas foram clonados, mais de 16 espécies fúngicas (vide, por exemplo, o documento WO 96/41882 que fornece a seqüência de hidrofobinas identificadas em *Agaricus bisporus*; e em Wosten, 2001, *Annu Rev. Microbiol.* 55: 625 – 646). A tecnologia recombinante também pode ser utilizada para modificar seqüências de hidrofobina ou sintetizar novas hidrofobinas que possuem propriedades desejadas/ aprimoradas.

Tipicamente, uma célula ou um organismo hospedeiro apropriado é transformado por uma construção de ácido nucléico que codifica a hidrofobina desejada. A codificação da seqüência de nucleotídeo para o polipeptídeo pode ser inserida em um vetor de expressão apropriado que codifica os elementos necessários para a transcrição e a tradução e de uma maneira tal que serão expressos sob condições apropriadas (por exemplo, na orientação apropriada e na estrutura de leitura correta e com seqüências apropriadas de seleção e de expressão). Os métodos requeridos para construir estes vetores de expressão são bem conhecidos pelos técnicos no assunto.

Uma série de sistemas da expressão pode ser utilizada para expressar a seqüência de codificação de polipeptídeo. Estes incluem, mas não estão limitados a, bactérias, fungos (incluindo leveduras), sistemas celulares de insetos, sistemas de cultura de células vegetais, e plantas, todos transformados com os vetores de expressão apropriados. Os hospedeiros preferidos são aqueles que são consideradas de grau alimentício - 'geralmente considerados como seguros' (GRAS).

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

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

As seqüências que codificam as hidrofobinas são, de preferência, pelo menos 80% idênticas ao nível de aminoácido em relação a uma hidrofobina identificada na natureza, de maior preferência, pelo menos 95% ou 100% idênticas. No entanto, os técnicos no assunto podem fazer substituições conservativas ou outras mudanças de aminoácidos que não reduzem a atividade biológica da hidrofobina. Para a finalidade da presente invenção, estas hidrofobinas que possuem este nível elevado de identidade com uma hidrofobina 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 hidrofobia da superfície. Consultar também Collen et al., 2002, *Biochim Biophys Acta* 1569: 139 - 50; Calonje et al., 2002, *Can. J. Microbiol.* 48: 1030 - 4; Askolin et al., 2001, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 124 - 30; e De Vries et al., 1999, *Eur. J. Biochem.* 262: 377 - 85.

AERAÇÃO

O termo "aerado" significa que o gás foi incorporado intencionalmente à mistura para formar a espuma, por exemplo, 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 "aumento de volume". No contexto da presente invenção, a % de aumento de volume é definida em termos do volume do produto aerado e o volume da mistura não aerada da qual ele foi formado:

Aumento de volume (*overrun*) =

$$\frac{\text{Volume do produto aerado final} - \text{Volume da mistura não aerada}}{\text{Volume da mistura não aerada}} \times 100$$

Volume da mistura não aerada

A quantidade de aumento de volume presente no produto irá variar dependendo das características desejadas do produto. De preferência, o nível do aumento de volume é de pelo menos 10%, de maior preferência, pelo menos 25 ou 50%. De preferência, o nível do aumento de volume é inferior a 400%, de maior preferência, inferior a 300 ou 200%.

De preferência, a espuma é substancialmente homogênea.

A etapa de aeração pode ser realizada por qualquer método apropriado. Os métodos de aeração incluem (mas não estão limitados a):

- mistura contínua em um dispositivo rotor-estator, tal como um misturador Oakes (E.T. Oakes Corp), um misturador Megatron (Kinematica AG) ou um misturador Mondomix (Haas-Mondomix BV);

- mistura em batelada em um dispositivo que envolve o transporte em fluido de superfície de gás, tal como um misturador Hobart ou um tanque de agitação;

- injeção do gás, por exemplo, através de um pulverizador, misturador a jato ou dispositivo microfluidico;

- injeção do gás seguida pela mistura e dispersão em um dispositivo de fluxo contínuo, tal como um trocador de calor de superfície raspada, um misturador estático ou uma bomba;

- injeção do gás à temperatura elevada, onde um gás é solubilizado sob pressão e então forma uma fase gasosa dispersa na redução da pressão. Isto poderia ocorrer na distribuição a partir de um recipiente aerossol;

- transporte por fluido de gás (*gás entrainment*), por exemplo, por meio de uma válvula venturi;

- geração de gás por meio de uma reação bioquímica, por exemplo, a reação entre um ácido e um carbonato;

- liberação do gás aprisionado a partir de uma solução ou um sólido, por exemplo, um material vítreo (conforme descrito no documento EP 1.206.193) ou um hidrato de clatrado.

