



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Eulália Lopes da Silva Barros

**Propriedades químicas, físicas, reológicas e microestruturais de gelados comestíveis  
obtidos do crioconcentrado de soro lácteo e sua viabilidade como matriz protetora de  
*Bifidobacterium* BB-12**

Florianópolis  
2020

Eulália Lopes da Silva Barros

**Propriedades químicas, físicas, reológicas e microestruturais de gelados comestíveis obtidos do crioconcentrado de soro lácteo e sua viabilidade como matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof. Elane Schwinden Prudêncio, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros, Eulália Lopes da Silva  
Propriedades químicas, físicas, reológicas e  
microestruturais de gelados comestíveis obtidos do  
crioconcentrado de soro lácteo e sua viabilidade como  
matriz protetora de Bifidobacterium BB-12 / Eulália Lopes  
da Silva Barros ; orientador, Elane Schwinden Prudêncio,  
2020.  
99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Soro crioconcentrado.  
Propriedades físicas. Gelado comestível probiótico. Simulação  
gastrointestinal.. I. Prudêncio, Elane Schwinden . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

Eulália Lopes da Silva Barros

**Propriedades químicas, físicas, reológicas e microestruturais de gelados comestíveis obtidos do crioconcentrado de soro lácteo e sua viabilidade como matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Elane Schwinden Prudêncio, Dr.(a)  
Presidente (PGEAL/UFSC)

Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani, Dr.(a)  
Membro externo (SIPOA- MAPA)

Prof.(a) José Carlos Cunha Petrus, Dr.(a)  
Membro interno (PGEAL/UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

---

Prof. Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Elane Schwinden Prudêncio, Dr.  
Orientadora

FLORIANÓPOLIS, 2020.

Dedico este trabalho a Deus e a pessoa que mais amo, minha mãe Maria, em forma de retribuição por todos os anos de sua vida dedicados a mim, pelo Amor, Carinho e Atenção, tornando possível a realização de um sonho. As minhas avós Ana e Dometilde, e a toda minha família que me apoiaram e torceram por essa conquista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me foram concedidas ao longo dessa jornada, por ter sido tão grandioso em minha vida, me iluminando, capacitando e guiando todos meus passos, ao longo de todo o caminho para a conquista dos meus objetivos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós graduação em Engenharia de alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado, e aos professores do programa pelo bom exemplo e conhecimentos dados.

Aos meus pais Eudes e Maria e meu irmão Euller todo meu agradecimento, pelo incentivo, pelo amor, compreensão e presença em todos os momentos de minha vida. Em especial a minha mãe Maria, pessoa mais especial na minha vida, não existem palavras para descrever o quão agradecida fico, por todo amor, carinho, e dedicação ao longo de toda a trajetória, mesmo nos momentos mais difíceis, sempre estive ao meu lado, não medindo esforços para que alcançasse um dos meus grandes sonhos.

À toda a minha família, que mesmo de longe, me deram forças para que nunca desistisse dos meus sonhos, sempre se preocupando comigo.

Ao meu namorado Rodrigo pelo companheirismo, o amor, dedicação e apoio nas horas difíceis.

Aos meus amigos do Laboratório de Leite e Derivados pelo auxílio, companheirismo, carinho, amizade e bons momentos que tivemos. Em especial Callebe, Silvani, Amanda, Bruna, Maryella e à Maria Helena por toda ajuda, contribuição e incentivo durante todas as etapas da realização deste trabalho.

Ao meu amigo Callebe, meu especial agradecimento, por ter se tornado meu irmão e parceiro de nestes anos de mestrado, pelo companheirismo, carinho, força e por todos momentos juntos, até nos mais difíceis.

Agradeço muito aos meus amigos Renata, Clóvis, Camila, Fernando, Romuald, Maria Angélica, Zélia, Fabiola, Amanda por todo esforço, carinho, dedicação e paciência comigo durante o mestrado, por todos os momentos juntos, mesmo nos momentos mais difíceis, sempre ficaram ao meu lado.

A Profa. Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio, pela orientação, carinho, incentivo, paciência e compartilhamento de seus preciosos conhecimentos que me foram concedidos durante todo o processo de construção do trabalho. A você, Prof. Elane, minha gratidão.

Ao Prof. Celso Balthazar pelo auxílio com a análise de microscopia.

A todos do Laboratório de Propriedades físicas de alimentos pelo uso de alguns equipamentos.

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas considerações.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro.

Enfim, dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente auxiliaram-me a concluir esta etapa. Para vocês, todo o meu afeto.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)



## RESUMO

O soro lácteo apresenta importante aspecto nutricional, ambiental e econômico para as indústrias de laticínios. O aumento de sua utilização é também associado à incorporação de novas tecnologias envolvendo o seu processamento. Dentre elas tem-se a crioc Concentração em blocos que apresenta como vantagem manter a qualidade nutricional dos alimentos através da recuperação de um soluto por meio da separação de cristais de gelo. Esta técnica possui aplicações bastante promissoras em relação ao valor nutritivo de seu concentrado quando comparada a outros processos tradicionais de concentração, os quais utilizam temperaturas maiores do que a de congelamento. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a técnica de crioc Concentração em blocos do soro lácteo, visando a escolha do melhor concentrado para substituir diferentes proporções de leite (0, 25, 50, 75 e 100%) na elaboração de gelados comestíveis, sendo estes avaliados quanto as suas propriedades físicas, químicas, reológicas e microestruturais. Além disso, um gelado comestível de soro lácteo concentrado e outro à base de leite foram elaborados, ambos adicionados de microrganismo probiótico (*Bifidobacterium* BB-12), a fim de comparar o efeito protetor da *Bifidobacterium* BB-12 quando exposta as condições gastrointestinais *in vitro*. Na primeira parte deste estudo, foi possível obter um soro lácteo concentrado com três vezes mais sólidos totais, este proveniente do segundo estágio da crioc Concentração, o qual foi escolhido para a elaboração dos gelados comestíveis devido ao maior ( $P < 0,05$ ) fator de concentração. Os resultados mostraram aumento nos sólidos totais e na acidez bem como a diminuição do pH. Os valores de overrun variaram de 27 a 44%, sendo considerado aceitável. No teste de derretimento, os gelados comestíveis com soro concentrado mantiveram sua forma original por mais tempo. O soro concentrado utilizado não interferiu nos parâmetros: tamanho dos cristais de gelo, glóbulos de gordura e diâmetro das bolhas de ar. Os gelados comestíveis com leite apresentaram maior luminosidade e exibiram uma coloração amarelo esverdeada. Os modelos da Lei da Potência e Casson descreveram bem o fluxo dos gelados comestíveis, que se comportaram de forma similar a fluidos newtonianos. A adição do soro lácteo concentrado contribuiu no aumento da viscosidade, bem como no índice de consistência e na área de histerese. O alto teor dos sólidos totais conferiu uma textura suave e cremosa ao produto. Os resultados destacam a aplicação do soro lácteo concentrado em um nível de 50% de substituição do leite. Após as condições gastrointestinais simuladas, foi possível verificar que ambos os gelados comestíveis mostraram contagens de células viáveis de bifidobactérias acima da quantidade recomendada para ser considerado como um produto probiótico ( $> 8 \log \text{ UFC/g}$ ). Observou-se que o gelado com soro lácteo concentrado ofereceu um melhor efeito protetor para as bactérias probióticas, destacando-se pela recuperação das bactérias probióticas lesionadas nas etapas mais adversas do trato gastrointestinal (esôfago-estômago e duodeno), uma vez que demonstrou taxas de sobrevivência maiores que 90%, permitindo assim uma maior concentração de microrganismos probióticos no colón.

**Palavras-chave:** Soro concentrado. Crioc Concentração. Propriedades físicas. Gelado comestível probiótico. Simulação gastrointestinal.

## ABSTRACT

Whey has an important nutritional, environmental and economic aspect for dairy industries. Its increasing use is also associated with the incorporation of new technologies involving its processing. Among them, there is the block freeze concentration, which has the advantage of maintaining the nutritional quality of the food by the recovery of a solute through the separation of ice crystals. This technique has very promising applications concerning the nutritional value of its concentrate when compared to other traditional concentration processes, which use higher temperatures than that of freezing. Thus, the objective of this work was to evaluate the use of block freeze concentration technique in whey, choosing the best concentrate to substitute different proportions of milk (0, 25, 50, 75 and 100%) in the production of ice cream, which was evaluated regarding its physical, chemical, rheological and microstructural properties. Two ice creams, one made from concentrated whey and a milk-based one were elaborated and both were added with a probiotic microorganism (*Bifidobacterium* BB-12), aiming to compare the protective effect of *Bifidobacterium* BB-12 when exposed to *in vitro* gastrointestinal conditions. In the first part of this study, it was possible to obtain a concentrated whey with three times more total solids, provenient from the second stage of freeze concentration, which was chosen for the ice creams preparation due to the higher ( $P < 0.05$ ) concentration factor. The results showed an increase in total solids and acidity as well as a decrease in pH. The overrun values ranged from 27 to 44%, which were considered acceptable. In the melting test, ice cream with concentrated whey maintained its original shape for a longer time. The concentrated whey used did not interfere in the parameters: ice crystals size, fat globules and air bubbles diameter. The milk-based ice creams showed greater luminosity and exhibited a greenish yellow color. The Power Law and Casson models well described the flow of ice cream, which behaved similarly to Newtonian fluids. The addition of concentrated whey contributed to the increase in viscosity, as well to the consistency index and hysteresis area. The high content of total solids gave the product a smooth and creamy texture. The results highlight the application of concentrated whey at a 50% level of milk substitution. After the simulated gastrointestinal conditions, it was possible to verify that both ice creams showed viable cell counts of bifidobacteria above the recommended amount to be considered as a probiotic product ( $> 8 \log \text{CFU/g}$ ). It was observed that the ice cream with concentrated whey offered a better protective effect for the probiotic bacteria, enhancing the recovery of the injured probiotic bacteria in the most adverse stages of the gastrointestinal tract (esophagus-stomach and duodenum), since it was demonstrated survival rates greater than 90%, allowing a greater concentration of probiotic microorganisms in the colon.

**Keywords:** Concentrated whey. Freeze concentration. Physical properties. Probiotic ice cream. Gastrointestinal simulation.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1- Variação da composição do soro lácteo doce e ácido.....	20
Figura 1.2- Fluxograma de processamento dos gelados comestíveis.....	24
Figura 1.3- Segurança e funcionalidade da seleção de microrganismos probióticos. ....	27
Figura 1.4- Esquema do processo de crioconcentração em blocos. ....	31
Figura 1.5- Escala tridimensional de medida instrumental da cor do sistema CIELAB. ....	32
Figura 1.6- Curva de fluxo de fluidos com comportamento reológico independente do tempo. .....	36

### CAPÍTULO 2

Figure 2.1- Block freeze concentration process of cheese whey.....	51
Figure 2.2- Experimental (□) and theoretical (-◆-) results of ice mass as a function of freeze concentration stages.....	58
Figure 2.3- Melting behavior of ice cream produced with pasteurized whole milk (Ice cream 1) (▲); freeze concentrated whey – Ice cream 2 (○); 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk - Ice cream 3 (▲); 50% of freeze concentrat whey and 50% of pasteurized whole milk - Ice cream 4 (◇) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk - Ice cream 5 (□). ....	62
Figure 2.4- Structure of ice creams containing: pasteurized whole milk (Ice cream 1), freeze concentrated whey (Ice cream 2), 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk (Ice cream 3), 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk (Ice cream 4) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk (Ice cream 5) observed by direct microscopy method (50 ×). Air bubble (→), ice crystal (→) and fat globules (→).....	63
Figure 2.5- Effect of shear rate on viscosity of ice creams samples. Ice cream 1 (●) ice cream produced with pasteurized whole milk, freeze concentrated whey - Ice cream 2 (✱), 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk - Ice cream 3 (▲), 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk - Ice cream 4 (◆) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk - Ice cream 5 (■). ....	66
Figure 2.6- Flow curves, shear stress versus shear rate, for ice cream produced with pasteurized whole milk - Ice cream 1 (■), freeze concentrated whey - Ice cream 2 (◆) 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk - Ice cream 3 (○), 50% of freeze	

concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk - Ice cream 4 ( $\Delta$ ) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk - Ice cream 5 ( $\ast$ )..... 69

### **CAPÍTULO 3**

Figure 3.1- Protocol used during gastrointestinal *in vitro* digestion phases..... 84

Figure 3.2- *Bifidobacterium* BB-12 viable cells count data mean from a) control sample (MRS broth); b) ice cream 1 sample, prepared with whole milk; and c) ice cream 2 sample, using concentrated whey, after exposure to each one gastrointestinal *in vitro* digestion phase. The bars represent the standard deviation ( $\square$ )..... 87

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 1

Quadro 1.1 - Funções e características dos principais componentes utilizados na produção dos gelados comestíveis-----	23
---	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Table 2.1- Ice cream composition .....	53
Table 2.2- Total whey solids, concentrated whey (CW) and ice fractions (I) of each freeze concentrated stage and the concentration factor (CF) and process efficiency (PE) in relation to the total solids content. ....	57
Table 2.3- Physical and chemical parameters of the ice creams. ....	60
Table 2.4- Firmness and adhesiveness analysis of the ice creams. ....	65
Table 2.5- Rheological parameters of the ice creams using the Power Law, Casson model and thixotropic index.....	67

### CAPÍTULO 3

Table 3.1- <i>Bifidobacterium</i> BB-12 survival rate (%) results expressed as mean $\pm$ standard deviation, after exposure to each gastrointestinal <i>in vitro</i> phase from control (MRS broth), ice cream 1 (with whole milk), and ice cream 2 (with concentrated whey) samples.....	90
--	----

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>18</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
1.1 O SORO LÁCTEO .....	19
1.2 GELADOS COMESTÍVEIS .....	21
1.3 PROBIÓTICOS .....	25
1.4 CRIOCONCENTRAÇÃO .....	29
1.5 PROPRIEDADES FÍSICAS .....	31
<b>1.5.1 Análise de cor .....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.2 Análise instrumental do perfil de textura (TPA).....</b>	<b>32</b>
<b>1.5.3 Overrun e Derretimento .....</b>	<b>33</b>
<b>1.5.4 Microscopia .....</b>	<b>34</b>
<b>1.5.5 Reologia .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>46</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>48</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>49</b>
<b>2 MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>50</b>
2.1 MATERIAL .....	50
2.2 MANUFACTURE OF CHEESE WHEY.....	50
2.3 PROTOCOL OF CHEESE WHEY FREEZE CONCENTRATION PROCESS.....	50
2.4 TOTAL SOLIDS CONTENT .....	51
2.5 CONCENTRATION FACTOR .....	51
2.6 PROCESS EFFICIENCY .....	52
2.7 VALIDATION OF EXPERIMENTAL RESULTS .....	52
2.8 ELABORATION OF ICE CREAMS.....	53
2.9 ICE CREAM ANALYSIS.....	54

2.9.1 Physicochemical analysis .....	54
2.9.2 Overrun .....	54
2.9.3 Melting behavior.....	54
2.9.4 Color analysis.....	54
2.9.5 Distribution of ice crystals, air bubbles size and fat particle .....	55
2.9.6 Texture parameters .....	55
2.9.7 Rheological measures .....	55
2.10 STATISTICAL ANALYSIS .....	56
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>56</b>
3.1 BLOCK FREEZE CONCENTRATION PROCESS.....	56
3.2 ICE CREAM ANALYSIS.....	58
<b>4 CONCLUSION .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 3 – .....</b>	<b>76</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>78</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>79</b>
<b>2 MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>81</b>
2.1 MATERIAL .....	81
2.2 PREPARATION OF BIFIDOBACTERIA SUSPENSION .....	82
2.3. ICE CREAM PREPARATION .....	82
2.4. IN VITRO GASTROINTESTINAL EXPERIMENT .....	83
2.5. <i>BIFIDOBACTERIUM</i> BB-12 VIABLE CELLS COUNT .....	85
<b>2.5.1 Survival rate.....</b>	<b>85</b>
2.6. DATA ANALYSIS .....	85
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO A – Trabalho apresentado no XV ERSCTA- Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos-2019. ....</b>	<b>97</b>



**ANEXO B - Artigo “Concentrated whey from block freeze concentration or milk-based ice creams on Bifidobacterium BB-12 survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions” submetido à “LWT - Food Science and Technology” ..... 99**

## INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os gelados comestíveis são classificados como produtos alimentícios obtido a partir de uma emulsão de gordura e proteínas, com uma mistura pasteurizada e homogeneizada de leite com a adição de outros ingredientes, como o soro lácteo, água, açúcares e outros ingredientes que tenham sido submetidos ao congelamento, em condições que garantam a conservação do produto. O gelado comestível é uma fonte rica em macroelementos e é caracterizado por sua alta digestibilidade. Possui textura macia e sabor doce, este produto é aceito por todas as faixas etárias dos consumidores (CRUZ *et al.*, 2009). Nos últimos anos, houve um aumento considerável de sua produção e consumo, atrelado a isto, alternativas para incrementar e melhorar a oferta desse produto estão sendo estudadas. Na fabricação do gelado comestível, destaca a incorporação de sólidos do soro lácteo como substituto do leite, possibilitando uma melhoria em suas propriedades funcionais e nutricionais, auxiliando na viscosidade, emulsificação e estabilidade, além de reduzir o custo do produto (DANESH; GOUDARZI; JOOYANDEH, 2017; SILVA; BOLINE, 2006).

No processo de fabricação do queijo as enzimas específicas modificam a proteína do leite, que separam as frações de caseína e proteína do soro. Essa separação, ocorre mediante a precipitação ácida ou a coagulação, ou seja, separação do leite em coágulos (gorduras, proteínas, sólidos do leite) e soro (REMÓN; GARCÍA; ARAUZO, 2016). O soro resultante é considerado um produto secundário rico em água, proteínas, lactose e minerais, possui um potencial considerável de utilização em outros processos, já que tem alta funcionalidade e importante valor nutricional. O soro lácteo se descartado, precisa passar por um processo de tratamento de efluentes pelas indústrias do setor lácteo (GIRALDO *et al.*, 2017). Para reduzir o custo desse processo, muitas dessas empresas optam por transformar o que seria um problema numa solução viável e rentável, objetivando gerar impactos econômicos e ambientais positivos. Desta forma, é necessário o gerenciamento adequado deste produto secundário, principalmente através do estudo de suas propriedades tecnológicas, a fim de torna-lo adequado nas aplicações específicas (MASOTTI *et al.*, 2017). A concentração do soro lácteo foi investigada por (CHABAROV; AIDER, 2014; AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2011; CANELLA *et al.*, 2018), como uma alternativa tecnológica para o uso desse produto secundário da indústria de laticínios. Dentre os métodos tradicionalmente utilizados para concentrar o soro lácteo, a crioconcentração em blocos é o método mais promissor. A

combinação do soro lácteo crioconcentrado e o gelado comestível pode ser um veículo promissor para a proteção dos microrganismos probióticos.

Ingredientes funcionais podem ser adicionados aos alimentos, com a finalidade de melhorar sua qualidade, proporcionar benefícios à saúde ou garantir as características desejadas da estrutura do produto (ZUIDAM; VELIKOV, 2018). Probióticos são microrganismos vivos que trazem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (HILL *et al.*, 2014) e, logo, pertencem a uma área de grande interesse científico. Ao longo de vários estudos, tem-se verificado que as matrizes lácteas são os alimentos com maior potencialidade para aplicação de microrganismos probióticos. Embora, o leite fermentado seja o alimento com maior aplicação industrial de bactéria probiótica, os gelados comestíveis se apresentam como veículo de sucesso para adição dessas bactérias ao ser humano. Seu pH é básico e maior do que o do leite fermentado, além disso, possui alta concentração de substâncias sólidas o que torna o gelado comestível um alimento apropriado para o desenvolvimento e a sobrevivência de bactérias probióticas (DE FARIAS *et al.*, 2019). A adição de novos ingredientes ao gelado comestível o torna um alimento ainda mais atrativo e com potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional.

Apesar dos relatos de aplicação dos probióticos em gelados comestíveis apresentarem resultados promissores para a sobrevivência do probiótico durante o processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (Pankiewicz, *et al.*, 2019; Kalicka *et al.*, 2019; de Farias *et al.*, 2019), não há estudos avaliando o gelado comestível elaborado de soro lácteo concentrado pela crioconcentração, como uma matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12. Além disso, o uso do soro lácteo combinado com o processo de crioconcentração em blocos como ingrediente de substituição do leite na fabricação do gelado comestível, sua caracterização física, química, assim como, suas propriedades reológicas e microestruturais não foram relatadas na literatura, sendo esta uma abordagem inovadora.

Esta dissertação é apresentada em capítulos, sendo o primeiro referente à revisão bibliográfica e os demais referentes aos resultados experimentais obtidos, os quais estão expostos na forma de artigos científicos.

No Capítulo 1, de revisão bibliográfica, são abordados os principais temas envolvidos no trabalho. Soro lácteo; gelado comestível; probiótico; crioconcentração e propriedades físicas (análise de cor; análise instrumental do perfil de textura (TPA); overrun e derretimento; microscopia e análise reológica).

O Capítulo 2 apresenta o estudo da crioconcentração em blocos de soro lácteo assim como a escolha do melhor concentrado do soro para a elaboração de gelados comestíveis com diferentes níveis deste concentrado. Estes gelados comestíveis foram avaliados quanto as suas propriedades químicas, físicas, reológicas e microestruturais.

O Capítulo 3 apresenta o emprego do gelado comestível obtido do crioconcentrado de soro lácteo, assim como o gelado a base de leite, ambos como matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12 exposta a condições gastrointestinais *in vitro*. Através dos resultados obtidos com a simulação *in vitro* foi possível avaliar a influência das matrizes dos gelados comestíveis produzidos na sobrevivência das bifidobactérias.