PERÍODO ENTRE A AERAÇÃO E AS ETAPAS DE CONGELAMENTO

A presente invenção possibilita a separação das etapas de aeração e congelamento. Assim, as composições aeradas congeladas podem ser produzidas de diversas maneiras diferentes. Por exemplo, as etapas de aeração e congelamento podem ambas ocorrer dentro de uma fábrica tal que a composição aerada congelada é produzida na fábrica e o consumidor compra a composição aerada congelada em sua forma final. Alternativamente, a etapa de aeração é realizada em uma fábrica, tal que os consumidores comprem uma mistura aerada previamente não congelada, que, então, eles congelam em casa. Uma terceira possibilidade é que o consumidor compra uma mistura não aerada e não congelada que é aerada e congelada em casa.

Particularmente, no segundo destes casos (mas potencialmente nos outros também) há um período significativo de tempo entre as etapas de aeração e congelamento. Em tais casos, onde as composições aeradas são armazenadas antes do congelamento, ou mesmo onde o processo de congelamento toma um tempo longo, é necessário que as espumas sejam estáveis no desproporcionamento e na coalescência, e também na cremeação durante este tempo. As hidrofobinas fornecem à espuma uma boa estabilidade com relação ao desproporcionamento e a coalescência. A cremeação (que é devido à fluatibilidade das bolhas de ar) pode levar à separação da fase vertical resultando em uma grande proporção de bolhas próximas à superfície superior e à depleção das bolhas no fundo. A cremeação também pode levar à perda de ar subsequente devido ao empacotamento próximo das bolhas na espuma e ao colapso das espumas que

pode resultar das mesmas. A cremeação é inibida quando a fase contínua da espuma possui uma tensão de rendimento aparente.

Conseqüentemente, em uma realização, a mistura compreende ainda um agente ou agentes de tensão de rendimento que proporcionam propriedades reológicas apropriadas à fase contínua, inibindo assim a cremeação das bolhas de ar, tal que a espuma permanece homogênea por um período de tempo prolongado. Os agentes de tensão de rendimento são definidos no presente como um ingrediente ou ingredientes (moleculares ou particulados) que fornecem uma tensão de rendimento aparente à fase contínua.

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

- Biopolímeros geleificantes termoreversíveis, tais como iota e kappa carragenas, e agar;

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

- Polissacarídeos bacterianos, tais como xantana ou gelana que podem formar o comportamento fraco do tipo gel que é rompido pelo cisalhamento. De preferência, tais polissacarídeos são adicionados para fornecer uma quantidade final de pelo menos 0,2% em peso, na mistura aerada. Se a mistura aerada for armazenada por um tempo longo antes do congelamento, tal como um dia ou mais, maiores quantidades, de preferência, pelo menos 0,4% em peso são adicionadas;

- Polissacarídeos fúngicos, tais como schizophyllan;

- Géis sinérgicos que compreendem dois ou mais biopolímeros que podem ser individualmente não geleificantes, mas na mistura irão formar

um gel ou um gel de um módulo maior. Os exemplos incluem: alginato de sódio com pectina, xantana com goma de alfarroba, agar com goma de alfarroba e kappa carragena com goma de alfarroba.

Uma série de agentes de tensão de rendimento descritos acima são utilizados convencionalmente para produtos em gel, tal conforme eles são definidos. Os polissacarídeos geleificantes não são os únicos ingredientes que podem ser utilizados como agentes de tensão de rendimento no contexto da presente invenção. Qualquer ingrediente (molecular ou partícula) que resulta em uma tensão de rendimento aparente da fase contínua pode ser utilizado.