**CAPÍTULO 1**

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 O SORO LÁCTEO

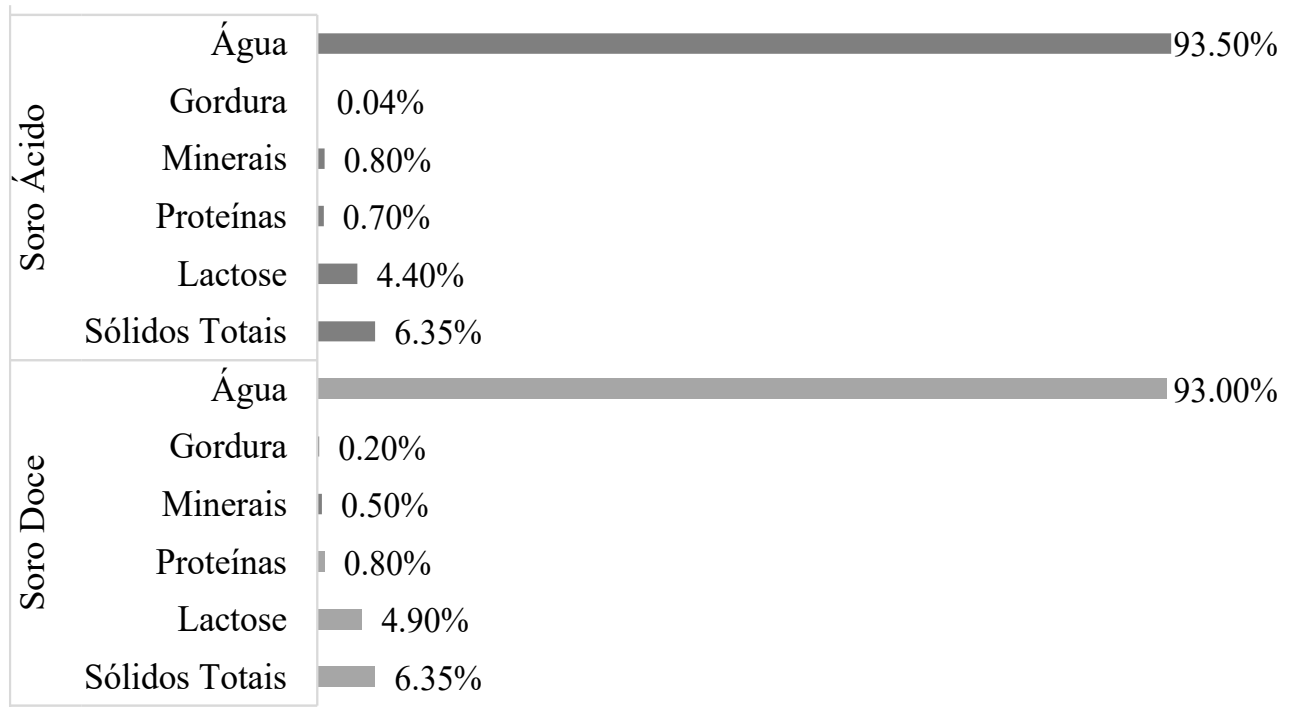
O soro lácteo, também conhecido como soro de leite, soro de queijo ou lactossoro é um líquido amarelado produzido durante o processo de fabricação do queijo ou durante a coagulação do processo de caseína do leite como subproduto (REMÓN; GARCÍA; ARAUZO, 2016). Em média, 10L de leite se produz apenas 1 kg de queijo, 9L se resulta em soro lácteo, o que corresponde a uma produção mundial de 5 milhões de toneladas por ano. Cerca de 50% dos sólidos do leite estão presentes no soro lácteo (FOX *et al.*, 2017), incluindo as proteínas, sendo 20% da proteína total, a maior parte de lactose, minerais e vitaminas (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011), realçando a importância do soro lácteo como um recurso útil de nutrientes.

O tipo e a composição do soro dependem das técnicas utilizadas para a separação das caseínas do leite. Dois tipos de soro fluido podem ser obtidos na fabricação de queijo: o soro doce e o soro ácido, que são obtidos de acordo com o tipo de queijo produzido. As diferentes composições estão ilustradas na Figura 1.1. Suas composições variam de acordo com a qualidade do leite (GHALY; KAMAL, 2004), o tratamento térmico, o manuseio, e o tipo de leite utilizado na fabricação do queijo (cabra, vaca, búfala entre outros) (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). Dos tipos de queijos produzidos, o predomínio é dos que derivam o soro doce, provenientes da manufatura de queijos duros, semi-duros ou macios (Cheddar, Suíço, Provolone, Muçarela, etc.). São denominados doce, o soro obtido pela coagulação da caseína por coalho (um complexo enzimático industrial de coagulação da caseína contendo quimosina ou outras enzimas coagulantes de caseína), eles desestabilizam as micelas de caseína durante o tratamento enzimático, obtendo assim soro com pH ligeiramente menor do que o do leite fresco, variando entre 5,9 a 6,6 (ZADOW, 1992). Já o soro ácido (pH inferior a 5) é gerado quando a coagulação da caseína é obtida através da adição de ácidos minerais ou orgânicos, com consequência da desestabilização das micelas de caseína (YADAV *et al.*, 2015).

O soro lácteo possui uma fração proteica correspondente de aproximadamente 50% de  $\beta$ -lactoglobulina, 25% de  $\alpha$ -lactoalbumina e 25 % de outras frações proteicas como as imunoglobulinas. O soro é rico em vitaminas hidrossolúveis, como tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, vitamina B6 e B12 e sais minerais, como cálcio, magnésio, zinco, potássio e fósforo (VENTURINI FILHO, 2010). Além disso, é reconhecido pelas suas propriedades funcionais, nutricionais e pelo alto valor biológico de suas proteínas (SINHA *et al.*, 2007). Os

aminoácidos essenciais respondem cerca de 60 % do teor proteico total do soro, representados pela leucina e lisina, além de constituir uma boa fonte de aminoácidos sulfurados como cisteína e metionina (BURRINGTON, 2000).

Figura 1.1- Variação da composição do soro lácteo doce e ácido.



Fonte: Adaptado de Leindecker, (2011).

A composição proteica de ambos os soros é semelhante, no que se refere à maioria das proteínas. Vale destacar que a maior parte dos produtos à base de soro é derivada de soro doce, ele possui uma ampla aplicação para a indústria de alimentos em relação ao soro ácido fato este atribuído ao sabor característico do mesmo (KILARA; VAGHELA, 2018; MADUREIRA *et al.*, 2007; SMITHERS, 2008).

O soro lácteo representa cerca de 70 a 90% do volume original de leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), sua produção está aumentando globalmente, sendo estimada em cerca de 180 a 190 milhões de toneladas / ano (MOLLEA *et al.*, 2013). Este crescimento e o alto conteúdo orgânico do soro lácteo criam importantes questões ambientais e de saúde. O soro é considerado um poluente ambiental devido às suas altas concentrações da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e da demanda química de oxigênio (DQO). O alto conteúdo orgânico do soro lácteo surge da presença de nutrientes residuais no leite (lactose, proteínas, lipídios e vitaminas). À medida que aumenta a demanda por produtos derivados do leite, aumenta a produção de soro lácteo, o que representa um sério problema de gerenciamento

(YADAV *et al.*, 2015). É difícil degradar os componentes presentes no soro lácteo e isso criar um grande problema para qualquer estação de tratamento de águas residuais que trate outros efluentes. Deste modo, o gerenciamento adequado se faz necessário (tratamento ou reutilização), que seria mais econômico e ecológico. Por outro lado, a presença de nutrientes do soro lácteo (orgânicos e inorgânicos) é considerada um grande potencial para a produção de vários produtos de alto valor agregado. No entanto, apenas uma pequena porção é utilizada, sendo para ração animal ou na produção de alimentos, e uma quantidade significativa permanece não utilizada. Assim, o soro lácteo deve ser processado e reaproveitado a fim de obter seus benefícios máximos e limitar seu impacto na poluição ambiental (CARVALHO *et al.*, 2013; PRAZERES *et al.*, 2012; PANESAR *et al.*, 2007).

A utilização do soro lácteo pela indústria de alimentos, é uma solução interessante, que leva em conta seu alto custo de descarte e sua excelente composição nutricional (MIZUBUTI, 1994). O soro tem se mostrado bem versátil e adaptável, justificando o aumento de sua utilização em muitos produtos processados (VENTURINI FILHO, 2010). O soro lácteo como ingrediente pode substituir com eficiência os sólidos do leite e dar origem a novas formulações de diversos alimentos (ZAVAREZE; MORAES; SALASMELLADO, 2010). Os gelados comestíveis são produtos que pode ser reaproveitado o soro lácteo, ele pode atuar como emulsificante e estabilizante, prevenindo a aglomeração dos glóbulos de gordura e permitindo a estabilidade durante o congelamento (EVANS, 1982).

## 1.2 GELADOS COMESTÍVEIS

Os gelados comestíveis são definidos como complexos sistemas coloidais que consistem em células de ar, cristais de gelo e glóbulos de gordura parcialmente desestabilizados e dispersos em uma fase aquosa contínua com polissacarídeos, lactose, açúcares e sais minerais dissolvidos (GOFF, 1997). São alimentos aerados e congelados elaborados a partir de uma mistura de produtos lácteos pasteurizados (soro lácteo, creme de leite, manteiga, leite e entre outros) com outros ingredientes não lácteos (carboidratos, estabilizantes, emulsificantes, essências e corantes) de forma a obter-se um percentual desejado de gordura láctea e sólidos não gordurosos do leite (SNGL) (ANDREASSEN; NIELSEN, 1992). O termo "mistura" é empregado para definir o conjunto de todos os ingredientes do gelado comestível com exceção do ar. Os Gelados comestíveis são produtos populares em todo o mundo, conquistam os



consumidores pela sensação refrescante, seu sabor doce e aroma agradável (KILARA; CHANDAN, 2009).

De acordo com a RDC 266 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária gelado comestível é definido como “ um produto alimentício obtido a partir de uma emulsão de gordura e proteínas, com ou sem a adição de outros ingredientes e substâncias, ou uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas a congelamento, em condições que garantam a conservação do produto em estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumidor” (BRASIL, 2005).

A composição do gelado comestível é bastante variada e sua estrutura complexa, podendo produzir diversos tipos de gelados comestíveis a partir de várias combinações de ingredientes em diferentes proporções. Tradicionalmente, o principal ingrediente do gelado comestível é o leite em todas as formas, representando cerca de 60% da mistura. Os açúcares (12 a 17%), as gorduras (10 a 17%), os estabilizantes e emulsificantes (0,2 a 0,5%), sólidos totais entre (32 a 45%) entre outros ingredientes, seguem como ordem de importância para a formação da estrutura dos gelados comestíveis (ORDÓÑEZ, 2005). Em relação as características físico químicas devem seguir os parâmetros apresentados pela legislação, condições de conservação: temperatura máxima de conservação no produto -18°C, temperatura no produto de -12°C (BRASIL, 2005).

No Quadro 1.1 estão apresentadas as principais funções e características de alguns ingredientes utilizado na elaboração de gelados comestíveis.

Segundo Oliveira *et al.* (2008) e Fiol *et al.* (2017) a composição do gelado comestível interfere em suas características físicas, influenciando diretamente a agregação dos glóbulos de gordura, a quantidade de ar incorporada e o tamanho das bolhas de ar. O tipo de estrutura tão particular do gelado comestível é obtido durante batimento vigoroso e congelamento simultâneo de uma emulsão de óleo em água pela presença de proteínas do leite, emulsificantes e estabilizantes.

Quanto ao processo de elaboração dos gelados comestíveis, este é submetido a diferentes operações unitárias onde são geradas propriedades físicas, mecânicas e sensoriais: pesagem, mistura e pré-aquecimento, pasteurização, homogeneização, maturação, batimento, envase e endurecimento conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.2.

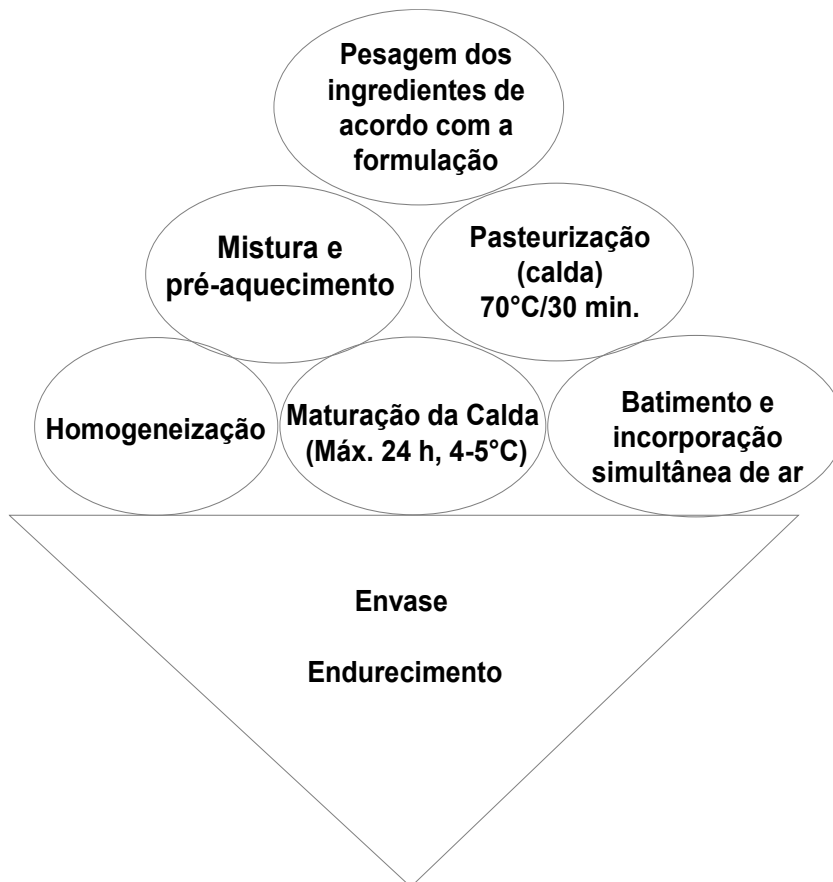
Quadro 1.1 - Funções e características dos principais componentes utilizados na produção dos gelados comestíveis.

<b>Ingrediente</b>	<b>Função/Característica</b>
<b>Água/Leite</b>	Único componente que congela, solubiliza os ingredientes e hidrata os estabilizantes.
<b>Soro Lácteo</b>	Auxilia na viscosidade, solubilidade, emulsificação e estabilidade.
<b>Gordura</b>	Contribui para melhoria da textura proporcionando cremosidade e suavidade ao produto. O aumento do teor de gordura diminui o tamanho dos cristais de gelo e interrompe o espaço em que os cristais podem se formar.
<b>Açúcares</b>	Diminuem o ponto de congelamento, proporciona aumento da viscosidade da calda e cremosidade, além de conferir o dulçor característico, fixam os compostos aromáticos.
<b>Proteínas</b>	Auxilia na retenção de água devido as características emulsificantes, auxiliam na estabilidade da espuma, reforçam a estrutura que aprisiona as células de ar no gelado comestível.
<b>Estabilizantes</b>	São o elo de ligação de todos os ingredientes. Melhoram o corpo, pois auxiliam na incorporação do ar. Diminuem a velocidade de derretimento, protegem contra choques térmicos.
<b>Emulsificantes</b>	Formam uma película protetora evitando a desestabilização da calda. Agem diretamente na etapa de incorporação do ar, não possuem efeito sobre o ponto de congelamento impedindo a formação de grandes cristais de gelo.
<b>Aromas, corantes e acidulantes</b>	Realçam o sabor e cor conferindo o aspecto desejado ao produto.

Fonte: Adaptado Correia; Pedrini; Magalhaes, (2007).

A descrição do processo de elaboração dos gelados comestíveis segue as orientações propostas por Cruz *et al.* (2018) e Goff; Hartel (2013). O processamento se inicia pela formulação da mistura dos gelados comestíveis, chamada de calda. A mistura e pré-aquecimento são as etapas em que os ingredientes, após a pesagem, iniciam o processo de fabricação. Agregam-se sólidos aos líquidos e a gordura se funde. Na pasteurização, as temperaturas são alcançadas pelo sistema que garantem a solubilização de proteínas e estabilizantes, assegurando a qualidade microbiológica do produto. É importante destacar que a legislação brasileira vigente exige a pasteurização da calda, para garantir a segurança dos gelados comestíveis no que se refere a destruição de microrganismos, a definição do binômio tempo/temperatura depende do tipo de processo a ser empregado (batelada ou contínuo).

Figura 1.2- Fluxograma de processamento dos gelados comestíveis.



Fonte: Adaptado de Goff e Hartel (2013).

A etapa de homogeneização visa à redução do tamanho dos glóbulos de gordura e o aumento da área superficial, proporcionando uma emulsão fina e estável. Tem início à formação da gordura, já que após o pré-aquecimento e a pasteurização a temperatura da mistura é suficiente para que este ingrediente esteja completamente fundido ao atravessar o homogeneizador, onde os glóbulos são reduzidos a tamanhos que vão de 0,5 a 0,2  $\mu\text{m}$ . No final da etapa de homogeneização são adicionados os emulsificantes, saborizantes e acidulantes que são sensíveis ao tratamento térmico. Iniciando a etapa de maturação, com o processo de solidificação das gorduras, aumento da viscosidade, em função da hidratação das proteínas a calda é resfriada entre 2 a 4°C por, no mínimo 4 h, antes do congelamento (GOFF; HARTEL, 2013).

Finalizada a etapa de maturação a calda passa pelo processo simultâneo de congelamento, batimento e incorporação de ar. Inúmeras mudanças físicas envolvem esta etapa, dentre elas: ação das proteínas e emulsificantes na formação e estabilização de espuma; coalescência parcial da gordura em sequência de absorção na interface gordura/ar estabilizando as lamelas entre as bolhas de ar; concentração da mistura pela remoção da água, em forma de

gelo (GOFF, 2002). Depois do congelamento em trocador de calor de superfície raspada o produto segue para o envase, endurecimento e armazenamento em temperaturas em torno de -30°C. A estrutura física final dos gelados comestíveis é constituída de ar, gelo, uma fase não congelada contendo proteínas, gordura, emulsificantes, estabilizantes, sais lácteos, lactose e adoçantes, além de água em estado líquido (DREWETT; HARTEL, 2007).

O gelado comestível é uma matriz complexa que contém várias fases físicas. Remover ou adicionar um ingrediente pode afetar não apenas suas propriedades físicas, mais também características sensoriais que podem ou não ser importante para os consumidores. A seguir algumas aplicações do soro lácteo em gelados comestíveis.

Segundo Danesh, Goudarzi e Jooyandeh, (2017) além da gordura utilizada as proteínas do soro lácteo simulam o papel da gordura em relação a textura, sabor e aumento da viscosidade dos gelados comestíveis.

Silva e Boline (2006), destacam a incorporação de sólidos do soro lácteo como substituto do leite em gelados comestíveis devido a melhoria das propriedades funcionais (viscosidade, solubilidade, gelificação, emulsificação, formação de espuma, estabilidade). Vale ressaltar que a legislação brasileira não faz referência quanto à aplicação de ingredientes proteicos de soro lácteo em gelados comestíveis. Porém a adição excessiva de soro lácteo provocaria características indesejáveis, como arenosidade ou gostos residuais.

Estudos demonstram que gelados comestíveis formulados pela incorporação de diferentes ingredientes proteicos de soro lácteo, como substituto do leite em pó desnatado, têm características tão boas quanto o sorvete padrão (CORREIA *et al.*, 2008).

Patel *et al.* (2006) avaliou as características sensoriais de formulações de gelados comestíveis com adição de concentrados proteicos de soro lácteo em relação ao leite em pó, e obteve resultados similares para o atributo textura para as formulações contendo o CPS em relação ao tradicional, demonstrando a eficácia do soro lácteo em formulações de gelados comestíveis.

### 1.3 PROBIÓTICOS

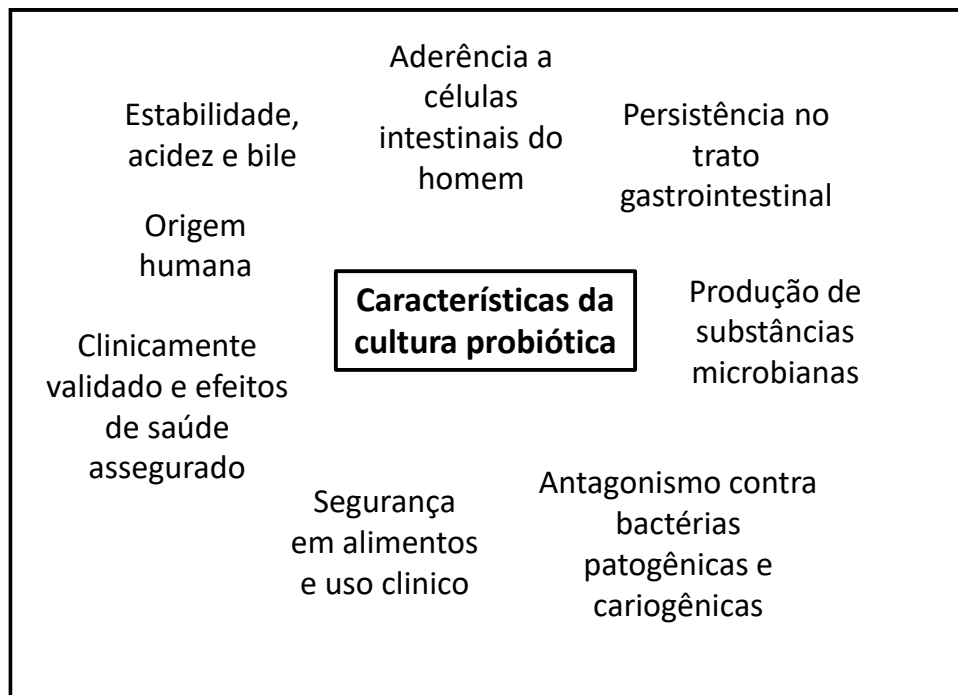
O termo probiótico foi introduzido pela primeira vez em 1965. A palavra de origem grega, que significa “para vida”, foi usada para descrever uma substância microbiana que estimulava o crescimento de outros microrganismos (LILLEY; STILLWELL, 1965). A primeira experiência realizada com o uso de microrganismos em alimentos foi em 1907, por

Elie Metchnikoff, cientista russo e professor do Instituto Pasteur, que recebeu em 1908 o Prêmio Nobel de Medicina, este fez observações relevantes sobre o papel positivo desempenhado por algumas espécies de bactérias. Ele relatou que o consumo regular de leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* poderia trazer benefícios à saúde (FIORAMONTI; THEODOROU; BUENO, 2003). Desde então, pesquisas relacionadas aos probióticos e seus benefícios ao organismo se faz cada vez mais necessária.

Segundo Hill *et al.* (2014), probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando consumidos regularmente e em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Eles carregam na forma viável, bactérias de origem intestinal humana (ou animal), possuem a finalidade principal de repor a microbiota intestinal que foi de algum modo, desbalanceada por tratamentos com antibióticos, quimioterapia, radioterapia ou por situações de estresse (TANNOCK, 1998). Para se obter o máximo de benefícios dos probióticos é necessário que os mesmos estejam viáveis no momento da ingestão, e disponíveis em concentrações superiores a ( $\geq 6 \log$  UFC/g ou mL de produto). Além de conter concentrações suficientes de microrganismos capazes de sobreviver e aderir à mucosa intestinal, é importante que os microrganismos resistam a valores baixos de pH, aos sais biliares e aos fatores antimicrobianos existentes no trato gastrointestinal (FERREIRA, 1998; FULLER, 1989). Vale destacar que a maioria das culturas utilizadas em alimentos e relatadas como probióticas são de origem humana, entretanto pode ser utilizada a de animais (ZIELIŃSKA; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, 2018). A (Figura 1.3) mostra as características para uma cultura ser considerada probiótica, funcionalidade e tecnologia.

Os probióticos tem grande potencial de promoção à saúde, e se destacam por algumas ações ao organismo, como exemplo, regulação do trânsito intestinal, normalização da microbiota desestabilizada e efeito protetivo através da supressão competitiva de patógenos. Algumas espécies específicas ainda causam alguns efeitos, como: síntese de vitaminas, atividade enzimática e neutralização de agentes cancerígenos (HILL *et al.*, 2014; KERRY *et al.*, 2018). Lembrando que para a funcionalidade dos probióticos em alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil exige que seja comprovada sua segurança para o uso em alimentos. A comprovação se dá através do histórico de uma aplicação segura, inexistência de ações adversas, não produzir substâncias ou metabólitos que causem injúria à saúde, não possuir resistência e ser sensível a pelo menos dois tipos diferentes de antibióticos (ANVISA, 2018).

Figura 1.3- Segurança e funcionalidade da seleção de microrganismos probióticos.