Outros exemplos de agentes de tensão de rendimento incluem:

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

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

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

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

De preferência, uma composição aerada retém pelo menos 50% de seu aumento de volume original, de maior preferência, 75%, por um período de pelo menos uma semana, de maior preferência, ainda, pelo menos um mês (tipicamente

medido após o armazenamento em temperaturas frias (cerca de 5° C)).

ETAPA DE CONGELAMENTO QUIESCENTE

Congelamento quiescente (ou estático) refere-se a qualquer processo onde um líquido aquoso (por exemplo, uma solução ou suspensão) é resfriado abaixo de seu ponto de congelamento, tal que a solidificação total ou parcial ocorre através da formação de cristais de gelo, na ausência de um campo de cisalhamento imposto. Assim, o líquido é congelado sem ser deliberadamente agitado, misturado ou sacudido durante o congelamento. A etapa de congelamento quiescente pode ser obtida por uma série de métodos que incluem (mas não estão limitados a):

- colocar um recipiente contendo o líquido a ser congelado em um ambiente frio onde a temperatura está abaixo do ponto de congelamento do líquido (tal como um congelador doméstico, um armazém frio comercial ou um congelador rápido ou um refrigerador de varejo) até ocorrer o grau desejado de solidificação;

- preencher um molde com o líquido a ser congelado e submergir o molde em um banho de meio líquido gelado (tal como salmoura, glicol ou nitrogênio líquido) até ocorrer o grau desejado de solidificação;

- colocar ou gotejar uma porção do nitrogênio líquido a ser congelado diretamente em um banho de fluido criogênico (tal como nitrogênio líquido) por um tempo suficiente para que ele se solidifique antes de removê-lo.

- congelamento do filme, isto é, espalhamento do líquido como uma camada em uma superfície fria, possibilitando que a camada congele na ausência de cisalhamento e, então, raspagem da camada congelada a partir da superfície fria. Os exemplos dos congeladores de filme incluem os congeladores de tambor e os pratos frios giratórios.

- pulverização das gotas do líquido em um ambiente frio dentro de uma câmara fechada, tal que o grau requerido de solidificação ocorreu no momento em que as gotas caíram na base da câmara sob gravidade. Neste caso, embora as gotas estejam se movendo, não há um campo de cisalhamento imposto no líquido na gota.

COMPOSIÇÕES

A quantidade de hidrofobina presente na composição irá variar geralmente dependendo da formulação do produto e do volume da fase de ar. Tipicamente, a composição irá conter pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina, de maior preferência, pelo menos 0,005 ou 0,01% em peso. Tipicamente, o produto irá conter menos de 1% em peso de hidrofobina. A hidrofobina pode ser de uma única fonte ou uma pluralidade de fontes, por exemplo, a hidrofobina pode ser uma mistura de dois ou mais polipeptídeos de hidrofobina diferentes.

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 na composição alimentícia 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 à composição de uma forma tal que é capaz de auto-organização em uma superfície ar – líquido.

Tipicamente, a hidrofobina é adicionada 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 tipicamente extraída de uma fonte de ocorrência natural ou obtida pela expressão recombinante em um organismo hospedeiro.

Em uma realização, a hidrofobina é adicionada à composição 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, é esperado que a quantidade de monômero, dímero e oligômero diminua.

Os produtos alimentícios aerados congelados podem conter
5 opcionalmente outros ingredientes, tais como um ou mais dos seguintes: outras proteínas tais como proteínas lácteas, como ingredientes puros ou como ingredientes líquidos, por exemplo, leite ou creme; óleo ou gordura, notadamente na forma de uma fase emulsificada; açúcares; sais; colorantes e flavorizantes; emulsificantes químicos, tais como monoglicerídeos, purê/
10 extratos/ sucos de frutas ou vegetais; estabilizantes ou espessantes, tais como polissacarídeos; conservantes; inclusões, tais como nozes, frutas, balas de caramelo.

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

EXEMPLOS

Os experimentos foram realizados a fim de comparar a retenção de gás em composições aeradas durante o congelamento quiescente.

EXEMPLO 1

PREPARAÇÃO DA MISTURA

Uma mistura apropriada para a produção de uma composição aerada congelada foi preparada contendo a hidrofobina HFBII (Exemplo 1). Um exemplo comparativo, em que leite desnatado em pó foi utilizado ao invés da hidrofobina, também foi preparado. O exemplo comparativo é
25 representativo de uma mistura que deve mostrar boa estabilidade da espuma, devido ao alto nível de proteína do leite. As composições de mistura são dadas na Tabela 1. As fontes dos ingredientes são dadas na Tabela 2.

TABELA 1
COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS

Ingrediente	Concentração (% em peso)	
	Exemplo 1	Exemplo Comparativo
Sacarose	10	10
Goma xantana	0,5	0,5
Leite desnatado em pó	0	11
HFBII	0,1	0
Água	89,4	78,5

TABELA 2
FONTE DOS INGREDIENTES

Ingrediente	Detalhes	Fornecedor
Sacarose		Tate & Lyle, Reino Unido
Leite desnatado é pó	33 a 36% de proteína, 0,8% de gordura, 3,7% de umidade	United Milk, Reino Unido
Goma xantana (Keltrol RD)	Dispersível a frio	CP Kelco
HFBII	Purificado a partir do <i>T. reesei</i>	VTT Biotechnology, Finlândia

5 A hidrofobina HFBII foi purificada da *Trichoderma reesei* essencialmente conforme descrito no documento WO 00/58342 e Linder et al., 2001, *Biomacromolecules* 2: 511 – 517. A xantana foi incluída de modo a evitar a cremeação da espuma durante o armazenamento.

10 As misturas foram preparadas em bateladas de 100 g. A sacarose, a goma xantana e o leite desnatado em pó (onde utilizado) foram misturados a seco e adicionados lentamente na água agitada à temperatura ambiente. As misturas foram aquecidas a 55° C e agitadas por cerca de 30 minutos para assegurar que a xantana e as proteínas do leite (onde utilizadas) fossem completamente

hidratadas. As misturas foram então resfriadas à temperatura ambiente. O HFBII (onde utilizado) foi adicionado à mistura como uma alíquota de uma solução de 5 mg/ mL para fornecer a concentração final requerida. As soluções foram então lentamente agitadas por um período adicional.

5

ETAPA DE AERAÇÃO

100 mL de cada mistura foi lentamente sonicada em um banho sônico por 30 segundos para dispersar completamente o HFBII (onde utilizado) e colocado em um equipamento de recipiente de agitação que foi resfriado a 5° C.

O 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, que contém um agitador. O agitador consiste em um impulsor retangular (dimensões de 72 mm x 41,5 mm) que raspa a superfície interna do recipiente conforme ele rotaciona e duas lâminas semi-circulares (60 mm de diâmetro) posicionadas em um ângulo de 45° ao impulsor. A mistura foi aerada pela rotação do agitador a 1.200 rpm até um aumento de volume de 100% ter sido atingido (60 segundos, por exemplo, 1 e 120 segundos para o exemplo comparativo).

O aumento de volume das misturas aeradas foi medido imediatamente após a preparação, utilizando a técnica esquematizada abaixo. As misturas aeradas foram então armazenadas em béqueres em um refrigerador a 5° C por 7 dias e o aumento de volume foi medido novamente.

20

ETAPA DE CONGELAMENTO QUIESCENTE

Após a armazenagem por 7 dias, as amostras de cada mistura aerada foram preenchidas em moldes de borracha retangulares e colocadas em um congelador a -25° C por 24 horas. As amostras foram então colocadas em um refrigerador a -80° C por 30 minutos para aumentar sua dureza antes da medida do aumento de volume. Três amostras foram medidas para cada mistura. A quarta amostra foi armazenada a -80° C antes de ser examinada pelo microscópio eletrônico de varredura (SEM) para estudar a microestrutura.