Fonte: Adaptado de Santos, (2012).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os microrganismos mais empregados em alimentos (BOYLSTON *et al.*, 2004; SOLANKI *et al.*, 2013). Elas têm sido isoladas de porções do trato gastrintestinal de humanos saudáveis. O intestino delgado e o cólon são os locais preferidos de colonização intestinal desses microrganismos (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002). O gênero *Bifidobacterium* se destaca por ser um dos probióticos mais utilizados em produtos lácteos funcionais (VERRUCK *et al.*, 2015). Estes são definidos como bacilos anaeróbios, heterofermentativos, não móveis, não formadores de esporos e gram-positivos, que pode ser isolado do trato gastrintestinal humano ou da cavidade oral (WILSON; ONG, 2017), é caracterizado por habitar naturalmente o cólon humano, sendo que cerca de 3 % do total da microbiota pertence ao ecossistema intestinal humano (JENA *et al.*, 2017). Porém, fatores como: elevados níveis de oxigênio, pH, acidez, processamento, tempo e temperatura de armazenamento causam sensibilidade e afetam a viabilidade das bifidobactérias quando inseridas ao produto (HOLKEM *et al.*, 2016).

A escolha de uma matriz alimentar adequada para a adição de probióticos é fundamental para potencializar sua eficácia (RANADHEERA *et al.*, 2015). Visto isso, as matrizes lácteas são consideradas veículo de maior sucesso para carregar os microrganismos

probióticos, principalmente por favorecer estas bactérias, devido a estrutura de suas matrizes, como: teor de gordura, proteínas, açúcares, atividade de água e pH (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Em virtude disso, o gelado comestível pode ser uma alternativa de inclusão de probióticos na dieta humana, se apresentado como um veículo adequado para esse tipo de microrganismo. Alguns estudos têm demonstrado que é possível a produção de gelado comestível inoculado e Frozen iogurte (LEANDRO, *et al.*, 2006).

De acordo com Cruz *et al.* (2009) a incorporação de microrganismos probióticos na formulação de gelados comestíveis não afeta a qualidade global do produto quando comparado com um gelado comestível convencional.

A viabilidade do probiótico em uma matriz alimentar depende de vários fatores, como: o processamento, o tipo de cultura a ser adicionada ao produto, sua interação com outros microrganismos existentes no alimento, a produção de hidróxido de hidrogênio durante o metabolismo bacteriano e a acidez final do produto (VASILJEVIC, 2008). Um dos maiores obstáculos de sobrevivência do probiótico no gelado comestível diz respeito as etapas de processamento do produto. Entretanto, vários estudos estão sendo realizados e seus resultados demonstram que as culturas probióticas são capazes de se manter viáveis durante o processamento do gelado comestível (CRUZ *et al.*, 2009).

Andrighetto e Gomes, (2003) em sua pesquisa, elaborou um gelado comestível adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, e observou que pode ser armazenado durante 60 dias, a  $-25^{\circ}\text{C}$ , sem ter suas características sensoriais e microbiológicas alteradas. No estudo, o gelado comestível apresentou uma contagem de  $8,3 \times 10^7$  UFC/g após 60 dias de armazenamento. Kebary e Hussein, (1998) evidenciaram que o *Bifidobacterium ssp* conseguiu sobreviver em frozen iogurtes elaborados com alginatos. Góral, *et al.* (2018a) reportaram em seu estudo que as bactérias probióticas das linhagens *L. rhamnosus* B 442, *L. rhamnosus* 1937 e *L. lactis* JBB 500 são boas transportadoras de magnésio, e podem ser usadas para a produção de gelado comestível suplementado com magnésio, sem alterar seus parâmetros químicos. Kozłowicz, *et al.* (2019) demonstraram a possibilidade de produzir um gelado comestível adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* B 442 enriquecido com íons de zinco e perceberam que são facilmente absorvíveis, e que o produto permanece adequado em armazenamento por 90 dias.

Por fim, nessa perspectiva, o gelado comestível tem demonstrado grande potencial como produto alimentício probiótico.

## 1.4 CRIOCONCENTRAÇÃO

A crioconcentração é uma técnica utilizada para remoção parcial da água dos alimentos. A crioconcentração é uma operação unitária de separação capaz de concentrar líquidos por meio do congelamento e posterior separação de uma fração de água congelada. Do ponto de vista da qualidade, minimiza perdas de compostos voláteis e termolábeis, proporcionando um produto final com uma qualidade que não é obtida através de processos convencionais de concentração (SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Além disso, a crioconcentração possibilita preservar o máximo de qualidades organolépticas e nutricionais dos alimentos líquidos (MORENO *et al.*, 2015; ROBLES *et al.*, 2016), principalmente por não dispor de alta temperatura (AIDER; HALLEUX, 2009; PETZOLD; AGUILERA, 2013). Ela dispõe de vantagens devido ao fato de que as reações químicas e bioquímicas, responsáveis pela deterioração da qualidade do produto, são muito lentas a baixas temperaturas (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007). Esta tecnologia assegura maior qualidade do produto concentrado (AIDER; HALLEUX, 2009).

Segundo BELÉN *et al.* (2012) um sistema básico de crioconcentração compreende em duas etapas principais: congelamento da solução, que ocorre através da cristalização da água e separação de uma fração líquida concentrada e outra de gelo. Redução da temperatura da solução, onde se inicia o processo de cristalização da água. A partir desta etapa, cristais de gelo são formados e separados da solução concentrada. A crioconcentração, é composta por três diferentes métodos de aplicação: a crioconcentração em suspensão, crioconcentração em camada e crioconcentração em blocos. Tendo como principal mecanismo a formação de cristais de gelo na solução de alimentação.

O processo de crioconcentração em suspensão é o mais utilizado na indústria (ROBLES *et al.*, 2016), porém é um método de alto custo para investimento, porque utiliza trocadores de calor de superfície raspada para nucleação do gelo, recristalizadores para aumentar o crescimento dos cristais de gelo e colunas de lavagem pressurizada para separar o gelo do líquido concentrado. No processo de crioconcentração em camada ocorre a formação de um único cristal de gelo sob uma superfície fria, a qual fica em contato direto com a solução a ser concentrada (AIDER; HALLEUX, 2008; AIDER; HALLEUX, 2009; GULFO *et al.*, 2013). Já o método de crioconcentração em blocos é considerado o mais promissor e eficaz entre os métodos (AIDER; HALLEUX, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2011; MORENO *et al.*, 2014). Ele permite obter produtos alimentícios de alto valor nutricional, preserva as propriedades

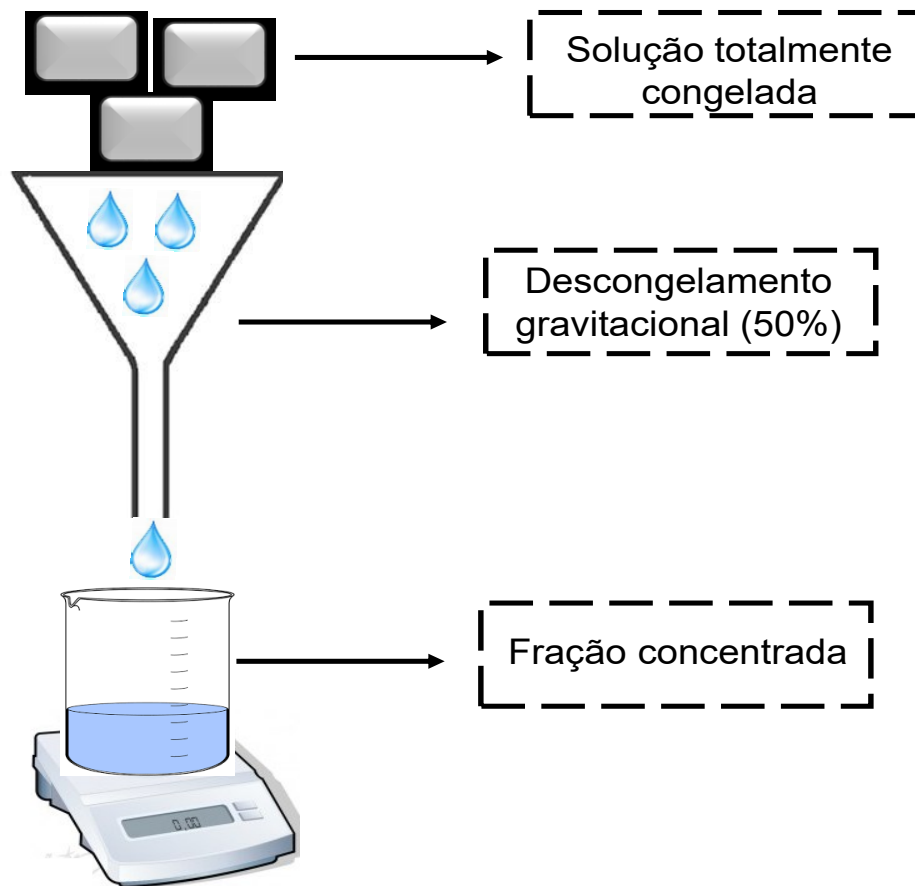


sensoriais, além disso, reduz de três a quatro vezes os custos operacionais totais (incluindo capital, limpeza e energia). Okawa *et al.* (2009) relatam também sua importância na redução dos custos de transporte, manuseio e armazenamento, uma vez que esses custos são baseados na massa do produto.

No processo de crioconcentração em blocos a solução é congelada totalmente e descongelada parcialmente (50%) para recuperar a fração líquida concentrada (Figura 1.4). Esta técnica é composta por três etapas: congelamento, descongelamento e separação das frações (concentrado e gelo). A solução é totalmente congelada, e a fração concentrada é então separada da fração de gelo através do descongelamento gravitacional parcial do bloco (NAKAGAWA *et al.*, 2010; MORENO *et al.*, 2013; PETZOLD *et al.*, 2015), resultando nas duas frações. O processo pode ser realizado em ciclos sucessivos para aumentar a eficiência da concentração (AIDER; OUNIS, 2012). Segundo Aider; Halleux e Akbache, (2007) a eficiência do processo depende da taxa de impurezas na fração de gelo. Neste método o controle da temperatura de descongelamento é importante, pois possibilita que a quantidade de sólidos retidos no gelo seja minimizada (AIDER; HALLEUX, 2009).

Para a indústria de derivados lácteos, o emprego da crioconcentração em blocos se torna interessante, principalmente em termos de manutenção e sabor. Ela vem sendo aplicada com eficiência na indústria de laticínios, especialmente na concentração de soro lácteo (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; HALLEUX; MELNIKOVA, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2011; CANELLA *et al.*, 2018), leite de vaca (BALDE; AIDER, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2018), leite de cabra (CANELLA *et al.*, 2019) e soro de leite de cabra (LIZ *et al.*, 2020). Particularmente, a concentração de soro lácteo foi consolidada como uma alternativa tecnológica para uso desse produto secundário. Aider, Halleux e Akbache (2007) aplicaram a crioconcentração em blocos no soro lácteo e observaram que ela preservou a composição nutricional, obtendo um produto final com, aproximadamente, 35% de sólidos totais.

Figura 1.4- Esquema do processo de crioconcentração em blocos.



Fonte: O Autor.

## 1.5 PROPRIEDADES FÍSICAS

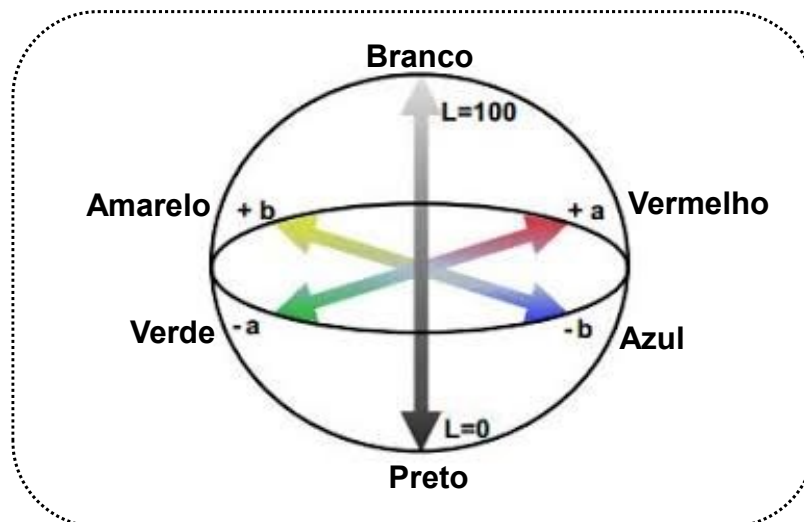
### 1.5.1 Análise de cor

A cor é responsável por determinar a qualidade e identidade dos alimentos, ela possui um papel importante em sua aceitação, influenciando inclusive na forma que o consumidor percebe o sabor. Existe uma tendência de se associar a cor com o sabor dos alimentos, criando assim uma expectativa no consumidor (WADHWANI; MCMAHON, 2012). Há diversas formas de determinar e especificar a cor dos alimentos, que pode ser analisada tanto por inspeção (análises sensoriais) ou por métodos instrumentais. É possível citar quatro categorias de instrumentos de detecção de cor: Calorímetros, densímetros, câmaras espectrais e espectrofotômetro. Porém o mais utilizado são os calorímetros, especialmente o calorímetro triestímulo. Eles avaliam a cor utilizando de três a quatro filtros que corresponde aos receptores

do olho humano. Segundo Wu e Sun, (2013) este método visa a tradução numérica da percepção visual humana da cor para a linguagem de computadores.

O sistema CIELab é o mais comum e o mais utilizado, em 1976, a *Commission Internationale de L'Eclairage* Commission (CIE), definiu o sistema CIELab, a fim de, padronizar as análises de cor. O espaço CIE  $L^*a^*b^*$ , é representado por uma esfera (Figura 1.5), com três eixos tridimensionais, representando os parâmetros luminosidade ( $L^*$ ) eixo Y, que varia numa escala de escala 1–100 (preto a branco), o eixo X representa o parâmetro cromático  $b^*$  do amarelo (+) ao azul (-); o eixo Z representa o parâmetro cromático  $a^*$  que varia do vermelho (+) ao verde (-) e o  $\Delta E^*$  que representa a diferença total de cor (GÓRAL *et al.*, 2018a; GÓRAL *et al.*, 2018b). A escala CIELAB é usada como medição de cor de alimentos devido sua distribuição uniforme de cor e por ser perceptivelmente uniforme, a combinação de suas coordenadas resulta em uma posição que expressa à cor.

Figura 1.5- Escala tridimensional de medida instrumental da cor do sistema CIELAB.



Fonte: O Autor.

### 1.5.2 Análise instrumental do perfil de textura (TPA)

Textura foi definida por Souza *et al.* (2011) como uma percepção sensorial e funcional envolvendo os sentidos de tato, visão, audição e sinestésicos das propriedades de superfície, mecânica e estrutural do alimento, ela influencia diretamente na qualidade e, conseqüentemente, na aceitação do produto pelo consumidor. Conhecer as características texturais de um produto é fundamental para melhoria de sua qualidade. Com esse intuito, a

indústria de alimentos visa conhecer as necessidades dos consumidores e atender sua satisfação por meio de sua percepção positiva acerca de um produto.

De acordo com Truong e Daubert (2000) a textura de um alimento pode ser avaliada através da análise instrumental do perfil de textura (TPA). A submissão de uma amostra de alimento a um ensaio de TPA permite gerar um gráfico de força versus tempo, cada tipo de alimento resulta em uma curva específica. A partir desta curva é possível mensurar parâmetros mecânicos, estes são diferenciados como primários e secundários, sendo os primários: dureza, coesividade, elasticidade, resiliência e adesividade e os secundários: gomosidade, mastigabilidade e fraturabilidade (FOGAÇA, 2014).

Na determinação das propriedades de textura, os métodos instrumentais podem ser utilizados em substituição à análise sensorial. Desta forma, a TPA simula formas de deformação que ocorrem pela compressão e corte dos dentes no alimento. A escolha da metodologia instrumental frente a sensorial se dá pelo menor tempo de resposta e facilidade de execução (SOUZA *et al.*, 2011).

Os parâmetros texturais mais utilizados em amostras de gelados comestíveis são a firmeza e a adesividade. A firmeza é medida como o pico da força máxima (g) necessária ao cisalhamento requerido para “cortar” o gelado comestível, simulando uma colher. Ela indica a rigidez estrutural do produto, quanto mais firme a amostra maior a força necessária para cisalhá-la. A leveza no gelado comestível é desejada e pode ser relacionada com sua firmeza, o produto mais leve, apresentará menor firmeza, ou seja, menor força necessária para seu cisalhamento (AIME *et al.*, 2001; SILVA; BOLINE, 2006). Já a adesividade no gelado comestível consiste na força que une o gelado comestível a língua e o palato.

### **1.5.3 Overrun e Derretimento**

O overrun e o derretimento são os principais parâmetros de qualidade dos gelados comestíveis, eles influenciam em seus aspectos físicos e estruturais. Cruz *et al.* (2011) definiram overrun como aumento percentual do volume do gelado comestível (produto final) em relação a calda ou mistura (produto inicial), ou seja, a quantidade de ar incorporado durante o processo de batimento e congelamento simultâneo da calda. O overrun é importante no rendimento do produto final, e deve ser mantido nos padrões da legislação, que está atrelado a densidade do produto, 475g/L (BRASIL, 2005). A quantidade de ar nos gelados comestíveis, além de promover uma textura leve e agradável, também controla as propriedades físicas e a dureza do

produto. Uma pequena quantidade de ar incorporada no gelado comestível torna-o muito denso. A aeração é um recurso que diminui o custo desses produtos. Durante o processo de batimento e aeração do gelado comestível, o desenvolvimento das células de ar é influenciado por fatores relacionados a formulação como a rede de gordura, proteínas, emulsificantes e cristais de gelo (GOFF; HARTEL,2013).

A aparência global do gelado comestível à medida que ele derrete é importante na percepção global do consumidor e está relacionada a qualidade do produto. Segundo Barbosa *et al.* (2010) durante o derretimento, dois eventos principais acontecem, o derretimento dos cristais de gelo e o colapso da estrutura espumosa lipídica estabilizada. Mesmo após o derretimento do gelo, o gelado comestível não derrete completamente até que sua estrutura entre em colapso. Sofjan e Hartel (2004) observaram diversos fatores que podem influenciar no processo de derretimento, entre eles estão a saturação, características emulsionantes e concentração de lipídeos. Além disso, a observação do processo de derretimento pode trazer informações quanto a outros fatores de variação da qualidade, tais como estabilidade da proteína e aglomeração de gordura que afetam a cremosidade, suavidade e riqueza do produto (THARP, 2008).

#### **1.5.4 Microscopia**

As técnicas de microscopia são amplamente utilizadas para determinar tamanho e formas de estruturas cristalinas. Goff *et al.* (1989), Hartel (1996), Berger (1997) e Goff (1997) recomendam a microscopia como técnica de fundamental relevância para a realização de análises qualitativa e quantitativa em amostras de gelados comestíveis, com o objetivo de visualizar e analisar o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo e de demais partículas presentes no gelado comestível.

O exame da microestrutura do gelado comestível é bastante complicado devido ao seu alto conteúdo de água e gordura, e a alta dependência de sua estrutura com a temperatura (CALDWELL *et al.*, 1992). A informação sobre tamanhos de cristais de gelo e bolhas de ar e suas distribuições, obtidas da observação das amostras intactas, é importante para a compreensão das propriedades sensoriais dos gelados comestíveis (CALDWELL *et al.*, 1992).

Segundo Caillet *et al.* (2003), atualmente, existem diversas técnicas microscópicas usadas para caracterizar a estrutura dos gelados comestíveis. Os principais métodos microscópicos usados para controle de qualidade são os métodos destrutivos, indireto e direto. O método destrutivo é baseado na observação ótica da fase dispersa da amostra (cristais de gelo

e bolhas de ar) misturada e dissolvida em meio adequado. As vantagens desta técnica estão no curto tempo de análise do experimento, pois, as informações são coletadas diretamente da amostra. A desvantagem é que, com a dissolução da amostra, não é possível saber o volume e a posição das diferentes fases obtidas. Além disso, como a amostra é totalmente derretida ou destruída, as imagens obtidas podem não representar toda morfologia e textura do congelamento.

O método indireto utiliza técnicas de microscopia eletrônica, fornecendo imagens da estrutura das amostras do gelado comestível parcialmente destruídas pela criosubstituição, criofixação e congelamento. As vantagens desta técnica estão na alta resolução do equipamento que pode observar detalhes da fina estrutura das amostras. A desvantagem é que a microscopia eletrônica é muito cara e a preparação da amostra é longa (Caillet *et al.*, 2003).

O método direto é o mais utilizado pelos laboratórios industriais, ele caracteriza a estrutura de alimentos congelados, é considerado um método rápido, efetivo e de baixo custo. Esta técnica utiliza a microscopia fotônica com dispositivo coaxial iluminado, preservando melhor a textura original da amostra congelada. É baseado na reflexão direta da luz na face da amostra de gelado comestível. Em comparação com a microscopia eletrônica, a desvantagem é a baixa resolução (Caillet *et al.*, 2003).

### **1.5.5 Reologia**

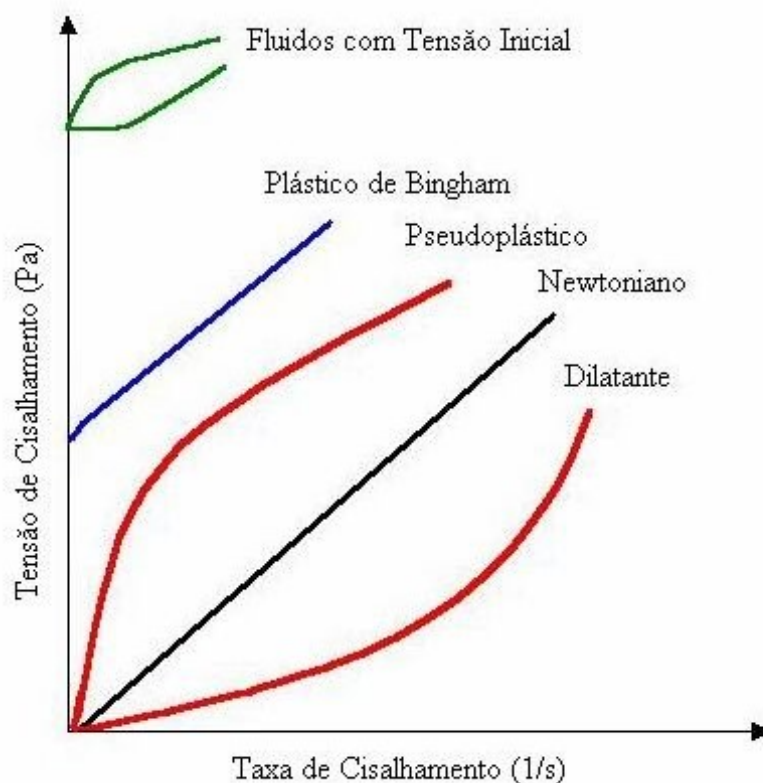
A reologia é considerada a ciência da deformação e fluxo da matéria, ela estuda a maneira como os materiais respondem a uma tensão ou a um estresse aplicado. Seu foco principal é avaliar a forma como os materiais respondem quando aplicada uma força. Todos os materiais possuem propriedades reológicas, de modo que a reologia pode ser aplicada em diversas áreas de estudo (SU, 2012; OLIVEIRA, 2005; TONELI; MURR; PARK, 2005). As propriedades de interesse em materiais sólidos é a elasticidade e para materiais líquidos a viscosidade (GALLO, 2013).

A análise reológica abrange diferentes propriedades associadas à deformação da matéria (VRIESMANN, 2008). A viscosidade é a principal propriedade física de um líquido de resistir ao fluxo induzido pela tensão aplicada (cisalhamento). A viscosidade de uma mistura é afetada pela composição (principalmente gordura e estabilizante), tipo e qualidade dos ingredientes, processamento e manuseio da mistura. Nos gelados comestíveis, quando aumenta a viscosidade, à uma maior resistência ao derretimento, e a cremosidade do produto aumenta.

Então, a viscosidade desejada pode ser assegurada controlando a composição da mistura (ARBUCKLE, 1977).

A reologia na área de alimentos possui muitas aplicações no que diz respeito à aceitabilidade do consumidor para o desenvolvimento de novos produtos. Os alimentos são materiais estruturalmente e reologicamente complexos, consistindo, muitas vezes, de misturas de sólidos e líquidos (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), o conhecimento de seu comportamento reológico é útil não somente para o controle de qualidade, mas principalmente para o dimensionamento de sistemas de tubulação, trocadores de calor, filtros, bombas, entre outros (VASQUES, 2003). O comportamento dos fluidos é descrito através de modelos reológicos (Figura 1.6), que relacionam tensão de cisalhamento com a taxa de deformação.

Figura 1.6- Curva de fluxo de fluidos com comportamento reológico independente do tempo.



Fonte: Toneli; Murr e Park, (2005).

O modelo reológico mais simples é o newtoniano, que apresenta uma relação linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, independente do tipo de escoamento, dependendo apenas da temperatura e da composição do fluido. Os fluidos não-newtonianos, com temperatura e composição constantes, a viscosidade aparente depende da taxa de

cisalhamento ou da tensão de cisalhamento (RAO, 1986). Dentre os fluidos independentes do tempo estão os fluidos pseudoplásticos (shear thinning), nos quais a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de deformação e os fluidos dilatantes (shear thickening), quando a viscosidade aparente aumenta com o aumento da taxa de deformação (HOLDSWORTH, 1993; MACHADO, 2002; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSACÁNOVAS, 2005). Os fluidos não-newtonianos também podem ser classificados como o plástico de Bingham, que necessita de uma tensão de cisalhamento inicial para escoar, chamada limite de escoamento e, depois de atingida essa tensão, comporta-se como newtoniano (MACHADO, 2002). A escolha do modelo a ser utilizado é uma função das características do fluido (RAO; ANANTHESWARAN, 1982). Os modelos mais utilizados são: Ostwald-de Waele (Lei da Potência), Plástico de Bingham, Hershel-Bulkley e Casson.

## REFERÊNCIAS

- AIDER, M.; HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 679–685, 2009.
- AIDER, M.; HALLEUX, D. Production of concentrated cherry and apricot juices by cryoconcentration technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1768-1775, 2008.
- AIDER, M.; HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 92–102, 2007.
- AIDER, M.; HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 334-341, 2009.
- AIDER, M.; OUNIS, W. B. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 195-202, 2012.
- AIME, D. B. *et al.* Textural analysis of fat reduced vanilla ice cream products. **Food Research International**, v. 34, p. 237-246, 2001.
- ANDREASSEN, T.G.; NIELSEN, H. Ice cream and aerated desserts. In: EARLY, R. **The technology of dairy products**. London: Blackie, 1<sup>a</sup> ed. p.197-220, 1992.
- ANDRIGHETTO, C.; GOMES, M.I.F.V. Produção de picolés utilizando leite acidófilo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 267-271, 2003.



ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 241 de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília, 2018. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC\\_241\\_2018\\_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7)>. Acesso em: 17 Jan. 2020.

ARBUCKLE, W. S. **Ice cream**. 3 ed. USA: AVI Publishing Company, p. 517, 1977.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BALDE, A.; AIDER, M. Impact of cryoconcentration on casein micelle size distribution, micelles inter-distance, and flow behavior of skim milk during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 68–76, 2016.

BARBOSA, A. S. *et al.* Avaliação do perfil microbiológico de gelados comestíveis comercializados em Campina Grande-PB. **Revista verde, Mossoró**, v. 5, n. 3, p. 63- 79, 2010.

BELÉN, F. *et al.* One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 364-373, 2012.

BERGER, K.G. Ice cream. **Food Emulsions**. 3.ed. New York, p.413-490, 1997.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 266, de 22 de setembro de 2001=5. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 set. 2005.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v.35, p.125-131, 2002.

BOYLSTON, T. D. *et al.* Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p.375-387, 2004.

BURRINGTON, K. J. Aditivos: Os Benefícios do Soro. **Revista Leites e Derivados**, v. 50, 2000.

CAILLET, A. *et al.* Characterization of ice cream structure by direct optical microscopy. Influence of freezing parameters. **Swiss Society of Food Science and Technology**, p.743-749, 2003.

CALDWELL, K.B.; GOFF, H.D. e STANLEY, D.W. A lowtemperature scanning electron microscopy study of ice cream. I. Techniques and general microstructure. **Food Structure**, v.11, n.1, p.1-9, 1992.

CANELLA, M.H.M. *et al.* Use of Concentrated Whey by Freeze Concentration Process to Obtain a Symbiotic Fermented Lactic Beverage. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 14, p. 56-68, 2018.

CANELLA, M.H.M. *et al.* Performance of Skim Goat Milk Mineral Content Subjected to the Block Freeze Concentration Process. **Asian Journal of Advances in Agricultural Research**, v.9, p. 1-9, 2019.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CHABAROV, A.; AIDER, M. Mathematical modeling and experimental validation of the mass transfer during unidirectional progressive cryoconcentration of skim milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 21, p. 151-159, 2014.

CORREIA, R. T. P.; PEDRINI, M. R. DA S.; MAGALHAES, M. M. DOS A. Sorvete: aspectos tecnológicos e estruturais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p. 19– 23, 2007.

CORREIA, T. P. R. *et al.* Sorvetes elaborados com leite caprino e bovino: composição química. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, p. 251–256, 2008.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A. E. C.; ARAMI, J. B.; SOUSA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Sorvetes probióticos e prebiótico. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J. A. F. (Ed.). **Probióticos e prebiótico em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, p. 359-388, 2011.

CRUZ, A.G. *et al.* Ice cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1-7, 2009.

CRUZ, A.G. *et al.* **Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. Elsevier, 2018.

DANESH, E.; GOUDARZI, M.; JOOYANDEH, H. Short communication: Effect of whey protein addition and transglutaminase treatment on the physical and sensory properties of reduced-fat ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 5206– 5211, 2017.

DE FARIAS, T.G.S. *et al.* Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. **LWT– Food Science and Technology**, v. 100, p. 391-396, 2019.

DREWETT, E. M.; HARTEL, R. W. Ice crystallization in a scraped surface freezer. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1060-1066, 2007.

EVANS, E.W. **Uses of milk proteins in formulated foods**. In: HUDSON, B. J. F. Developments in food proteins. New York: Elsevier, p.131-163, 1982.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos probióticos: uma realidade. **Leite e Derivados**, v. 42, p. 6-82, 1998.

FIOL, C. *et al.* Introduction of a new family of ice creams. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 7, p. 5–10, 2017.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 711-724, 2003.

FOGAÇA, D.N.L. **Avaliação de propriedades mecânicas, físico-químicas e influência do tipo de acidificante e tempo de armazenamento visando à aplicação no controle do processo de produção de queijos de coalho**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 61 f, 2014.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. (eds.), **Fundamentals of cheese science**, Springer, New York, p. 533-542, 2017.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GALLO, J.M.A.S. **Avaliação do comportamento reológico e das propriedades sensoriais de molhos comerciais para salada tratados por irradiação**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 96 f, 2013.

GHALY, A. E.; KAMAL, M. A. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. **Water Research**, v. 38, p. 631- 644, 2004.

GIRALDO, J. *et al.* Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat milk. **International Dairy Journal**, v.69, p. 40-44, 2017.

GOFF, H.D. Colloidal aspects of ice cream - A review. **International Dairy Journal**, v. 7, p.363-373, 1997.

GOFF, H.D. Formation and stabilisation of structure in ice cream and related products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.7, p.432-437, 2002.

GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice Cream**. Sétima ed. EUA: Springer New York, 2013.

GOFF, H.D.; KINSELLA, J.E.; JORDAN, W.K. Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability. **Journal Dairy Science**, v.72, p.385-397, 1989.

GÓRAL *et al.* Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. **Food Chemistry**, v. 239, p. 1151-1159, 2018a.

GÓRAL *et al.* Impact of stabilizers on the freezing process, and physicochemical and organoleptic properties of coconut milk-based ice cream. **LWT– Food Science and Technology**, v. 92, p. 516-522, 2018b.

- GULFO, R. *et al.* Multi-plate freeze concentration: Recovery of solutes occluded in the ice and determination of thawing time. **Food Science and Technology International**, v. 020, p. 405-419, 2013.
- HARTEL, R.W. Ice crystallization during the manufacture of ice cream. In: **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.315-320, 1996.
- HOLDSWORTH, S.D. Rheological models used for the prediction of flow properties of food products. **Transactions in Chemical Engineering**, v. 71, p. 139-179, 1993.
- HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.
- HOLKEN, A. T. *et al.* Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 71, p. 302-308, 2016.
- JENA, R. *et al.* Isolation and species delineation of genus *Bifidobacterium* using PCR-RFLP of partial hsp60 gene fragmente. **LWT – Food Science and Technology**, v. 80, p. 286-293, 2017.
- KALICKA, D. *et al.* Physical and sensory characteristics and probiotic survival in ice cream sweetened with various polyols. **International Journal of Dairy Technology**, v.72, p. 456-465, 2019.
- KEBARY, K. M. K.; HUSSEIN, S. A.; BADAWI, R. M. Improving viability of bifidobacterium and their effect on frozen ice milk. **Egyptian Journal of Dairy Science**, v. 26, p. 319-337, 1998.
- KERRY, G. R. *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927–939, 2018.
- KILARA, A.; CHANDAN, R.C. **Ice cream and frozen desserts**. Dairy processing & quality assurance, Wiley-Blackwell, New Delhi, v. 74, p. 364-365, 2009.
- KILARA, A.; VAGHELA, M. N. 4 – Whey proteins. In: **Proteins in Food Processing**. Elsevier, p. 93–126, 2018.
- KOZŁOWICZ, K. *et al.* Effect of ice cream storage on the physicochemical properties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, 108562, 2019.
- LEANDRO, E. *et al.* Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UVF H2b20 em sorvete. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 300-303, 2006.
- LEINDECKER, G. C. **Separação das proteínas do soro do leite in natura por ultrafiltração**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth-Promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747–748, 1965.

LIZ *et al.* Stability of bifidobacteria entrapped in goat's whey freeze concentrate and inulin as wall materials and powder properties. **Food Research International**, v. 127, 108752, 2020.

MACHADO, J. C. V. **Reologia e escoamento de fluidos: ênfase na indústria do petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência: PETROBRÁS, p. 257, 2002.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197–1211, 2007.

MASOTTI, F. *et al.* Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 64, p. 102-114, 2017.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciência Agrônômica**, Londrina, v. 15, p.80-94, 1994.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. **Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry**, INTECH, 10.5772/53159, 2013.

MORENO, F. L. *et al.* Volatile compounds, sensory quality and ice morphology in falling-film and block freeze concentration of coffee extract. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 64-71, 2015.

MORENO, F.L. *et al.* A process to concentrate coffee extract by the integration of falling film and block freeze-concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 88-95, 2014.

MORENO, F.L. *et al.* Effect of separation and thawing mode on block freeze-concentration of coffee brews. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 396-402, 2013.

MUÑOZ, I. B. *et al.* Progressive freeze concentration of skimmed milk in an agitated vessel: Effect of the coolant temperature and stirring rate on process performance. **Food Science and Technology International**, v. 25, p. 150-159, 2018.

NAKAGAWA, K. *et al.* Usefulness of solute elution from frozen matrix for freeze-concentration technique. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 28, n. 5, p. 718–724, 2010.

OKAWA S.; ITO T.; SAITO A. Effect of crystal orientation on freeze concentration of solutions. **International Journal of Refrigeration**, v. 32, p. 246-252, 2009.

OLIVEIRA, K. H.; SOUZA, J. A. R. DE; MONTEIRO, A. R. Caracterização reológica de sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 592–598, 2008.

OLIVEIRA, A.L. *et al.* Propriedades físicas de misturas para sherbet de mangaba. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.6, p.581-586, 2005.

ORDÓÑEZ, P. J. **Tecnología de alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANKIEWICZ, U. *et al.* Novel method of zinc ions supplementing with fermented and unfermented ice cream with using PEF. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 2035–2044, 2019.

PATEL, M. R. *et al.* Increasing the Protein Content of Ice Cream. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1400–1406, 2006.

PETZOLD, G.; AGUILERA, J. M. Centrifugal freeze concentration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 253–258, 2013.

PETZOLD, G. *et al.* Block freeze concentration assisted by centrifugation applied to blueberry and pineapple juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 192-197, 2015.

PETZOLD, G. *et al.* Vacuum-assisted block freeze concentration applied to wine. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 330– 335, 2016.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RANADHEERA, R.D.C.S; BAINES S.K.; ADAMS M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p.1–7, 2010.

RANADHEERA, C. S. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. **Small Ruminant Research**, v. 123, p. 155-159, 2015.

RAO, M. A.; ANANTHESWARAN, R. C. Rheology of fluids in food processing. **Food Technology**, v. 36, n. 2, p. 116-126, 1982.

RAO, M. A. Rheological properties of fluid foods. In: RAO, M.A.; RIZVI, S.S.H. **Engineering properties of foods**. New York: Marcel Dekker, Cap.5, p.1-47, 1986.

REMÓN, J.; GARCÍA, L.; ARAUZO, J. Cheese whey management by catalytic steam reforming and aqueous phase reforming. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 66–81, 2016.

ROBLES, C. M. *et al.* Ice morphology modification and solute recovery improvement by heating and annealing during block freeze-concentration of coffee extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 72-81, 2016.

SÁNCHEZ, J. *et al.* Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 644–651, 2010.

- SÁNCHEZ, J. *et al.* Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 147–155, 2011.
- SANTOS, P. P. **Desenvolvimento de gelado comestível probiótico**. Universidade Federal da Bahia, 2012.
- SILVA, K.; BOLINE, A. M. H. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, p. 116–122, 2006.
- SINHA, R. *et al.* Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1484-1491, 2007.
- SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695–704, 2008.
- SOFJAN, RP; HARTEL, RW. Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. **International Dairy Journal**. v. 14, n. 3, p. 255-262. 2004.
- SOLANKI, H. K. *et al.* Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. **BioMed Research International**, p. 1-21, 2013.
- SOUZA, V. R. *et al.* Avaliação e definição do perfil de textura ideal de queijo petitsuisse. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n.382, p.48-53, 2011.
- SU, F. **Comportamento estrutural de formulações de gelado comestível com variações da base gordurosa**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 114f, 2012.
- TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 147-156, 2005.
- TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 527-533, 1998.
- THARP, BW. **Comportamento do sorvete no derretimento**. Brasil: Casquinha & Sorvete. 2008.
- TONELI, J.T.C.L.; MURR, F. E. X; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.7, n.2, p.181-204, 2005.
- TRUONG, V. D.; DAUBERT, C. R. Comparative study of large strain methods for assessing failure characteristics of selected food gels. **Journal of texture studies**, v. 31, p. 335–353, 2000.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VASQUES, C. T. **Reologia do suco de goiaba: efeito da diluição e do tamanho de partícula**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 66p, 2003.

VERRUCK, S. *et al.* The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1179-1183, 2015.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, p. 412, 2010.

VRIESMANN, L. C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (Cupuaçu)**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 118f, 2008.

WADHWANI, R.; MCMAHON, D. J. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.5, p. 2336–2346, 2012.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**, CRC Press, Boca Raton, 2006.

WILSON, H. L.; ONG, C. W. *Bifidobacterium longum* vertebral discitis in a patient with cirrhosis and prostate cancer. **Anaerobi**, v. 47, p. 47-50, 2017.

WU, D.; SUN, D. Colour measurements by computer vision for food quality control: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, p. 5-20, 2013.

YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S. *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 756-774, 2015.

ZADOW, J. G. **Whey and Lactose Processing**. England: Elsevier Applied Science, 1992.

ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALAS-MELLADO, M. L. M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 100-105, 2010.

ZIELIŃSKA, D.; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: Review. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-15, 2018.

ZUIDAM, N.J.; VELIKOV, K.P. Choosing the right delivery systems for functional ingredients in foods: an industrial perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 21, p. 15-25, 2018.



## CAPÍTULO 2 –

\* Este Artigo será submetido na revista **International Journal of Food Science & Technology – Wiley**.

\*Parte do estudo deste capítulo foi apresentado como resumo em evento científico (Anexo A).

## **Replacement of milk by block freeze concentrated whey in the physicochemical and rheological properties of ice cream**

Eulália Lopes da Silva Barros<sup>a</sup>, Callebe Camelo Silva<sup>a</sup>, Maria Helena Machado Canella<sup>b</sup>, Amanda Alves Prestes<sup>a</sup>, Maryella Osório Vargas<sup>b</sup>, Silvani Verruck<sup>b</sup>, Bruna Marchesan Maran<sup>a</sup>, Elane Schwinden Prudencio<sup>a,b\*</sup>.

<sup>a</sup>Department of Chemistry and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Technological Center, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Agricultural Science Center, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

\* Corresponding author: +55 48 3721 5366 (E.S. Prudêncio)

E-mail adress:elane.prudencio@ufsc.br

## ABSTRACT

This study aimed to use different proportions of concentrated whey by block freeze concentration in the elaboration of an ice cream and the characterization of their physical, chemical and rheological properties. Five formulations of ice cream elaborated with 0, 25, 50, 75 and 100% of freeze concentrate whey (CW) were developed. It was observed that the addition of concentrated whey increased total solids content, acidity and decreased pH values. All ice creams exhibited Newtonian flow behaviors. The Power and Casson Law model adequately explained the flow properties. The viscosity and hysteresis area increased as CW was added. The formulations containing milk showed higher brightness, negative values of  $a^*$  and positive values of  $b^*$  indicate that the ice creams were considered greenish yellow, characteristic of whey presence. The values found for the overrun were in the range of 27 to 44% ( $p > 0.05$ ). The ice cream with partial substitution of milk by concentrated whey showed a higher melt resistance. The addition of concentrated whey did not influence the size of ice crystals, fat globules and air bubble diameters. The higher total solids content resulted in smoother and creamy ice creams. These results highlight the application of concentrate whey on the 50% substitution level.

**Keywords:** Ice cream, Whey, Freeze Concentration, Physical properties

## 1 INTRODUCTION

The use of secondary products such as whey has been increasingly studied because is a cheap and available product. The proteins from whey confer improvement in some properties, such as helping in the emulsification, foaming and stability of food (Silva & Boline 2006). The high content of organic matter present in whey is responsible for causing serious pollution problems, especially when improperly discarded (Yadav *et al.*, 2015). By studying the technological whey properties, new ways of using this product can be developed (Masotti *et al.*, 2017). Using advanced technologies such as block freeze concentration can be the solution to the problem of whey management, aiming to add value and reduce the volume and disposal costs. According to Sánchez, *et al.* (2011a), this technology is capable of concentrating liquids by freezing and removing part of the water without causing damage to thermally sensitive compounds. The process is based on recover a food solute by the separation of pure ice crystals from a freezing concentrated aqueous phase. In addition, Sánchez, *et al.* (2011a) highlights that the operating cost of the block freeze concentration process is three times cheaper compared to other processes such as evaporation or reverse osmosis, considering costs, cleaning and energy. The freeze concentrated has already been applied to whey (Chabarov & Aider, 2014; Sánchez *et al.*, 2011a; Canella *et al.*, 2018), however, no replacement of milk by concentrated whey was reported in ice cream until now.

The ice cream consists in a food complex system, consisting of a frozen matrix containing air bubbles, fat globules, ice crystals, and an unfrozen whey phase. Can be considered a nutritious food due to the presence of milk or other ingredients in its formulation, which represents a source of protein, vitamins, and minerals due, mostly, of the milk presence (Bahram-Parvar *et al.*, 2015). It has a significant market, because pleases many consumers, but the acceptance depends greatly on its quality, flavor and texture. Chemical and physical properties are essential to the structure of ice cream and differ depending on formulation and processing conditions (Balthazar *et al.*, 2017a). These structural attributes and the composition are the key of ice cream behavior (Muse & Hartel, 2004). Preparation of ice cream with added whey can be performed aiming an improvement in structural properties, such as improving viscosity, emulsification and stability as well as reducing product costs by replacing milk with whey.

This study aimed to investigate the potential use of concentrated whey as a milk substitute in the preparation of ice creams, as well to evaluate its influence on the physicochemical, color, rheological and microstructural properties.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 MATERIAL

Pasteurized whole milk (Holandês®, Papenborg Laticínios, Biguaçu-SC, Brazil) with 12.03 g/100g of total solids, 3.35 g/100g of lipids, 3.15 g/100g of protein, 0.78 g/100g of ash, and 4.75 g/100g of carbohydrate and commercial rennet, a chymosin produced by *Aspergillus niger* var. *awamorii* (with a force of 1: 3000, Ha La®, CHR HANSEN, Valinhos, Brazil) were used for obtaining the cheese whey. The ice creams were elaborated using as ingredients: pasteurized whole milk (Holandês®, Papenborg Laticínios, Biguaçu-SC, Brazil), fresh milk cream (45g/100g of fat, Tirol, Treze Tílias, Brazil), sodium chloride (Cristalino®, Ciasal Indústria Salineira, Areia Branca, Brazil), and sucrose (Camil Alimentos, São Paulo, Brazil). All reagents used were of analytical grade.

### 2.2 CHEESE WHEY MANUFACTURE

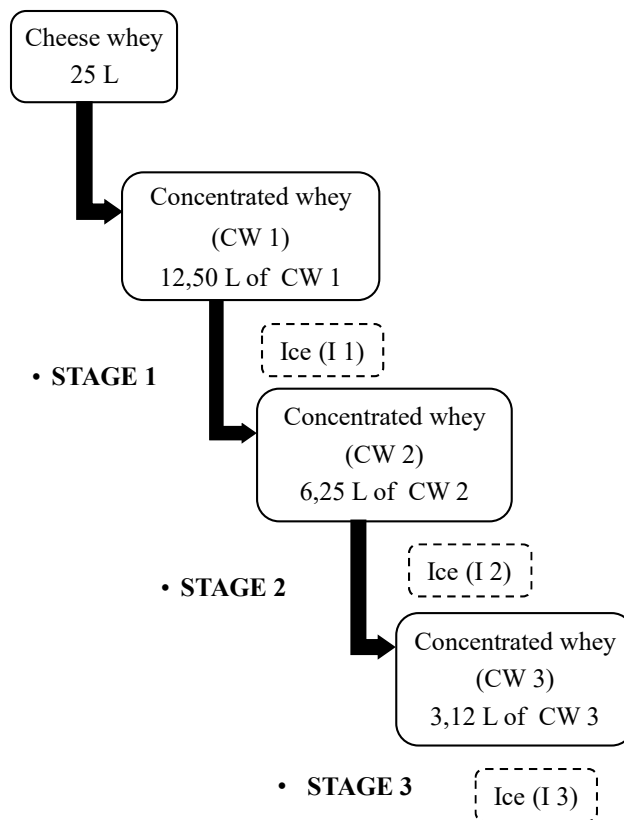
The whey was obtained by the manufacture of a Minas Frescal cheese. The cheese was prepared using a 30 L container of pasteurized whole milk heated to  $37 \pm 1$  °C, sequentially was added a commercial rennet in a concentration of 0,9 mL/L and incubated at  $37 \pm 1$  °C for 40 minutes. The resulting gel was cut, drained, and placed in perforated cylindrical packages with a capacity of 500g each, in view of maximum whey release. The cheese whey obtained was filtered and frozen at  $-20 \pm 1$  °C until the freeze concentration process.