25

MEDIDA DO AUMENTO DE VOLUME

AMOSTRAS AERADAS

O aumento de volume foi determinado conforme segue para as amostras não congeladas aeradas. Em primeiro lugar, um recipiente plástico de volume conhecido (0,7 mL) foi preenchido cuidadosamente com a mistura não aerada e pesada em uma balança de laboratório ($M_{\text{não aerada}}$). Então, o procedimento foi repetido com uma amostra do mesmo volume da mistura aerada (M_{aerada}). O aumento de volume foi determinado a partir da equação:

$$\text{Aumento de volume} = \frac{M_{\text{não aerada}} - M_{\text{aerada}}}{M_{\text{aerada}}} \times 100\%$$

(Isto é equivalente à definição acima de aumento de volume quando as amostras de volume fixo são utilizadas ao invés das amostras de massa fixa).

AMOSTRAS AERADAS CONGELADAS

O aumento de volume foi determinado conforme segue para as amostras aeradas congeladas. A mistura aerada foi pesada em moldes de modo a fornecer amostras de massa conhecida (cerca de 5 g). As amostras foram congeladas conforme descrito acima. Após o congelamento, as amostras foram removidas do moldes e cada uma foi imediatamente colocada em um recipiente plástico pré-resfriado. Uma tampa de rosca contendo dois orifícios pequenos foi colocada no recipiente. O volume do espaço delimitado dentro do recipiente foi previamente determinado como sendo de 61,95 mL. O recipiente foi cuidadosamente preenchido com 60% em peso de solução de sacarose a -10°C por meio de um dos pequenos orifícios utilizando uma seringa graduada. O segundo orifício na tampa permitiu que o ar deslocado escapasse. O volume de solução de sacarose injetado requerido para preencher completamente o recipiente foi determinado a partir das graduações da seringa. O volume da amostra de

espuma congelada (V_{aerado}) foi dado pela diferença entre o volume conhecido do recipiente e o volume medido da solução de injeção. O teste foi completado em um minuto de modo a evitar o derretimento da espuma congelada. O procedimento foi repetido com as amostras de mistura não aeradas congeladas possuindo a mesma massa ($V_{\text{não aerado}}$). O aumento de volume foi determinado a partir da equação (isto é, para as amostras de massa fixa):

$$\text{Aumento de volume} = \frac{V_{\text{aerado}} - V_{\text{não aerado}}}{V_{\text{não aerado}}} \times 100\%$$

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microestrutura dos produtos foi visualizada ao utilizar 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 5 mm x 5 mm x 10 mm de tamanho, 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 não reativos). 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, em cerca de 10^{-4} bar. 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 miliampères 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 -160°C . A amostra foi examinada e as áreas de interesse foram capturadas através de um software de aquisição de imagem digital.

RESULTADOS

Os aumentos de volume após a aeração, após o armazenamento e após o congelamento são mostradas na Tabela 3. No Exemplo Comparativo contendo um alto nível de leite desnatado em pó, há uma redução significativa do aumento de volume durante o armazenamento e como um resultado do congelamento. Entretanto, o Exemplo 1 contendo a hidrofobina não mostrou nenhuma perda de aumento de volume durante o armazenamento e uma redução muito menor durante o congelamento. (De fato, pelo menos parte desta diminuição pode ser por causa da mudança no volume do gás devido à redução na temperatura e não resulta da perda de gás pela amostra). Os resultados mostram que a utilização de hidrofobina no lugar das proteínas do leite melhora consideravelmente a retenção de ar durante o armazenamento e o congelamento da solução com espumas.

TABELA 3

AUMENTOS DE VOLUME (%)

	Exemplo 1	Exemplo Comparativo
Imediatamente após a aeração	119	130
Após o armazenamento por 7 dias a 5° C	119	109
Após o armazenamento por 24 horas a -25° C	102	67,2

As imagens SEM das amostras congeladas mostraram que o Exemplo 1 possuía uma distribuição uniforme das bolhas de ar. O Exemplo Comparativo sem a hidrofobina, aparentou possuir bolhas de gás distribuídas de maneira não uniforme, e em acordo com as medidas de aumento de volume, aparentava estar presente menos ar. Além disso, os cristais de gelo no Exemplo Comparativo pareceram mais alongados e, de alguma forma, maiores do que aqueles do Exemplo 1.