### 2.3 PROTOCOL OF CHEESE WHEY FREEZE CONCENTRATION PROCESS

The block freeze concentration method was used for the whey concentration, according to the methodology described by Canella *et al.* (2018). At each stage of the block freeze concentration process, two fractions, named freeze concentrated whey (CW) and ice (I) were obtained (Fig. 2.1). Initially a 25 L volume of whey was distributed in portions of approximately 200 mL, which were subjected to freezing  $-20 \pm 2$  °C (Electrolux, FE 18, São Carlos, Brazil). In the first stage, 50% of the frozen volume was initially thawed at controlled

temperature ( $20 \pm 2$  °C). This thawed freeze concentrated fraction consisted in the first freeze concentrated stage (CW1), the same procedure was repeated, which again was frozen at  $-20 \pm 2$  °C and used as feeding in the second stage. The process occurs until the third stage of freeze concentration. A portion of each freeze concentrate and ice fractions of the freeze concentration process stages were stored at  $-20 \pm 2$  °C for further analysis.

Figure 2.1- Block freeze concentration process of cheese whey.



## 2.4 TOTAL SOLIDS CONTENT

For calculations of concentration factor and process efficiency, the whey concentrates (CW1, CW2, and CW3), and ices (I1, I2, and I3) were evaluated in relation to the total solids content (g/100g). The analysis was performed by drying the samples at  $105 \pm 1$  °C until constant weight, as described in IDF (IDF, 2013).

## 2.5 CONCENTRATION FACTOR

The concentration factor (CF) was calculated for each stage of freeze concentration, according to methodology presented by Aider & Ounis (2012), using Eq. (1):

$$CF (\%) = \frac{TS_{wc}}{TS_0} \times 100 \quad (1)$$

where,  $TS_{wc}$  is the total solids content (g/100g) of the concentrate whey at each stage of freeze concentration and  $TS_0$  is the total solids content (g/100g) of the initial cheese whey.

## 2.6 PROCESS EFFICIENCY

The process efficiency (PE) of freeze concentration was calculated by the following equation (Eq. 2):

$$PE (\%) = \frac{TS_C - TS_G}{TS_C} \times 100 \quad (2)$$

where, it was determined by the increase in total solids content (TS) in the concentrated ( $TS_C$ ) (g/100g) in relation to the total solids content (TS) remaining in the ice ( $TS_G$ ) (g/100g) of each stage of the freeze concentration process.

The concentrated whey used in the preparation of the ice creams was chosen from the evaluated results of the process efficiency (PE) and the concentration factor (CF).

## 2.7 VALIDATION OF EXPERIMENTAL RESULTS

To evaluate the experimental results the mass balance was calculated, following the methodology described by Sánchez *et al.* (2011b). It was made a comparison between the mass balance and the theoretical data by calculation of the predicted ice mass ratio ( $W_{pred}$ ) (kg of ice per kg of cheese whey), according to Eq. (3).

$$W(pred) = \frac{TS_{Si} - TS_{cw}}{TS_I - TS_{cw}} \quad (3)$$

where,  $TS_{Si}$  is the initial content of total solids (g/100g) of whey,  $TS_{CW}$  the content total solids (g/100g) of concentrated whey (CW) and  $TS_I$  is the total solids content of the ice fraction (I).

The deviation between experimental and theoretical data was expressed as root mean square (RMS) deviation, using Eq. (4).

$$\text{RMS (\%)} = \sqrt{\frac{(W_{EXP} - W_{pred}/W_{EXP})^2}{N}} \times 100 \quad (4)$$

where  $W_{exp}$  and  $W_{pred}$  represent the experimental and predicted proportions from the mass of ice, respectively, while  $N$  is the number of repetitions performed.

## 2.8 ICE CREAM ELABORATION

Five formulations of ice creams were elaborated according to methodology described by Silva *et al.* (2015), with modifications. The ice cream denominated ice cream 1 is the control sample, prepared with pasteurized milk, and the ice cream denominated ice cream 2, ice cream 3, ice cream 4, and ice cream 5 were prepared with different proportion of concentrate whey. The ingredients used in the composition of ice creams were described in Table 2.1. The ingredients of each ice creams were mixed and subjected to heat treatment for 30 minutes at  $70 \pm 1$  °C, posteriorly were cooled and taken to the ice cream maker (Cuisinart ICE 21, New Jersey, USA), where they went through the process of beating and freezing. Finally, the ice creams were stored at  $-20 \pm 2$  °C until analysis. All formulation of ice creams were produced in triplicate.

Table 2.1- Ice cream composition

Sample	Concentrated milk whey g/100g	Pasteurized milk g/100g	Fresh milk cream g/100g	Sodium Chloride g/100g	Sucrose g/100g
Ice cream 1	-	280	72.8	0.28	100.8
Ice cream 2	280	-	72.8	0.28	100.8
Ice cream 3	70	210	72.8	0.28	100.8
Ice cream 4	140	140	72.8	0.28	100.8
Ice cream 5	210	70	72.8	0.28	100.8



## 2.9 ICE CREAM ANALYSIS

### 2.9.1 Physicochemical analysis

The ice creams samples (1, 2, 3, 4 and 5) were analyzed for their physicochemical characteristics. The acidity were determined according to AOAC (AOAC, 2019), total solids as described in IDF (IDF, 2013), and the pH was determined using pHmeter (PHS-3 BW, BEL, Piracicaba, São Paulo, Brazil).

### 2.9.2 Overrun

The incorporation of air of the ice cream samples was determined according to the methodology described by Pinto *et al.* (2012). A certain amount of ice cream syrup mass ( $S_{ic}$ ) and other amount of mass of frozen ice cream ( $F_{ic}$ ) were weighed and the excess was calculated using Eq. 5. The analysis was performed in duplicate.

$$Overrun (\%) = \frac{(S_{ic} - F_{ic})}{F_{ic}} \times 100 \quad (5)$$

### 2.9.3 Melting behavior

The melting behavior was measured as proposed by Silva *et al.* (2015), with some modifications. In one week of frozen storage, 50 g of the ice cream samples were left to melt at  $25 \pm 1$  °C on a 2.0 mm wire mesh screen over a graduated cylinder. The dripped volume was recorded every 5 min. The time (min) was plotted against the melted mass (g), aiming at obtaining a sigmoidal curve representing the kinetics of the melting process. The slope of the curve was taken as the melting rate (g / min). The analysis was performed in triplicate.

### 2.9.4 Color analysis

The color analysis of ice cream samples was determined using colorimeter (Minolta Chroma Meter CR-400, Osaka, Japan), adjusted to operate with illuminant D65 and angle of observation of 10 °, previously calibrated. The total color difference ( $\Delta E^*$ ) between the measured values in the control ice cream (ice cream 1) in relation to ice creams (2, 3, 4 and 5) was calculated as described by (Okpala, Piggott & Schaschke 2010). The CIELab color scale

was used to calculate the parameters  $L^*$ ,  $b^*$  and  $a^*$ , which  $L^*$  is the brightness of the ice cream (scale 1–100), chromatic parameter  $a^*$  is the red and green balance, chromatic parameter  $b^*$  is the yellow and blue balance. The analysis was performed in triplicate.

### 2.9.5 Distribution of ice crystals, air bubbles size and fat particle

The distribution of ice crystals, air bubbles size and fat particles were assessed at  $-4$  °C by optical light microscopy (AXIO Image. A2m, Carl Zeiss, Germany) using  $50\times$  magnification, according to Balthazar *et al.* (2017b). The samples were moved directly from the freezer to the glove box ( $-4$  °C) for preparation. A drop of chilled kerosene was added to aid in dispersing the ice crystals and to increase the resolution of the generated image. Ice crystals, fat particles and air bubbles images were captured by a digital camera (AxioCamMRc 5, Zeiss, Germany) and edited using the AXIO Vision Rel. 4.8 software (Microscope Software AxioVision LE, Zeiss, Germany). For each sample, 20 structures were measured ( $\mu\text{m}$ ) in 10 microscope spots.

### 2.9.6 Texture parameters

The texture of the ice creams samples were evaluated using a texturometer TA.HD.plusTexture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, Inited Kingdom) accompanied by the Exponent program version 6.1.1.0 (Stable Micro Systems, Godalming, Inited Kingdom). The samples were maintained in temperature of  $-20 \pm 2$  °C during the time of analysis. For each sample, five measures were realized and the following parameters were employed: test speed of 2.0 mm/s; distance of 10.0 mm; height of 20 mm and a proof body (probe) of aluminum of 490 mm. From the TPA curve they were obtained the following parameters: firmness (N) and adhesiveness (N.s).

### 2.9.7 Rheological measures

The ice creams samples were submitted to the rheological measures using a concentric cylinder rotational rheometer (Brookfield Engineering Laboratories model DV-III Ultra, Stoughton, MA, USA) with spindle ULA, and were collected through the Rheocalc<sup>®</sup> 32 software version 3.2 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA). The rheometer was thermostatically controlled by a circulating water bath (TECNAL model TE-184, São Paulo, Brazil) at  $4.0 \pm 0.1$  °C, to ensure temperature stability the samples were allowed

to stand for 10 min. The flow and viscosity curves were generated by the linear increase of the strain rate from  $125 \text{ s}^{-1}$  to  $269 \text{ s}^{-1}$  in the first 4 minutes (upward curve) and returned to  $125 \text{ s}^{-1}$  in the following 4 minutes (downward curve). The speed of rotation was increased from 1 rpm to 130 rpm, increasing 1 rpm each 2 s. The flow behavior was explained through the Power Law and the Casson model, according to Equations 6 and 7 respectively:

$$\sigma = K (\dot{\gamma})^n \quad (6)$$

$$\sigma^{0.5} = \sigma_0^{0.5} + (\eta_c \dot{\gamma})^{0.5} \quad (7)$$

where,  $\sigma$  is the shear stress (Pa),  $\dot{\gamma}$  is the strain rate ( $\text{s}^{-1}$ ),  $K$  is the Consistency index ( $\text{Pa s}^{-1}$ ),  $n$  is the flow behavior index,  $\sigma_0$  is yield limit (Pa) and  $\eta_c$  is the Casson viscosity (Pa s). The behavior of the samples was evaluated by hysteresis area calculation between the upward and downward flow curves.

## 2.10 STATISTICAL ANALYSIS

The results were expressed as mean and standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test ( $P < 0.05$ ) were used to determine the significant differences between the samples. The validity of the Power Law and Casson models were evaluated based on the coefficient of determination ( $R^2$ ). The data were obtained using STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 BLOCK FREEZE CONCENTRATION PROCESS

The Table 2.2 shows the performance of the block freeze concentration process obtained from the total solids content of the concentrates and ice fractions. An increase ( $P < 0.05$ ) of the concentration factor (CF) was observed according to the evolution of the freeze concentration stages. This result is expected since the CF is directly related to the total solids content, increasing the value as the total solids increase. Canella *et al.* (2019a), Muñoz *et al.* (2019), Aider, Halleux & Akbache, (2007) observed similar behavior in the freeze

concentration of skim goat milk, skim milk and whey, respectively. Regarding the process efficiency (PE), there was a decrease ( $P < 0.05$ ) in the value with the evolution of the freeze concentration stages, noting that the PE depends directly on the total solids content in the ice fraction. As the total solids content retained in the ice fraction increases the process efficiency decreases. Canella *et al.* (2019a), Aider, Halleux & Melnikova (2009), Balde & Aider (2016) observed similar performance during the block freeze concentration process of skim goat milk, whey and skim milk, respectively.

For the validation of the results of the freeze concentration process, the comparison of the mass balance data, theoretical and experimental data showed a good agreement (Fig. 2.2). The root mean square deviation defined the deviation between theoretical and experimental assumptions. A good process adjustment was observed, where the RSME (%) values ranged from 2.97% to 19.04%. All values were below 25%, showing an acceptable fit, as described by Canella *et al.* (2019b), Petzold *et al.* (2015), Belén *et al.* (2012) and Hernández *et al.* (2010) who also observed similar results to those presented in this study.

Table 2.2- Total whey solids, concentrated whey (CW) and ice fractions (I) of each freeze concentrated stage and the concentration factor (CF) and process efficiency (PE) in relation to the total solids content.

		Total solids (g /100 g)	CF (%)	PE (%)
Whey		6.55 ± 0.06 <sup>dB</sup>	-	-
Stage 1	CW1	11.29 ± 0.09 <sup>c</sup>	172.28 ± 3.09*	93.35 ± 0.26 <sup>♦</sup>
	I1	0.75 ± 0.02 <sup>D</sup>	-	-
Stage 2	CW2	18.61 ± 1.26 <sup>b</sup>	284.04 ± 21.91 <sup>♦</sup>	92.65 ± 0.90 <sup>♦</sup>
	I2	1.37 ± 0.04 <sup>C</sup>	-	-
Stage 3	CW3	29.02 ± 1.06 <sup>a</sup>	442.77 ± 19.90 <sup>+</sup>	68.53 ± 2.72*
	I3	9.12 ± 0.56 <sup>A</sup>	-	-

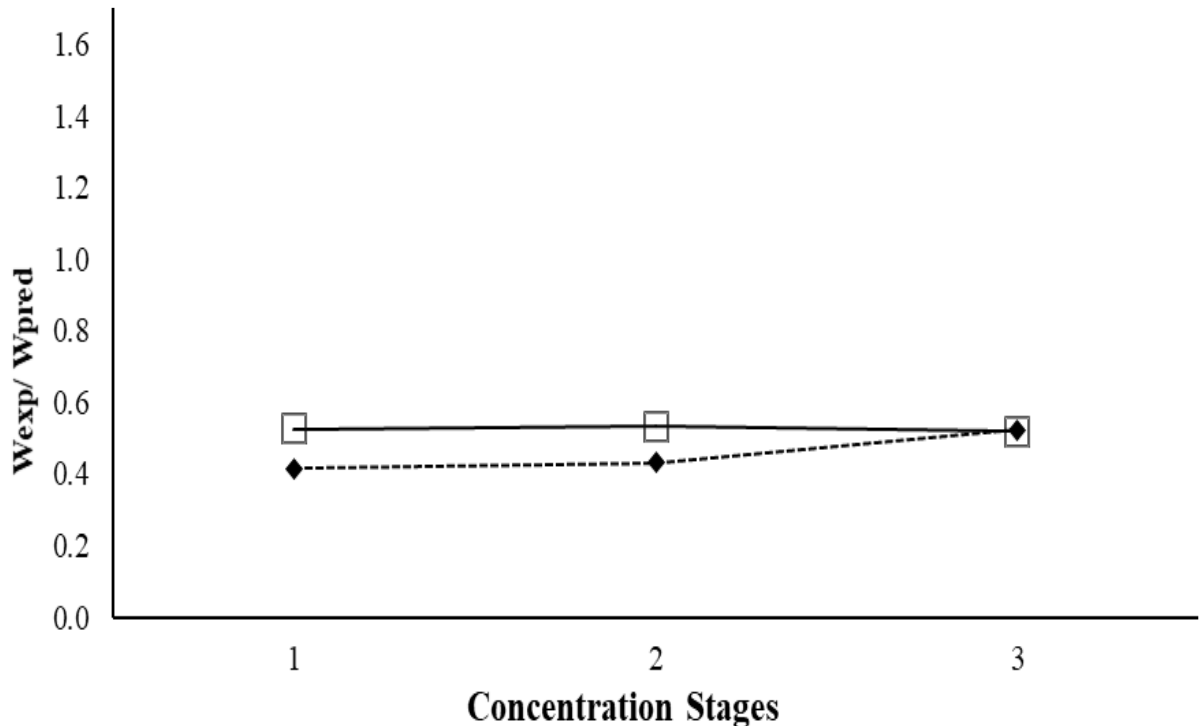
Results expressed as mean ± standard deviation, among three batches performed in triplicate for each freeze concentrated stage, with three replications for total solids, CF and PE.

<sup>a,b,c</sup> For the same column, means ± standard deviations with different superscript lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between whey and CW at each freeze concentrated stage.

<sup>A,B,C</sup> For the same column, means ± standard deviations with different superscript capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between whey and the I of each freeze concentrated stage.

<sup>\*\*♦</sup> In the same column, means ± standard deviations with different symbols indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) in CF and PE of each freeze concentrated stage.

Figure 2.2- Experimental ( $\square$ ) and theoretical ( $-\blacklozenge-$ ) results of ice mass as a function of freeze concentration stages.



Based on these results, the freeze concentrate whey of the second stage (CW 2) was used in ice creams preparation.

### 3.2 ICE CREAM ANALYSIS

The results of the physicochemical parameters of the ice creams are presented in the Table 2.3. It was observed that the total solids content of ice creams increased ( $P < 0.05$ ) with the increase of concentrate whey in the ice cream formulations. Canella *et al.* (2018) obtained similar results in their symbiotic fermented milk drink elaborated with block freeze concentrated whey.

The ice creams showed a decrease in pH and an increase in titratable acidity with the addition of concentrate whey, being that ice cream 2 presented higher acidity and lower pH value. As noted by Canella *et al.* (2019b) in the freeze concentration process, the high concentration of total solids improved the high inclusion of proteins. According to Rodrigues *et al.* (2011), high amounts of protein have the ability to increase buffering in dairy products and cause variations in acidity and pH.

The overrun expresses the expansion of ice cream resulting of the air incorporation. According to Balthazar *et al.* (2017b) air incorporation is a very important physical feature that affects ice cream quality and interferes in texture, softness and stability. Karaca *et al.* (2009) observed that this physical parameter may vary according to different elaboration procedures and ingredients of an ice cream. The air incorporation results obtained in this study are presented in the (Table 2.3). The ice creams (3, 4 and 5) presented the highest values of overrun. Besides, there were no significant difference on overrun values between the ice cream 1 and ice cream 2. In general, low levels of air incorporation are observed in the samples of this study and this could be attributed to the low amount of partially coalesced fat globules that failed to prevent air loss or the poor foaming ability of whey. Levin, *et al.* (2016) reported that the formation of foam directly influences ice creams aeration. Rossa *et al.* (2012) highlighted that milk proteins in ice cream mixtures are known to emulsify fat and may contribute to partial coalescence and fat structure formation. However, Barfod *et al.*(1991) and Schmidt, (2004) stated that changes in these emulsification capacities such as amphiphilic properties can alter the interactions between components in the cell-air interfaces of the ice cream mixture and result in different values of overrun. As suggested by Bahram-Parvar & Goff, (2013) and Bahram-Parvar *et al.* (2015) the reduction in air incorporation is also correlated with increases in formulation viscosities of the ice cream. The high viscosity does not favor the foaming formation. Relkin & Sourdet (2005) reported that the whey proteins present, in their denatured state, interact with themselves and casein micelles, increasing the viscosity of the ice cream formulations. The overrun values found in this study are in accordance with the acceptable range for traditional ice creams and were similar to the results observed by Kurt & Atalar, (2018) for quince seed ice cream.

Table 2.3- Physical and chemical parameters of the ice creams.

	Ice cream 1	Ice cream 2	Ice cream 3	Ice cream 4	Ice cream 5
Total solids (g/ 100 g)	34.75 ± 0.37 <sup>c</sup>	40.82 ± 0.36 <sup>a</sup>	34.59 ± 1.10 <sup>c</sup>	36.98 ± 0.00 <sup>b</sup>	40.38 ± 1.52 <sup>a</sup>
Titratable acidity (g /100 g)	0.17 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.39 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>b</sup>
pH	6.73 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.49 ± 0.01 <sup>e</sup>	6.65 ± 0.01 <sup>b</sup>	6.59 ± 0.01 <sup>c</sup>	6.53 ± 0.01 <sup>d</sup>
Overrun	27.49 ± 1.60 <sup>b</sup>	27.28 ± 2.18 <sup>b</sup>	42.30 ± 0.65 <sup>a</sup>	43.85 ± 2.51 <sup>a</sup>	33.51 ± 6.85 <sup>ab</sup>
L*	86.38 ± 1.37 <sup>a</sup>	82.45 ± 0.52 <sup>b</sup>	86.14 ± 0.04 <sup>a</sup>	86.85 ± 0.90 <sup>a</sup>	87.65 ± 0.94 <sup>a</sup>
b*	14.49 ± 0.26 <sup>c</sup>	17.65 ± 0.31 <sup>a</sup>	16.27 ± 0.63 <sup>b</sup>	17.78 ± 0.42 <sup>a</sup>	18.02 ± 0.44 <sup>a</sup>
a*	-3.34 ± 0.11 <sup>a</sup>	-4.32 ± 0.15 <sup>d</sup>	-3.67 ± 0.14 <sup>b</sup>	-3.98 ± 0.17 <sup>c</sup>	-4.05 ± 0.10 <sup>c</sup>
ΔE*	-	4.84 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.84 <sup>c</sup>	3.45 ± 0.33 <sup>b</sup>	3.94 ± 0.48 <sup>b</sup>

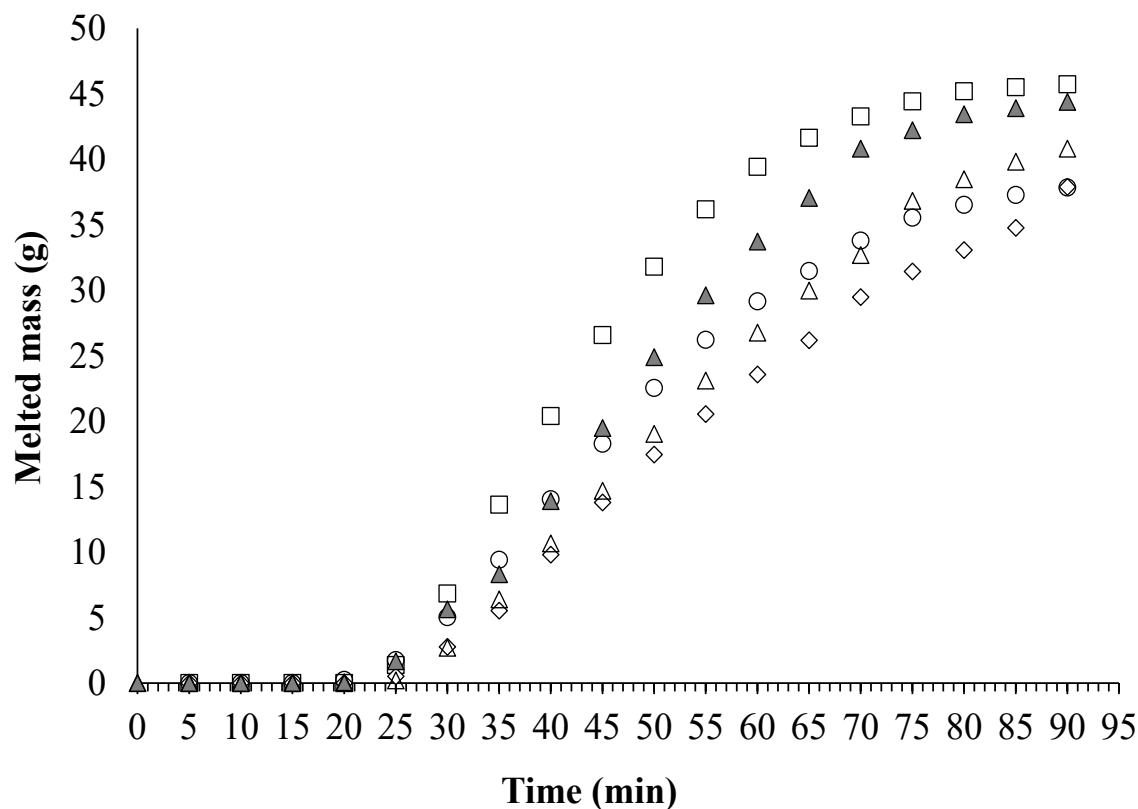
<sup>a,b,c</sup> Within a line, means ± standard deviations with different superscript lowercase letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between the ice creams samples. Ice cream 1: ice cream produced with pasteurized whole milk. Ice cream 2: ice cream produced with freeze concentrated whey. Ice cream 3: ice cream produced with 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk. Ice cream 4: ice cream produced with 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk. Ice cream 5: ice cream produced with 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk.