EXEMPLOS 2 E 3

Duas misturas adicionais foram preparadas de acordo com a mesma formulação e utilizando o mesmo procedimento que no Exemplo 1. As misturas foram então aeradas utilizando um misturador manual elétrico Breville com a “lâmina misturadora” por cerca de 1 minuto. O aumento de volume das misturas aeradas foi medido. As misturas aeradas foram então armazenadas a 5° C por 4 dias e o aumento de volume foi medido novamente. Então, as misturas aeradas foram congeladas de modo quiescente para produzir o produto aerado congelado final por dois métodos diferentes, conforme segue:

EXEMPLO 2

A mistura aerada foi colocada em um molde e então congelada em um banho de salmoura ajustada a -25° C por 15 minutos. Os palitos foram inseridos no produto após cerca de 30 segundos a 1 minuto do tempo de congelamento. Os produtos aerados congelados foram liberados dos moldes por imersão breve dos moldes em um banho de água morna. Os produtos foram então colocados em embalagens de papel encerado.

EXEMPLO 3

A mistura aerada foi colocada em um recipiente e então congelada em um congelador doméstico ajustado a -18° C por cerca de 6 horas.

Em cada caso, os produtos aerados congelados foram então resfriados por 2 horas em um congelador rápido a -35° C, após o qual seu aumento de volume foi medido.

Os aumentos de volume após o armazenamento e após o congelamento são mostradas na Tabela 4. Apenas pequenas quantidades de aumento de volume foram perdidas durante o congelamento quiescente, isto é, 5 e 7% ($\pm 1\%$) para os Exemplos 2 e 3 respectivamente. Os dados mostram novamente que a hidrofobina é eficaz na estabilização da espuma durante o congelamento.

TABELA 4
AUMENTOS DE VOLUME (%)

	Exemplo 2	Exemplo 3
Após o armazenamento por 7 dias a 5° C	104	107
Após o armazenamento por 24 horas a -25° C	99	100

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. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO AERADA CONGELADA, caracterizado pelo fato de que o processo compreende a aeração de uma mistura aquosa, seguido pelo congelamento quiescente da
5 mistura aerada, em que a mistura compreende a hidrofobina.
2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a mistura compreende pelo menos 0,001% em peso de hidrofobina.
3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a hidrofobina está na forma isolada.
- 10 4. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a hidrofobina é uma hidrofobina de classe II.
5. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a composição aerada congelada possui um aumento de volume de pelo menos 25%.
- 15 6. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a composição é um produto alimentício.
7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o produto alimentício é um produto de confeito congelado.
8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7,
20 caracterizado pelo fato de que o produto de confeito congelado é um sorvete.
9. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a etapa de aeração é selecionada a partir do grupo que consiste em mistura contínua, mistura em batelada, injeção de gás, gás em transporte por uma corrente fluida, geração de gás por meio de uma reação química
25 ou bioquímica e liberação do gás aprisionado a partir de uma solução ou um sólido.
10. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a etapa de congelamento é selecionada a partir do grupo que consiste em colocar um recipiente contendo a mistura aquosa em um

ambiente frio; submergir um molde contendo a mistura em um banho de refrigerante frio; colocar as porções da mistura diretamente em um banho de fluido criogênico; congelar o filme; e aspergir as gotas da mistura em um ambiente frio.

11. PROCESSO, de acordo com uma das reivindicações de 1
5 a 10, caracterizado pelo fato de que a mistura compreende ainda um agente de tensão do rendimento.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o agente de tensão do rendimento é xantana e/ou a gelana.

13. USO DE UMA HIDROFOBINA, caracterizado pelo fato de
10 ser para a estabilização de uma composição aerada durante o congelamento quiescente.

RESUMO**“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO AERADA
CONGELADA E USO DE UMA HIDROFOBINA”**

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de
5 uma composição aerada congelada, sendo que o processo compreende a
aeração de uma mistura aquosa, seguida pelo congelamento quiescente da
mistura aerada, caracterizado em que a mistura compreende a hidrofobina.