In addition to air incorporation, melting characteristics are important ice cream quality parameters (Erkaya, Dagdemir & Sengul, 2012). The Fig. 2.3 shows the evolution of the melted ice cream mass over time, in the form of sigmoidal curves. The control ice cream (ice cream 1) lost its shape faster than the ice creams elaborated with concentrate whey (3, 4 and 5), which retained his original shape longer. As reported by Kirtil & Oztop (2016) and Ritzoulis *et al.* (2014) this effect was probably a result of the total solids content of milk whey and consequently of the protein content present, since proteins delay melting of ice cream due to its emulsifying property. It was observed that ice cream 2 showed similar behavior to control ice cream (ice cream 1), which is explained by their amount of air incorporated. According to Balthazar *et al.* (2018) overrun is important in determining the melting rate. The ice creams that exhibit low overrun also have a lower melting rate. In addition, Akbari *et al.* (2016) observed that the fat globules could clustered stabilizing the air bubbles in the ice cream structure and consequently decreased melting rate.

Pathare, Opara & Al-Said, (2013) affirmed that the color parameters have an important influence on product quality and consumers' food choices. The values for the color parameters in are presented in Table 2.3. The ice cream 2 presented the lower ( $P < 0.05$ ) whiteness between the samples, once the presence of milk contributes to an increase in the whiteness of the ice creams. As reported by Scarso, *et al.* (2017) the presence of tiny fat globules together with colloidal casein particles and calcium phosphate are responsible for the white color of milk. Negative values of  $a^*$  and positives values of  $b^*$  indicate that the ice creams have a tendency to green and yellow color, respectively. However, the highest intensity of green and yellow color was observed in the ice creams with concentrate whey addition. This is consistent with the literature, according Yadav *et al.* (2015) whey is considered a greenish yellow liquid. According to the values of the total color difference ( $\Delta E^*$ ), the ice creams with the higher addition of concentrated whey were more affected. The replacement of milk by whey in 50, 75 and 100% were visible to the human eye. According to Martínez-Cervera *et al.* (2011), the total color difference ( $\Delta E^*$ ) values can be visually perceived by the human eye when the values were greater than 3.

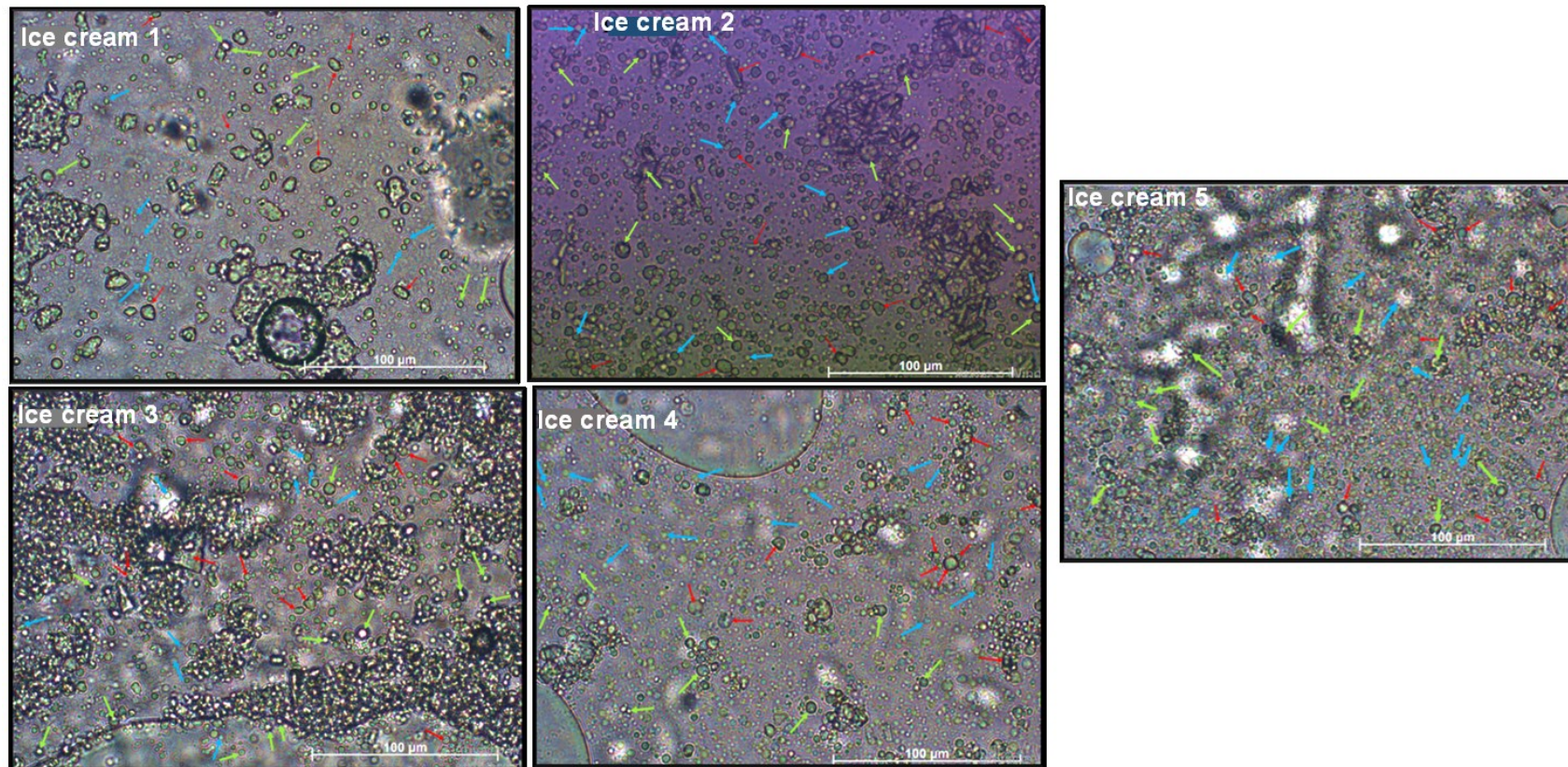


Figure 2.3- Melting behavior of ice cream produced with pasteurized whole milk (Ice cream 1) ( $\blacktriangle$ ); freeze concentrated whey – Ice cream 2 ( $\circ$ ); 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk - Ice cream 3 ( $\blacktriangle$ ); 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk - Ice cream 4 ( $\diamond$ ) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk - Ice cream 5 ( $\square$ ).



The distribution of fat globules after freezing is another very important structural feature in ice cream (Goff & Hartel, 2013). Fig. 2.4 shows the structure of the ice creams observed by the direct microscopy method. It was verified that the addition of concentrate whey exerted changes in the ice cream structures, however were not of great impact. Fat globule size ranged from  $1.60 \pm 0.42$  (ice cream 1) to  $2.29 \pm 0.46$   $\mu\text{m}$  (ice cream 2) showing no significant difference ( $P < 0.05$ ) between ice creams. According to Wildmoser, *et al.* (2004), fat may influence saturation, due to the aggregation induced by the presence of air bubbles when the size of fat globules is larger than 2  $\mu\text{m}$ . Goff & Jordan (1989), stated that the addition of whey increases the viscosity of the mixture and influences the destabilization of fat in frozen ice cream.

Figure 2.4- Structure of ice creams containing: pasteurized whole milk (Ice cream 1), freeze concentrated whey (Ice cream 2), 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk (Ice cream 3), 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk (Ice cream 4) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk (Ice cream 5) observed by direct microscopy method (50 ×). Air bubble (→), ice crystal (→) and fat globules (→).



The size distribution of ice crystals (Fig. 2.4) is another very important aspect for ice cream quality, reflecting directly on its textual properties. All ice creams samples presented similar average ice crystal sizes ( $<50 \mu\text{m}^2$ ). According Goff & Hartel (2013), most crystals must be bottom than  $50 \mu\text{m}$  in size, as ice creams with ice crystals greater than  $100 \mu\text{m}$  can cause consumer rejection as it has rough and coarse sensory aspect. Kozlowicz *et al.* (2019) stated that the amount of total solids is another factor that can have a major impact on the growth and quantity of ice crystals, the scarcity of total solids leads to the increase of ice crystals. Thus, it suggests that the addition of concentrate whey did not influence ( $P < 0.05$ ) the size of the ice crystals.

The mean air bubbles diameter ranged from  $2.58 \pm 0.59 \mu\text{m}$  (ice cream 1) to  $3.78 \pm 0.68 \mu\text{m}$  (ice cream 2). Thus, the addition of freeze concentrate whey did not influence the air bubble diameter ( $P < 0.05$ ). Fat may have played a role around air bubbles along with whey proteins present, separating air cells and preventing coalescence, as noted by Chang & Hartel, (2002). According Warren & Hartel, (2014) air bubbles are important as they help to prevent shrinkage in ice creams, since that their size associated with global stability of foam may affect ice cream structure.

Table 2.4 presents the firmness and adhesiveness results of the ice creams samples. Regarding the firmness attribute, the control sample (ice cream 1) appeared more firmer, differing from the other ice creams containing freeze concentrate whey ( $P < 0.05$ ). It is important to highlight that the ice cream elaborate only with concentrate whey (ice cream 2) was the one that presented the lowest firmness ( $P < 0.05$ ). The addition of concentrate whey had an effect on the firmness of the ice cream, which decreased with the addition of concentrate whey. This behavior is related to the increase in total solids content. The higher the total solids content, less water to be frozen causing a smoother and creamy texture, a firmer ice cream and with a higher nutritional value. Turnbow *et al.* (1947) and Bodyfelt *et al.* (1988) obtained similar results in their study. These differences in firmness may also be related to whey proteins, since, according to Ruger *et al.* (2002), the water retention properties of whey proteins may prevent the increasing ice phase volume of the ice cream and improving the texture.

Table 2.4- Firmness and adhesiveness analysis of the ice creams.

Sample	Firmness (N)	Adhesiveness (N.s)
Ice cream 1	33.36 ± 1.10 <sup>a</sup>	-8.03 ± 0.85 <sup>b</sup>
Ice cream 2	1.47 ± 0.10 <sup>c</sup>	-1.42 ± 0.40 <sup>a</sup>
Ice cream 3	7.15 ± 2.68 <sup>b</sup>	-2.64 ± 0.53 <sup>a</sup>
Ice cream 4	8.16 ± 1.30 <sup>b</sup>	-1.81 ± 0.32 <sup>a</sup>
Ice cream 5	7.06 ± 0.27 <sup>b</sup>	-2.31 ± 0.60 <sup>a</sup>

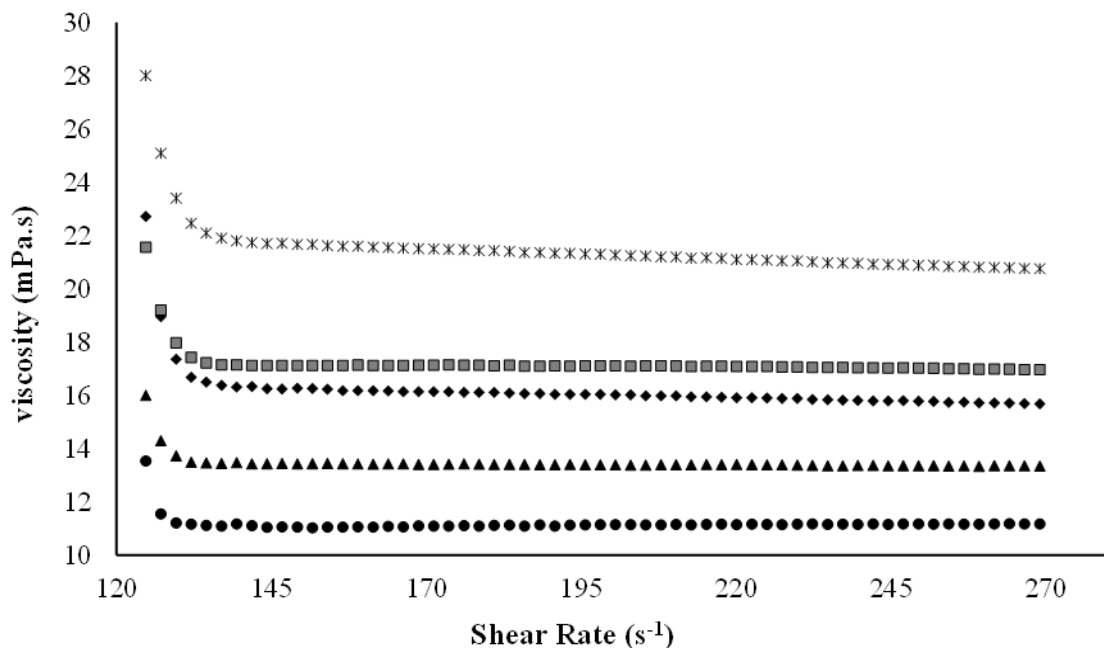
<sup>a,b,c</sup> For the same column, means ± standard deviations with different superscript lowercase letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between the ice creams samples. Ice cream 1: ice cream produced with pasteurized whole milk. Ice cream 2: ice cream produced with freeze concentrated whey. Ice cream 3: ice cream produced with 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk. Ice cream 4: ice cream produced with 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk. Ice cream 5: ice cream produced with 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk.

Adhesiveness in ice creams is the force that binds the tongue and the palate. The addition of freeze concentrate whey also contributed to ice creams with higher values ( $P < 0.05$ ) of adhesiveness. It is believed that the total solids content had a positive influence on the adhesiveness increase. This behavior is in agreement with Kozłowicz *et al.* (2019), who also observed a correlation between the adhesiveness and the total solids content in ice cream with addition of zinc ions. Prindiville *et al.* (2000) also suggested this behavior occurs because the whey proteins may have simulated the role of fat with regarding the texture of the ice creams, this is attributed to their ability to interact with water, proteins and flavor compounds. The increasing in the viscosities of ice creams also contribute to greater adhesiveness.

The results of the rheological parameters of the ice creams (1, 2, 3, 4 and 5) are presented in Table 2.5. It can be observed that the addition of freeze concentrate whey ( $P < 0.05$ ) significantly affected the rheological behavior of the ice creams, improving the viscosity (Fig. 2.5). It was observed that the viscosity of the ice creams samples remained constant with increasing strain rate, indicating a Newtonian fluid behavior (Fig. 2.5). The ice creams added with freeze concentrate whey showed higher viscosity than the control ice cream, being higher the viscosity with addition of whey. This behavior occurs due to the higher total solids content of samples added with concentrate whey. Besides that, according to Goff & Hartel (2013) and Pinto *et al.* (2012) conditions such as processing and temperature may increase the viscosity of ice creams mixtures. Rossa *et al.* (2012) noted that whey protein thermally unfolds in the ice cream mixture and leads to the

formation of protein polymers, which can behave like hard spheres, showing high flow resistance, thereby increasing the viscosity of the ice cream.

Figure 2.5- Effect of shear rate on viscosity of ice creams samples. Ice cream 1 (●) ice cream produced with pasteurized whole milk, freeze concentrated whey - Ice cream 2 (✱), 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk - Ice cream 3 (▲), 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk - Ice cream 4 (◆) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk - Ice cream 5 (■).



The power law model described well the flow behavior of ice cream with the high correlation coefficient (Table 2.5), being ( $n = 1$ ), confirming the Newtonian behavior, which means a linear relationship between strain rate and stress shear (Fig. 2.6). The consistency index value was indicative of the flow properties of the ice cream. It was observed that freeze concentrate whey increased the consistency index from ( $0.013 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ ) ice cream 1 to ( $0.035 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ ) ice cream 2, and consequently, increased the viscosity of ice creams, as, according to Karaca *et al.* (2009) the consistency index is based on shear rate variation and indicates the fluid viscosity. This behavior can be attributed to the increase in protein content which tends to increase consistency index and viscosity. According to Damodaran (1997), this may be attributed to the large dispersion of denatured protein colloidal particles and casein micelles in the structure of ice cream so different protein sources would impact at the consistency, as protein content increased

Table 2.5- Rheological parameters of the ice creams using the Power Law, Casson model and thixotropic index.

Sample	Power Law Model			Casson Model			Hysteresis
	K (Pa.s <sup>n</sup> )	<i>n</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	σ <sub>0</sub> (Pa)	η <sub>c</sub> (Pa s)	<i>R</i> <sup>2</sup>	
Ice cream 1	0.013 ± 0.003 <sup>c</sup>	0.991 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.994	0.003 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.012 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.998	2.875 ± 0.898 <sup>d</sup>
Ice cream 2	0.035 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.907 ± 0.029 <sup>a</sup>	0.996	0.035 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.018 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.998	28.268 ± 6.552 <sup>a</sup>
Ice cream 3	0.019 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.957 ± 0.048 <sup>a</sup>	0.994	0.004 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.013 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.999	1.034 ± 0.325 <sup>e</sup>
Ice cream 4	0.024 ± 0.004 <sup>ab</sup>	0.923 ± 0.034 <sup>a</sup>	0.996	0.009 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.014 ± 0.001 <sup>bc</sup>	0.998	14.321 ± 0.460 <sup>c</sup>
Ice cream 5	0.021 ± 0.005 <sup>bc</sup>	0.961 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.995	0.010 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.016 ± 0.001 <sup>ab</sup>	0.996	11.071 ± 2.322 <sup>b</sup>

Results expressed as means ± standard deviation, among three lots performed in triplicate for each ice cream sample, with three replications for each rheological parameter.

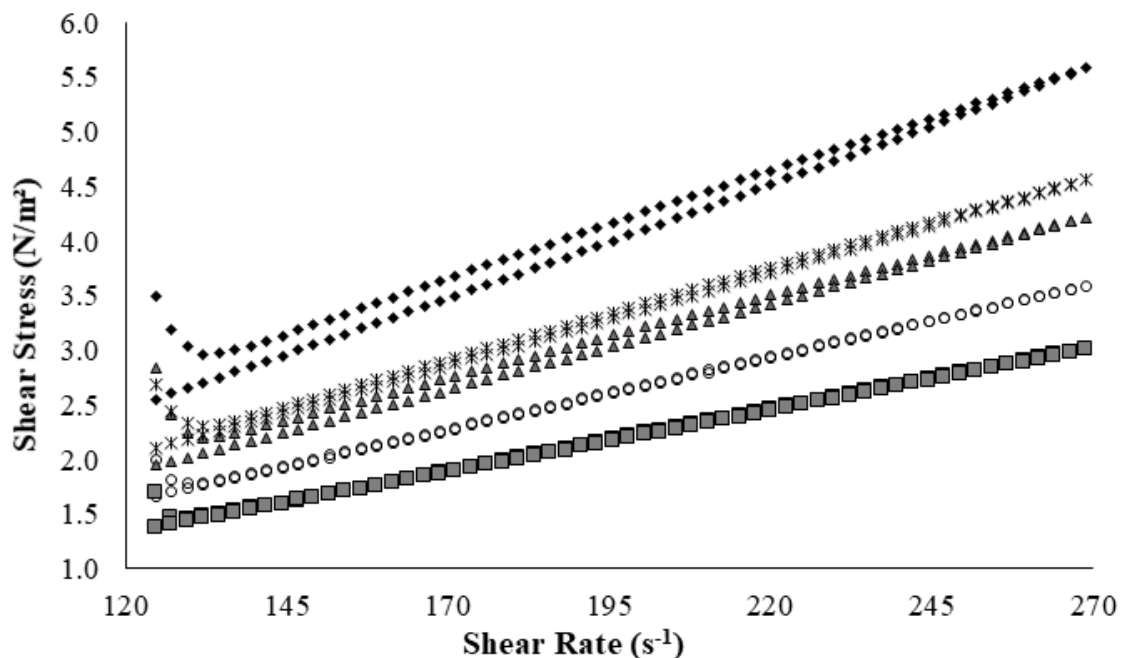
<sup>a,b,c</sup> For the same column, different superscript lowercase letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between the ice creams samples. Ice cream 1: ice cream produced with pasteurized whole milk. Ice cream 2: ice cream produced with freeze concentrated whey. Ice cream 3: ice cream produced with 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk. Ice cream 4: ice cream produced with 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk. Ice cream 5: ice cream produced with 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk.

K = consistency index; *n* = flow behavior index; *R*<sup>2</sup> = correlation coefficients; σ<sub>0</sub> = yield limit; η<sub>c</sub> = Casson viscosity.

Casson model was adjusted to calculate casson yield limit ( $\sigma_0$ ) and casson viscosity ( $\eta_c$ ) (Table 2.5). In general, all ice creams samples showed an increase in Casson yield limit. This behavior could occurs due to the increased viscosity of ice creams, caused by the water retention properties of whey proteins. Pinto *et al.* (2012) and Rezaei *et al.* (2011) observed similar results for frozen yogurts. Casson viscosity values were higher in ice creams added with concentrate whey, increasing with the addition of concentrate whey. This increase is associated with the higher total solids content of freeze concentrate whey ice creams samples. Pinto *et al.* (2012) obtained similar results in their frozen yogurts.

The hysteresis of ice creams (1, 2, 3, 4 and 5) are showed in the Fig. 2.6. The ice cream 2 presented a larger ( $P < 0.05$ ) (Table 2.5) hysteresis area, indicating a change in the system structure. According to Toneli *et al.* (2005) the formation of the hysteresis curve reflects changes in the rheological behavior of products. Rossa *et al.* (2012) observed that the samples with higher values of hysteresis needed more energy to break the ice cream structure formed from the protein polymerization, providing a firmer product. The same behavior was observed in this study for the freeze concentrate whey ice cream. The ice cream 2 was the sample that had the highest consistency index and highest viscosity and the largest hysteresis area ( $P < 0.05$ ), as shown in Fig. 2.6. According to Holdsworth (1993), this demonstrates a correlation with thixotropy. Hernández (1996) and Tárrega *et al.* (2004) state that a higher viscosity thixotropic fluid may show a larger hysteresis area than a lower viscosity fluid, even if this one suffers a breakdown of the less viscous product structure. The largest hysteresis area of ice cream added with concentrate whey is also related to the high amount of total solids, as shown in Table 2.3. Debon, Prudencio & Petrus (2010) and Mohameed *et al.* (2004) related the concentration of solids with changes in rheological properties of some food matrix. Rossa *et al.* (2012), González-Thomás *et al.* (2008) and Karaca *et al.* (2009) also observed the presence of hysteresis in studies with ice cream.

Figure 2.6- Flow curves, shear stress versus shear rate, for ice cream produced with pasteurized whole milk - Ice cream 1 (■), freeze concentrated whey - Ice cream 2 (◆), 25% of freeze concentrated whey and 75% of pasteurized whole milk - Ice cream 3 (○), 50% of freeze concentrated whey and 50% of pasteurized whole milk - Ice cream 4 (△) and 75% of freeze concentrated whey and 25% of pasteurized whole milk - Ice cream 5 (✱).



Finally, the results obtained in this study showed that the use of freeze concentrate whey in the preparation of ice creams is an attractive alternative for the food industry, once the ice cream is a product of expressive market that pleases several consumers and have significant nutritional qualities.

#### 4 CONCLUSION

The use of block freeze concentrated technology applied in the whey has contributed to an economical and natural ingredient with a high nutritional value that can be added in the ice cream preparation. The freeze concentrate whey of the second stage was chosen for the preparation of the ice cream. In general, all ice creams samples showed increase in total solids and in titratable acidity, and a decrease in pH values. Overrun ranged from 27 to 44% and were considered acceptable. Ice creams with replacements of concentrate whey retained their original shape longer. All the ice creams had crystal ice sizes, fat globules and diameter of air bubbles similar. The ice creams with milk as ingredient showed higher whiteness, while the ice creams with concentrate whey addition



presented higher tendency to yellow and greenish color. The Power Law and Casson models described well the flow of all ice creams, which presented behavior of Newtonian fluids. The addition of concentrated whey contributed to an increase in viscosity, consistency index and hysteresis area of ice creams. Therefore, it was observed that replacing 50% of whole milk with concentrate whey provides a better formulation, choosing ice cream 4 due to its higher overrun and better structure.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) by the financial support [CNPq, 405965/2016-8], and to CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Brazil - Finance Code 001) by the scholarship.

### **Conflict of interests**

Authors declare no conflict of interest.

### **REFERENCES**

- Aider, M., Halleux, D. & Melnikova, I. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**, 334-341.
- Aider, M., Halleux, D. & Akbache, A. (2007). Whey cryoconcentration and impact on its composition. *Journal of Food Engineering*, **82**, 92-102.
- Aider, M. & Ounis, W. B. (2012). Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. *International Journal of Food Science and Technology*, **47**, 195-202.
- Akbari, M., Eskandari, M. H., Niakosari, M. & Bedeltavana, A. (2016). The effect of inulin on the physicochemical properties and sensory attributes of low-fat ice cream. *International Dairy Journal*, **57**, 52-55.
- AOAC. (2019). *Official methods of analysis of the association analytical chemists*, 21th. ed. Maryland, USA.
- Bahram-Parvar, M. & Goff, H.D. (2013). Basil seed gum as a novel stabilizer for structure formation and reduction of ice recrystallization in ice cream. *Dairy Science and Technology*, **93**, 273-285.

- Bahram-Parvar, M., Teerã, M.M., Razavi, S.M.A. & Koocheki. (2015). A. Application of simplex-centroid mixture design to optimize stabilizer combinations for ice cream manufacture. *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 1480-1488.
- Balde, A. & Aider, M. (2016). Impact of cryoconcentration on casein micelle size distribution, micelles inter-distance, and flow behavior of skim milk during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **34**, 68-76.
- Balthazar, C.F., Silva, H.L.A., Cavalcanti, R.N. *et al.* (2017a). Prebiotics addition in sheep milk ice cream: A rheological, microstructural and sensory study. *Journal of Functional Foods*, **35**, 564-573.
- Balthazar, C. F., Silva, H.L.A., Vieira, A.H. *et al.* (2017b). Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Research International*, **91**, 38 – 46.
- Balthazar, C.F., Silva, H.L.A., Esmerino, E.A. *et al.* (2018). The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chemistry*, **246**, 464-472.
- Barfod, N.M., Krog, N., Larsen, G. & Buchheim, W. *et al.* (1991). Effects of emulsions on protein-fat interaction in ice cream mix during ageing: Quantitative analysis. *Fat Science Technology*. *Fat Science Technology*, **93**, 24-29.
- Belén, F., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. & Raventós, M. (2012). One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. *Journal of Food Engineering*, **110**, 364-373.
- Bodyfelt, F. W., Tobias, J. & Trout, G. M. (1988). Sensory evaluation of ice cream and related products. *The sensory evaluation of dairy products*. New York: Library of Congress Cataloging-in-Publication, 166-226.
- Canella, M.H.M., Barros, E.L.S., Camelo-Silva, C. *et al.* (2019a). Performance of Skim Goat Milk Mineral Content Subjected to the Block Freeze Concentration Process. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*, **9**, 1-9.
- Canella, M. H. M., Muñoz, I. B., Barros, E.L. S. *et al.* (2019b). Block freeze concentration as a technique aiming the goat milk concentration: fate of physical, chemical, and rheological properties. *International Journal of Engineering Sciences & Research Technology*, **8**, 87-104.
- Canella, M.H.M., Muñoz, I.B., Pinto, S.S. *et al.* (2018). Use of Concentrated Whey by Freeze Concentration Process to Obtain a Symbiotic Fermented Lactic Beverage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **14**, 56-68.
- Chabarov, A. & Aider, M. (2014). Mathematical modeling and experimental validation of the mass transfer during unidirectional progressive cryoconcentration of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **21**, 151-159.
- Chang, Y. & Hartel, R.W. (2002). Development of air cells in a batch ice cream freezer. *Journal of Food Engineering*, **55**, 71-78.

Damodaran, S. 1997. *Protein-stabilized foams and emulsions*. In: Damodaran S, Paraf A, editors. *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker. 57–110.

Debon, J., Prudêncio, E. S. & Petrus, J. C. C. (2010). Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk. *Journal of Food Engineering*, **99**, 128-135.

Erkaya, T., Dağdemir, E. & Sengül, M. (2012). Influence of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral concentrations of ice cream. *Food Research International*, **45**, 331-335.

Goff, H.D. & Hartel, R.W. (2013). *Ice cream*, 7th ed. Springer, New York, p. 462, (Oxford, UK/Iowa/USA: Blackwell Publishing Professional).

Goff, H. & Jordan, W. (1989). Action of emulsifiers in promoting fat destabilization during the manufacture of ice cream. *Journal of Dairy Science*, **72**, 18-29.

González-Tomás, L., Bayarri, S., Taylor, A.J. & Costell, E. (2008). Rheology, flavour release and perception of low-fat dairy desserts. *International Dairy Journal*, **18**, 858-866.

Hernández, E., Raventós, M., Auleda, J. M. & Ibarz, A. (2010). Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**, 130-136.

Hernández, M. J. (1996). *Caracterización reológica de hidrogeles de MCCNaCMC + almidón. Tixotropía y sinergismo*. Ph.D. Thesis. Universitat de València, València, Spain.

Holdsworth, S.D. (1993). Rheological models used for the prediction of flow properties of food products. *Transactions in Chemical Engineering*, **71**, 139-179.

IDF. (2013). *Ice cream and milk ice- Determination of total solids content*, 7021th. ed. Brussels: International Dairy Federation.

Karaca, O. B., Güven, M., Yasar, K., Kaya, S. & Kahyaoglu, T. (2009). The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. *International Journal of Dairy Technology*, **62**, 93-99.

Kirtil, E. & Oztop, M.H. (2016). Characterization of emulsion stabilization properties of quince seed extract as a new source of hydrocolloid. *Food Research International*, **85**, 84-94.

Kozłowicz, K., Góral, M., Góral, D., Pankiewicz, U. & Bronowicka-Mielniczuk, U. (2019). Effect of ice cream storage on the physicochemical properties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. *LWT- Food Science and Technology*, **116**, 108562.

Kurt, A. & Atalar, I. (2018). Effects of quince seed on the rheological, structural and sensory characteristics of ice cream. *Food Hydrocolloids*, **82**, 186-195.

- Levin, M.A., Burrington, K.J. & Hartel, R.W. (2016). Whey protein phospholipid concentrate and delactosed permeate: Applications in caramel, ice cream, and cake. *Journal of Dairy Science*, **99**, 6948-6960.
- Martínez-Cervera, S. Salvador, A., Muguera, B., Moulay, L. & Fiszman, S.M. (2011). Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 729-736.
- Masotti, F. Cattaneo, S., Stuknytė, M. & Noni, I. (2017). Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, **64**, 102-114.
- Mohameed, H.A., Abu-Jdayil, B. & Al-Shawabkeh, A. (2004). Effect of solids concentration on the rheology of labneh (concentrated yogurt) produced from sheep milk. *Journal of Food Engineering*, **61**, 347-352.
- Muñoz, I. de B., Rubio, A., Blanco, M., Raventós, M., Hernández, E. & Prudêncio, E. S. (2019). Progressive freeze concentration of skimmed milk in an agitated vessel: Effect of the coolant temperature and stirring rate on process performance. *Food Science and Technology International*, **25**, 150–159.
- Muse, M.R. & Hartel, R.W. (2004). Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. *Journal of Dairy Science*, **87**, 1-10.
- Okpala, C., Piggott, J. & Schaschke, C. (2010). Influence of highpressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**, 61-67.
- Pathare, P. B., Opara, U.L. & Al-Said, F. A.J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 36-60.
- Petzold, G., Moreno, J., Lastra, P., Rojas, K. & Orellana, P. (2015). Block freeze concentration assisted by centrifugation applied to blueberry and pineapple juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **30**, 192-197.
- Pinto, S.S. Fritzen-Freire, C. B., Muñoz, I. de B., Barreto, P. L.M., Prudêncio, E.S. & Amboni, R.D.M.C. (2012). Effects of the addition of microencapsulated Bifidobacterium BB-12 on the properties of frozen yogurt. *Journal of Food Engineering*, **111**, 563-569.
- Prindiville, E. A., Marshall, R.T. & Heymann, H. (2000). Effect of milk fat, cocoa butter, and whey protein fat replacers on the sensory properties of low fat and nonfat chocolate ice cream. *Journal of Dairy Science*, **83**, 2216-2223.
- Relkin, P. & Sourdut, S. (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, **19**, 503-511.

Rezaei, R., Khomeiri, M., Kashaninejad, M. & Aalami, M. (2011). Effects of guar gum and arabic gum on the physicochemical, sensory and flow behavior characteristics of frozen yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, **64**, 563–568.

Ritzoulis, C., Marini, E., Aslanidou, A. *et al.* (2014). Hydrocolloids from quince seed: Extraction, characterization, and study of their emulsifying/stabilizing capacity. *Food Hydrocolloids*, **42**, 178-186.

Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T. *et al.* (2011). Influence of l-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, **21**, 869-876.

Rossa, P.N., Burin, V.M. & Bordignon-Luiz, M.T. (2012). Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. *LWT - Food Science and Technology*, **48**, 224-230.

Ruger, P.R., Baer, R.J. & Kasperson, K.M. (2002). Effect of Double Homogenization and Whey Protein Concentrate on the Texture of Ice Cream. *Journal of Dairy Science*, **85**, 1684-1692.

Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M. & Raventós, M. (2011a). Review: Freeze Concentration Technology Applied to Dairy Products. *Food Science and Technology International*, **17**, 5–13.

Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M. & Raventós, M. (2011b). Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. *Journal of Food Engineering*, **103**, 147–155.

Scarso, S., Parland, S., Visentin, G., Berry, D.P., Dermott, A. & Marchi, M. (2017). Genetic and nongenetic factors associated with milk color in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **100**, 7345-7361.

Schmidt, K.A. (2004). *Dairy: Ice cream*. Food processing - Principles and applications. Blackwell Publishing, Ames, IA, 287-296.

Silva, P. D. L., Bezerra, M.F., Santos, K.M.O. & Correia, R.T.P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk : Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, **62**, 452–457.

Silva, K. & Boline, A. M. H. (2006). Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1**, 116– 122.

Tárrega, A., Duran, L. & Costell, E. (2004). Flow behavior of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. *International Dairy Journal*, **14**, 345-353.

Toneli, J.T.C.L., Mürr, F.E.X. & Park, K.L. 2005. Revisão: Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, **7**, 181-204.

Turnbow, G.D., Tracy, P.H. & Raffetto, L.A. (1947). *The ice cream industry*. 2th ed. John Wilwy and Sons, Inc. 53-54.

Yadav, J.S.S. Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R.D. & Surampalli, R.Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, **33**, 756-774.

Warren, M.M. & Hartel, R.W. (2014). Structural, compositional, and sensorial properties of United States commercial ice cream products. *Journal of Food Science*, **79**, E2005-E2013.

Wildmoser, H., Scheiwiller, J. & Windhab, E.J. (2004). Impact of disperse microstructure on rheology and quality aspects of ice cream. *LWT- Food Science and Technology*, **37**, 881-891.

### **CAPÍTULO 3 –**

\*Artigo submetido para publicação na revista **LWT – Food Science and Technology**  
Assigned manuscript number LWT-D-20-00300 (ANEXO B).

**Concentrated whey from block freeze concentration or milk-based ice creams on *Bifidobacterium* BB-12 survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions**

Eulália Lopes da Silva Barros<sup>1</sup>, Silvani Verruck<sup>2</sup>, Bruna Marchesan Maran<sup>3</sup>, Maria Helena Machado Canella<sup>2</sup>, Callebe Camelo-Silva<sup>1</sup>, Elane Schwinden Prudencio<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>*Postgraduate Program in Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Technology Center, Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Itacorubi, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Chemistry and Food Engineering, Technology Center, Trindade, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil*

\* Corresponding author: +55 48 3721 5370 (E.S. Prudencio)

E-mail address: elane.prudencio@ufsc.br



## ABSTRACT

The first novelty about the present study is the use of concentrated whey from the second step of the freeze concentration process in the ice cream manufacturer, classified a byproduct of the dairy industry with representative total solids content ( $> 18$  g/100g of total). The second highlight of this work aimed to compare *Bifidobacterium* BB-12 protective effect of concentrated whey and milk-based ice creams under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions, as occurs in the human mouth, oesophagus-stomach, duodenum, ileum, and colon phases. It was observed that both ice creams showed bifidobacteria viable cells count ( $> 8$  log colony-forming units per gram, log CFU/g) above than recommended amount to be considered as a probiotic product. *Bifidobacterium* BB-12 incorporated in both ice creams showed the most important characteristic of probiotic microorganisms since it demonstrated survival rates  $> 90$  % passing by the upper digestive tract to reach the colon. However, the best protective effect was found to concentrated whey-based ice cream. The above statements show that ice cream with the addition of potentially probiotic bacteria and concentrated whey could be regarded as functional food which has a beneficial effect on the human body.

**Keywords:** Probiotic ice cream, bifidobacteria, cheese whey, concentrated, gastrointestinal simulation.

## 1 INTRODUCTION

The ice cream has been described as a complex frozen colloid that consists of a continuous aqueous phase with ice crystals dispersed in a semi-frozen solution (Akbari, Escandari, & Davoudi, 2019, Saremnezhad, Zargarchi, & Kalantari, 2020). The formulation of the original ice cream mix is given the majority by milk, and sometimes with functional elements addition. However, in the light of our knowledge, the total substitution of milk by concentrated whey from the freeze concentration process still was not employed in the ice cream manufacture.

Cheese whey is a liquid resulting from the precipitation and removal of milk casein in cheese-making processes (Remón, García, & Arauzo, 2016). According to Hausjell et al. (2019), every year worldwide around 190 million tons of cheese whey is generated resulting in a huge environmental. The volume of effluents produced in the cheese manufacturing industry has increased as a result of increase demand and production. It is pointed out that in the context of mass production, 1 kg of cheese requires roughly 10 kg of milk and yields 9 kg of whey. The cheese whey is a by-product that represents a significant environmental impact in the dairy industry because of their physicochemical characteristics, which is represented by the following proteins  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactoalbumin, immunoglobulin, serum albumin, and lactoferrin. From this valorization point of view, cheese whey is a nutrient-rich effluent, which cannot be directly discharged to the environment without adequate treatment and/or valorization (Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012, Hausjell et al., 2019). Due to the low solids content, concentration techniques can facilitate the cheese whey usage, further processing. The concentration of cheese whey is typically achieved by thermal evaporation under vacuum, which is an energy-intensive operation that also causes undesirable sensory and nutrition changes in the concentrated (Menchi & Moraru, 2019). For this reason, the non-thermal concentration of liquid foods, by the block freeze concentration process has been gaining increasing interest in recent years. This process is based on the fractional crystallization of water to ice and its sequential separation from the concentrated liquid by gravitational thawing (Petzold, Moreno, Lastra, Rojas, & Orellana, 2015). The advantages that have been also reported by Petzold et al. (2015) for this process are the simplicity of the separation step, and the reduction of the heat abusive on sensitive food components. The block freeze concentration process is considered environmentally friendly, has high effectiveness and low energy consumption, preserve the sensory and nutritional qualities

of the product, not require expensive maintenances (Aider & Halleux, 2008). Muñoz et al. (2018) stated that the energy required during the freezing concentration process is considered relatively low, while the evaporation requires a high amount of energy to remove water.

Substitution of milk by the concentrated whey from the second step of the freeze concentration process was employed with success by Canella et al. (2018), in the development of a probiotic fermented lactic beverage. Silva, Bezerra, Santos, and Correia (2015) stated that despite the dairy products constitute one of the most development segments, and represent a major branch of the functional foods industry, studies still are necessary about functional ice creams. Within functional foods are those classified as probiotics, live microorganisms that regularly consumed are able to offer a variety of benefits for the health of the host, such as the maintenance of normal intestinal microbiota (Hill et al., 2014). Bifidobacteria are the most common probiotic species of bacteria within a normal human intestinal community (Hadad, Zakareya, Al-Hejin, Aldahlawi, & Alharbi, 2019). The probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB-12) has beneficial effects on gastrointestinal health and immune function (Liu, Bhandari, & Zhang, 2020). Some studies have shown the ice cream as a good carrier of probiotic bacteria (Champagne, Raymond, Guertin, & Bélanger, 2015, Akalin et al., 2018, Balthazar et al., 2018, Calligaris, Marino, Maifreni, & Innocente, 2018, Góral, Kozłowicz, Pankiewicz, & Góral, 2018). However, Kozłowicz, Góral, Góral, Pankiewicz, and Bronowicka-Mielniczuk (2019) related that the ice cream composition can lead to serious damage to probiotic bacterial cells. In this regard, probiotic microorganisms should survive not only during the food processing but also the passage through the gastrointestinal tract (Soares et al., 2019). The integrity of the cell membrane, intracellular pH and functional enzymes of the probiotic cells can be constantly challenged by stress factors such as gastric acidity, bile acids, and digestive enzymes during their journey through the digestive tract (Rodrigues, Silva, Simabuco, Venema, & Venema, 2019). Therefore, studies should focus on how probiotic cells respond to all *in vitro* gastrointestinal conditions. Gastric acid and bile play an important role in the body's defense against ingested microorganisms, capable of killing and controlling gastrointestinal exposure to many pathogens. However, this same defense mechanism can also disable potentially beneficial microbes, such as those classified as probiotics. For probiotic effects that are dependent on viability and physiological activity in the intestine,

the survival of the probiotic in the presence of gastric acid and bile of the upper gastrointestinal tract is critical (Jungersen et al., 2014). Therefore, the substitution of milk by concentrated whey in ice cream elaboration reported as a suitable way to develop a functional ice cream. The present work aimed to provide an opportunity for direct whey valorization by the use of concentrated whey, offering this cheap substrate for production of probiotic ice cream, by bifidobacteria survival rate evaluation after exposure to different *in vitro* gastrointestinal phases.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 MATERIAL

Two ice creams were manufactured using 61.70 g/100g of pasteurized whole milk (12.03 g/100g of total solids) (Papenburg, Biguaçu, Brazil) and concentrated whey (18.61 g/100g of total solids) from the second stage of block freeze concentration process, respectively. The principle of block freeze concentration process was based on total freezing of whey followed by a partial defrosting procedure under simple gravitational separation. Once the whey was frozen, 50 % of the initial volume was defrosted at room temperature ( $20 \pm 2$  °C), resulting in two fractions denoted as concentrated whey and ice. In the elaboration of both ice creams, denoted ice cream 1 (with whole milk) and ice cream 2 (with concentrated whey) were used the following ingredients: 16.03 g/100g of cream (Tirol, Treze Tílias, Brazil) with 45 g/100g of fat content; 0.06 g/100g of sodium chloride (Ciasal, Areia Branca, Brazil); and 22.21 g/100g of sucrose (Camil, São Paulo, Brazil). A probiotic culture composed of *Bifidobacterium* BB-12 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Chr. Hansen, Honsholm, Denmark) was added at end of ice creams preparations. For the *in vitro* gastrointestinal conditions were used following enzymes:  $\alpha$ -amylase (28.75 U/mg protein), pepsin from porcine gastric mucosa (400 U/mg protein), and pancreatin from porcine pancreas (digestive power - 8 X USP specifications); besides the bovine bile salt (28.75 U/mg protein), all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A suitable medium containing the major compounds present in the colon phase (large intestine) were prepared using bacteriological peptone, yeast extract, tryptone, and Tween 80 acquired from Oxoid (Hampshire, UK). To mimic colon conditions were also employed NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KCl, citrus pectin, casein, starch, and L-cysteine, which were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Such as the MRS broth (Difco, Sparks, USA) supplies an excellent base for comparison of bacterial strain behavior, it was used as a control sample after the exposition to *in vitro* gastrointestinal conditions, as well as in the preparation of bifidobacteria suspension. MRS agar (Difco, Sparks, USA), sodium propionate (Fluka, Neu-Ulm, Germany), lithium chloride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), and AnaeroGen (Oxoid, Hampshire, UK) were used to determine bifidobacteria viable cell count.

## 2.2 PREPARATION OF BIFIDOBACTERIA SUSPENSION

The freeze-dried culture of *Bifidobacterium* BB-12 was rehydrated in sterile whole milk pasteurized according to the procedure described by Fritzen-Freire et al. (2012), denoted as a stock solution, and stored in sterile glass vials at  $-18 \pm 2$  °C. In the sequence, bifidobacteria cell suspension preparation was realized according to the procedures described by Rodrigues et al. (2011), with some modifications. Thus, the stock solution was added to the MRS broth modified with 0.2 g/100 g of lithium chloride and 0.3 g/100 g of sodium propionate additions, followed by incubation in anaerobic jars with AnaeroGen® at  $37 \pm 1$  °C for 48 h. After this incubation period, bifidobacteria cells were harvested by centrifugation (1,000 x g) (centrifuge from Nova Técnica, São Paulo, Brazil), using the temperature equal to  $25 \pm 1$  °C for 10 min. The supernatant was discarded, while bifidobacteria cells were washed twice with a saline solution (0.85/100g). Bifidobacteria cells pallet were suspended in 20 mL of MRS broth, 20 mL of whole milk pasteurized and 20 mL of concentrated whey, respectively. Final *Bifidobacterium* BB-12 viable cells counts in each one suspension prepared were equal to 9.81 log CFU/mL (colony-forming units per mL), 10.04 log CFU/mL, and 9.64 log CFU/mL, for MRS broth (control), whole milk and concentrated whey, respectively.

## 2.3. ICE CREAM PREPARATION

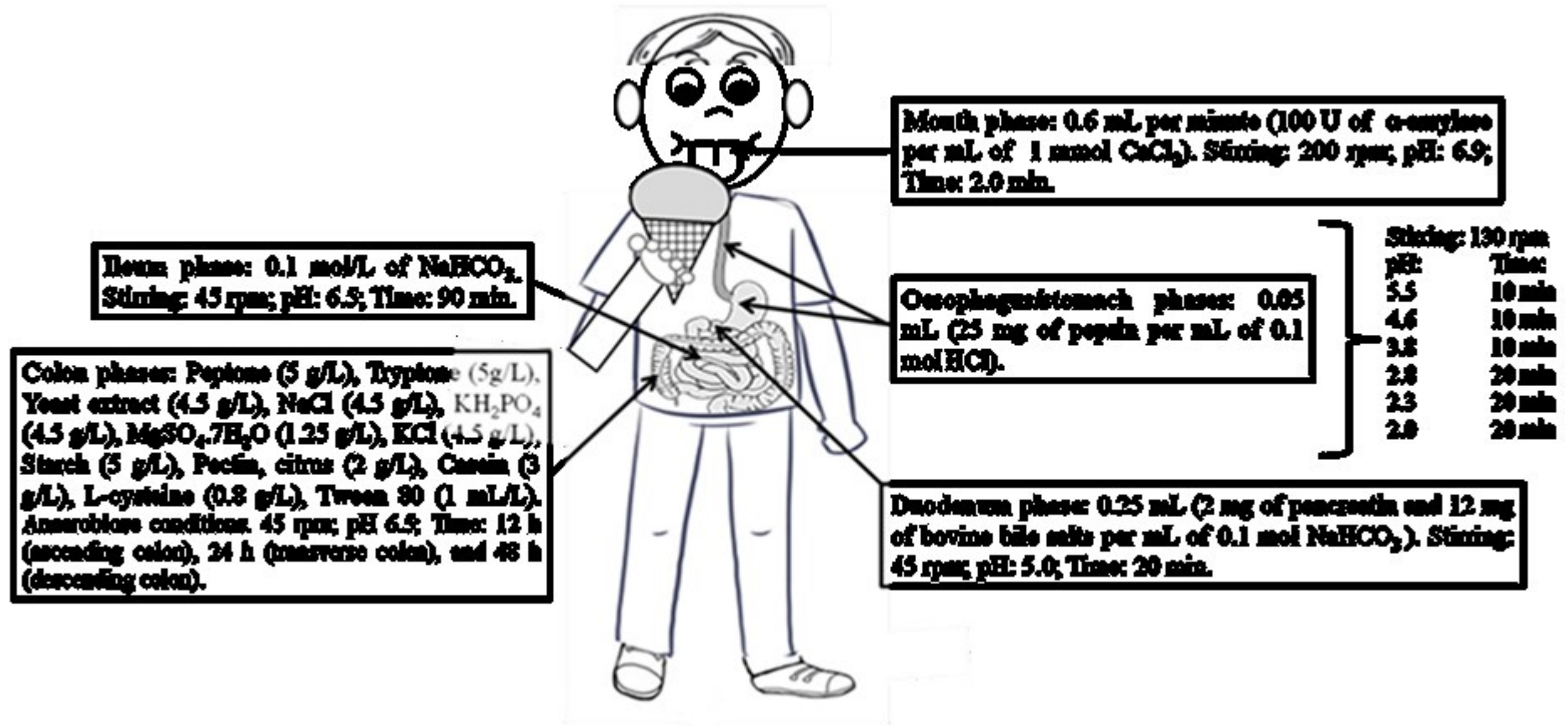
The ice cream mix consisted initially of pasteurized whole milk or concentrated whey from the second stage of the freeze concentration process; for the ice cream 1 and ice cream 2, respectively. In both, milk or concentrated whey, were also mixed cream, sodium chloride, and sucrose, using quantities previously described in the 2.1 section. The mixes were pasteurized at  $75 \pm 2$  °C for 30 min using a water bath (Model DI950M,

Dist, Florianópolis, SC, Brazil), and cooled to  $4 \pm 1$  °C. After these steps, bifidobacteria cell suspensions (20 mL/L) were added into ice cream mixes. Ice creams were produced in the batch freezer (Model ICE 21, Cuisinart, New Jersey, USA), resulting in samples denoted as ice cream 1 and ice cream 2. Both ice creams were added in plastic containers with around 100 g and hardened in the freezer before further analysis. Three replicates were prepared for each ice cream.

#### 2.4. IN VITRO GASTROINTESTINAL EXPERIMENT

*In vitro* gastrointestinal experiments were all performed in triplicate, and consisted under typical conditions present in the human mouth, oesophagus-stomach, duodenum, ileum, and colon phases, sequentially, as the protocol established by Barretta et al. (2019), and demonstrated in Figure 3.1. In the colon phase, samples were collected after 12 h (ascending colon), 24 h (transverse colon), and 48 h (descending colon). *In vitro* gastrointestinal experiments were done with 25 g of each ice cream sample (ice cream 1 and ice cream 2). As realized for the ice creams samples, 25 mL of the MRS broth (control) with 20 mL/L bifidobacteria suspension addition was also submitted to the *in vitro* gastrointestinal experiment. Briefly, were evaluated the following three samples during *in vitro* gastrointestinal phases: ice cream 1, ice cream 2, and control (MRS broth). Before use, all enzyme solutions were filter-sterilized by 0.22 µm membrane filter (MF-Millipore, Billerica, MA, USA), and during *in vitro* gastrointestinal phases maintained in an ice bath. The temperature ( $37 \pm 1$  °C) and peristaltic movement intensity of the human body were simulated using a water bath (Model DI950M, Dist, Florianópolis, SC, Brazil). As occurs in human gastrointestinal conditions, the overall volume increased during *in vitro* gastrointestinal phases.

Figure 3.1- Protocol used during gastrointestinal in vitro digestion phases.



## 2.5. *BIFIDOBACTERIUM* BB-12 VIABLE CELLS COUNT

At the end of each one *in vitro* gastrointestinal phase, samples were evaluated in relation to bifidobacteria viable cells count. Each sample dilution was corrected with peptone water (0.1 g/100 g) until 225 mL/25 g of each ice cream or 225 mL/25 mL of MRS broth. The samples were blended in a bag mixer 400 (Interscience, St. Nom, France), serially diluted with peptone water (0.1 g/100 g) and plated in triplicate on MRS agar modified with the addition of lithium chloride (0.2 g/100 g) and sodium propionate (0.3 g/100 g), as described by Vinderola and Reinhermer (2000). The plates were incubated in anaerobic jars with AnaeroGen® at  $37 \pm 1$  °C for 72 h. Bifidobacteria viable cell count was carried out in triplicate and expressed as log colony-forming units per gram (log CFU/g).

### 2.5.1 Survival rate

Bifidobacteria performance under *in vitro* gastrointestinal phases was calculated in survival rate (Eq. 1), as described by Guo et al. (2009).

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

Where  $N_1$  is the *Bifidobacterium* BB-12 viable cells count (log CFU/g) after exposure to each *in vitro* gastrointestinal phase, and  $N_0$  is bifidobacteria viable cells count (log CFU/g) before *in vitro* gastrointestinal phases.

## 2.6. DATA ANALYSIS

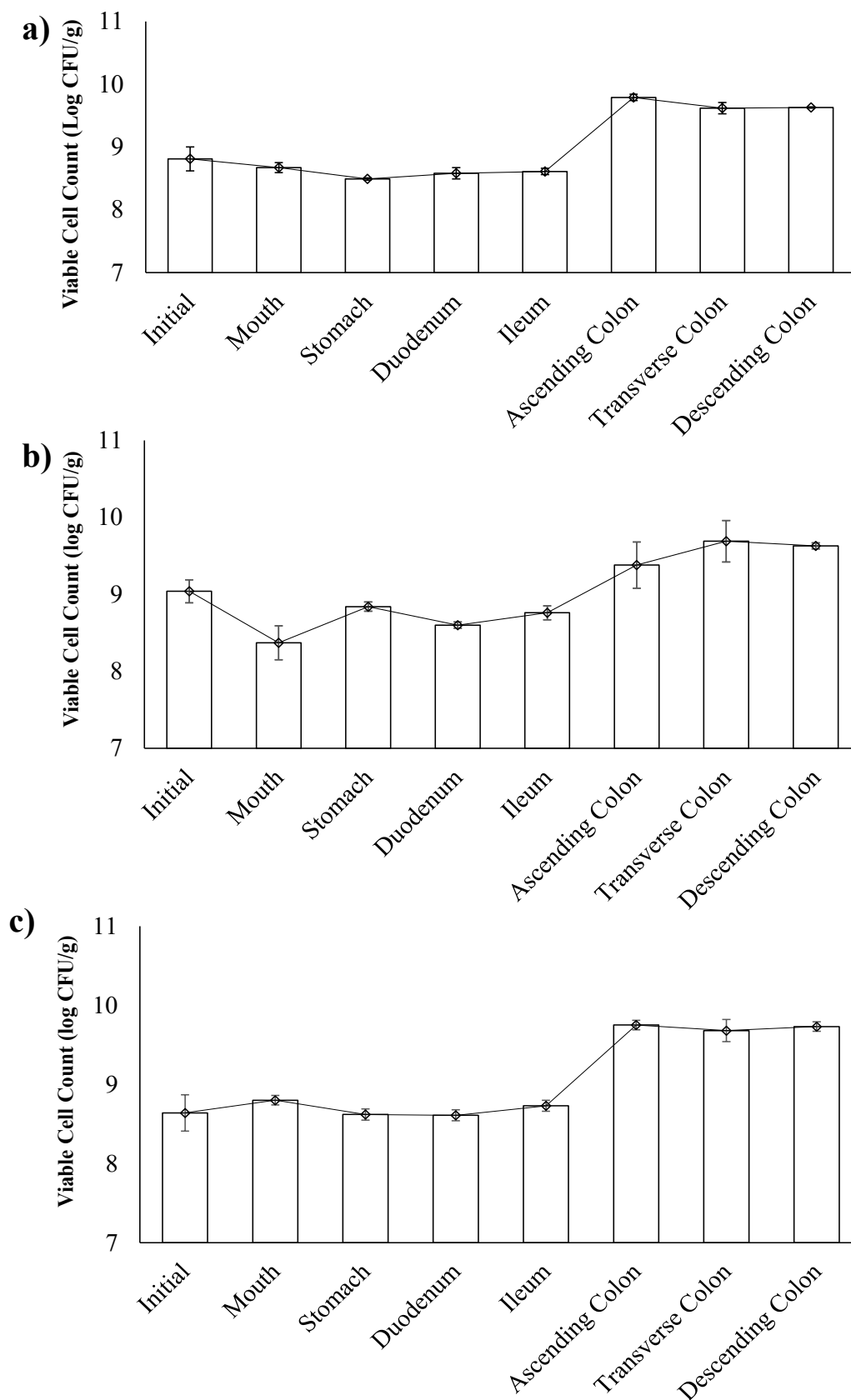
All data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the measurements carried out in triplicate on three samples for each batch. Statistical analysis was applied to microbiological data through the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Statistical significance was attributed when  $P < 0.05$ . Results were processed in software STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA).



### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 3.2 and Table 3.1 show *Bifidobacterium* BB-12 viable cells count and its survival rate after exposure to each *in vitro* gastrointestinal phase, respectively. As MRS broth, both ice cream samples could be considered a good vehicle for *Bifidobacterium* BB-12, because the probiotic viable cell count was above the recommended by a product to be considered probiotic. Hill et al. (2014) affirmed that a given probiotic might exert several health-promoting on the host if the probiotic viable cell count is  $\geq 6$  log UFC/g or mL, enhancing gastrointestinal homeostasis through positively affecting the intestinal microbiota balance. This occurrence is in accordance with Akalin et al. (2018) and Kozłowicz et al. (2019), which classified the ice cream as a good potential for use as a probiotic vehicle because of its composition in frozen systems includes nutritive constituents such as total solids composed by proteins, fat, and lactose. Kozłowicz et al. (2019) also stated that the ice cream pH is higher than that of fermented milk, which has a positive impact on the survival of probiotic bacteria. Soares et al. (2019) confirmed that species of the genus *Bifidobacterium* are notoriously more sensitive to foods with acid (4.5-5.0) and alkaline pH (8.0-8.5). Silva et al. (2015) affirmed that the aeration and freezing of the ice cream mix can lead to serious damage to the bacterial cells. However, these authors also cited that the use of an appropriate inoculum amount of the probiotic bacterial strain can contribute to the high bacteria abundance. Other factors involved in maintaining probiotic viable cell count could be related to the ice cream mix composition. Rodrigues et al. (2019) reported that milk is currently the main probiotic vehicles used by the food industry worldwide. Silva et al. (2015) verified that goat's milk ice cream was an adequate delivery vehicle for bifidobacteria.

Figure 3.2- *Bifidobacterium* BB-12 viable cells count data mean from a) control sample (MRS broth); b) ice cream 1 sample, prepared with whole milk; and c) ice cream 2 sample, using concentrated whey, after exposure to each one gastrointestinal *in vitro* digestion phase. The bars represent the standard deviation ( $\pm$ ).



Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, and Malcata (2011) affirmed that the behavior of probiotic bacteria in the MRS broth provides an excellent base for comparison, assessing the protective effect of the ice cream with different mix compositions. Therefore, in our study, it was possible to note that the ice cream 2 sample, which employed the concentrated whey, demonstrated to be a good probiotic vehicle. Yasmin, Saeed, Pasha, and Zia (2018) also observed a protective effect of *Bifidobacterium longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions, when it was used a mix composed by whey proteins. These authors concluded that the protective effect was because of the abundance in specific amino acid residues from whey, which provide a protective environment for probiotics. Etchepare et al. (2020) noted that the buffering effect presented by higher whey protein presence contributed to higher rates of probiotics survival, during gastrointestinal tests. These authors also observed that the use of whey proteins provided substantially better protection for probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La-14. Therefore, it was expected that, if probiotics incorporated into the food system, they should remain stable during the processing of the food products until consumption. Furthermore, it was also expected that probiotics, which have been ingested orally, should survive the harsh acidic condition of the gastrointestinal tract, passing through the upper digestive tract to reach the colon phases. For this reason, our study focused on *Bifidobacterium* BB-12 survival rate under *in vitro* gastrointestinal phases, when incorporated in the ice cream matrices, produced with whole milk or concentrated whey, respectively. *Bifidobacterium* BB-12 added into ice creams 1 and 2 samples, and submitted to the *in vitro* gastrointestinal phases were realized sequentially, according to established by our research group. However, in the present work, the novelty is also related to the study of colon phases, where samples were collected after 12 h (ascending colon), 24 h (transverse colon), and 48 h (descending colon).

The passage through the gastrointestinal tract includes different challenges for bifidobacteria added into MRS broth, ice cream 1 and ice cream 2 samples. Overall, in the mouth, oesophagus/stomach, duodenum, and ileum phases, it was possible to note that for all samples bifidobacteria survival rates remained high (> 90 %) (Table 3.1). The high *Bifidobacterium* BB-12 survival rate found in all samples could be because this microorganism contains the gene coding for bile salt hydrolase, an enzyme that is important for coping with the high bile salt concentrations in the small intestine. This enzyme is present and active in *Bifidobacterium* BB-12 at all times, a fact that was

described by Jungersen et al. (2014). Sánchez et al. (2007) stated that studies with *Bifidobacterium* BB-12 indicating that several genes involved in fatty acid biosynthesis were down-regulated in the presence of bile salts, and suggested that bile salts could induce changes in bifidobacteria cytoplasmic membrane composition. These authors also revealed that the deep metabolic reorganization of bifidobacteria is also correlated to the changes in the preferential branch through the glycolytic pathway, and hence in the manner of energy production. Sánchez et al. (2007) also cited others changes of bifidobacteria which are associated with its resistance after exposure to gastrointestinal conditions, such as the occurrence of the fatty acid biosynthesis; the increase of molecular chaperones amount; the modification of redox balance of the cell; and the nitrogen metabolism, which could be involved with a sigma factor. Zhang et al. (2019) reported that the sigma factor is responsible for the major gene transcription that allows bacteria to respond to environmental changes. According to these authors, sigma factors are multi-domain subunits of bacterial RNA polymerase, which play vital roles in the transcription initiation process and have great effects on many important cellular activities, such as growth and stress tolerance with the environmental changes. However, it should be pointed out that the best performance ( $P < 0.05$ ) for the bifidobacteria survival rate was found for the ice cream 2. This fact confirms that even though well-equipped to endure this critical passage in the gastrointestinal tract, *Bifidobacterium* BB-12 may suffer several damages, resulting in a survival rate decrease, as verified by Muñoz et al. (2018). As in our study, these authors also noted a better bifidobacteria protective effect in soft fresh cheese from freeze concentrated milk, and therefore, with more cheese whey protein, when compared with the MRS broth. This fact makes us believe that the increase of total solids by the whey proteins in the ice cream sample mix composition was responsible for a more stable and protective food matrix for bifidobacteria. Tamime, Saarela, Søndergaard, Mistry, and Shah (2005) reported that the addition of whey proteins increases the buffering capacity, contributing to a better survival rate of probiotic microorganisms. Because these authors emphasized that the freezing stress during ice cream manufacture must be considered a limiting factor with respect to the probiotic survival rate, we also consider that the protective effect of bifidobacteria is related to the concentrated whey used in the elaboration of ice cream 2.

Table 3.1- *Bifidobacterium* BB-12 survival rate (%) results expressed as mean  $\pm$  standard deviation, after exposure to each gastrointestinal *in vitro* phase from control (MRS broth), ice cream 1 (with whole milk), and ice cream 2 (with concentrated whey) samples.

Phase	Sample			
	Control	Ice cream 1	Ice cream 2	
<b>Mouth</b>	98.36 $\pm$ 0.90 <sup>cB</sup>	92.63 $\pm$ 2.46 <sup>dC</sup>	101.85 $\pm$ 0.70 <sup>bA</sup>	
<b>Oesophagus/Stomach</b>	96.34 $\pm$ 0.22 <sup>dC</sup>	97.88 $\pm$ 0.68 <sup>bB</sup>	100.03 $\pm$ 0.86 <sup>b,cA</sup>	
<b>Duodenum</b>	97.40 $\pm$ 0.99 <sup>c,dB</sup>	95.17 $\pm$ 0.44 <sup>c,dC</sup>	99.67 $\pm$ 0.86 <sup>cA</sup>	
<b>Ileum</b>	97.73 $\pm$ 0.52 <sup>cB</sup>	96.96 $\pm$ 0.98 <sup>b,cB</sup>	101.03 $\pm$ 0.84 <sup>b,cA</sup>	
<b>Colon</b>	<b>Ascending</b>	111.08 $\pm$ 0.56 <sup>aB</sup>	103.85 $\pm$ 3.31 <sup>aC</sup>	112.79 $\pm$ 0.68 <sup>aA</sup>
	<b>Transverse</b>	109.11 $\pm$ 1.04 <sup>a,bB</sup>	107.25 $\pm$ 3.04 <sup>aB</sup>	112.04 $\pm$ 1.67 <sup>aA</sup>
	<b>Descending</b>	109.25 $\pm$ 0.13 <sup>bB</sup>	106.56 $\pm$ 0.39 <sup>aC</sup>	112.57 $\pm$ 0.74 <sup>aA</sup>

<sup>A-C</sup> Within a row, different superscript uppercase letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between samples among the same step of the gastrointestinal *in vitro* phase.  
<sup>a-d</sup> Within a column, different superscript lowercase letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ), for same sample among the different step of the gastrointestinal *in vitro* phase.

Just like the survival of the probiotic in the presence of gastric acid and bile of the upper gastrointestinal tract is critical, it is also crucial bifidobacteria survival in the colon phase (large intestine). Jungersen et al. (2014) affirmed that the human large intestine is host to a wide variety of bacteria, with bifidobacteria being prominent members of this complex ecosystem. Presumably, Hadad, Zakareya, Al-Hejin, Aldahlawi, and Alharbi (2019) stated that the reduction in oxygen levels from colon phases enables anaerobic bacteria to grow, like bifidobacteria. This fact was confirmed for our results, which are demonstrated by the highest ( $P < 0.05$ ) bifidobacteria survival rate (Table 3.1) detected in the colon phases (ascending, transverse, descending). Shu et al. (2020) observed an increase of probiotic survival when their environment changes from strong acid to a suitable one ( $\text{pH} \geq 6$ ). These same authors assert that the cause of this increase is associated with an acidic environment. In this case, probiotics strengthen the cell walls and the cell membrane permeability change. Therefore, the  $\text{H}^+$  is isolated outside of the cells and this protects the cells, which is an important reaction caused by bacteria in the acid environment of DNA damage repair and acid-induced protein (Shu et al., 2020). It is noteworthy that the probiotic effects are dependent on viability and physiological activity in the intestine after the probiotic survival presence of gastric acid and bile of the critical upper gastrointestinal tract. Therefore, the use of whey concentrated by a non-thermal and cheaper process (block freeze concentration), in the ice cream elaboration, as matrix protective of *Bifidobacterium* BB-12, increased the functional value of ice cream since this probiotic bacteria showed a higher survival after *in vitro* gastrointestinal phases in comparison with milk-based ice cream.

#### 4 CONCLUSION

In both ice creams, from milk or concentrated whey from the second step of the block freeze concentration process, after exposure *in vitro* gastrointestinal phases, bifidobacteria viable cells count were maintained above than recommended amount to be considered as a probiotic product. It is evident that *Bifidobacterium* BB-12 incorporated in both ice creams showed the most important characteristic of probiotic microorganisms since it demonstrated the ability to survive passing through the upper digestive tract to reach the large intestine. The ice cream manufactured with concentrated whey showed the best bifidobacteria protective effect, after exposure to *in vitro* gastrointestinal phases.

This occurrence could be credit to stress tolerance of *Bifidobacterium* BB-12 with the environmental changes, and to the higher total solids content of concentrated whey, also represented by the largest amount of whey proteins.

### Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) by the financial support [CNPq, 405965/2016-8], and to CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Brazil - Finance Code 001) by the scholarship.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### REFERENCES

- Aider, M. & de Halleux, D. (2008). Production of concentrated cherry and apricot juices by cryoconcentration technology. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1768-1775. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.02.008>.
- Akalın, A. S., Kesenkas, H., Dinkci, N., Unal, G., Ozer, E., & Kınık, O. (2018). Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. *Journal of Dairy Science*, 101, 37-46. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13468>.
- Akbari, M., Eskandari, M. H., & Davoudi, Z. (2019). Application and functions of fat replacers in low-fat ice cream: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.036>.
- Balthazar, C. F., Silva, H. L. A., Esmerino, E. A., Rocha, R. S., Moraes, J., & Carmo, M. A. V. et al. (2018). The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chemistry*, 246, 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.002>.
- Barretta, C., Verruck, S., Maran, B. M., Maurício, L. S., Miotto, M., de Rosana WerneckVieira, C. R. W., et al. (2019). *Listeria monocytogenes* survival in raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet under in vitro simulated gastrointestinal conditions by culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods. *LWT - Food Science and Technology*, 107, 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.015>.

- Calligaris, S., Marino, M., Maifreni, M., & Innocente, N. (2018). Potential application of monoglyceride structured emulsions as delivery systems of probiotic bacteria in reduced saturated fat ice cream. *LWT - Food Science and Technology*, 96, 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.046>.
- Canella, M. H. M., Muñoz, I. B., Pinto, S. S., Liz, G. R., Muller, C. M. O., & Amboni, R. D. M. C., et al. (2018). Use of Concentrated Whey by Freeze Concentration Process to Obtain a Symbiotic Fermented Lactic Beverage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 56-68. <http://dx.doi.org/10.19026/ajfst.14.5832>.
- Champagne, C. P., Raymond, Y., Guertin, N., & Bélanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. *International Dairy Journal*, 47, 109-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.03.003>.
- Etchepare, M. A., Nunes, G. L., Nicoloso, B. R., Barin, J. S., Flores, R. M. M., & Mello, R. O., et al. (2020). Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 117, 108601. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108601>.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45, 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>.
- Góral, M., Kozłowicz, K., Pankiewicz, U., & Góral, D. (2018). Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chemistry*, 239, 1151–1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.053>.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X., & Zhang, H. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1640-1646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.025>.
- Hadad, S. E., Zakareya, A., Al-Hejin, A., Aldahlawi, A., & Alharbi, M. (2019). Sustaining exposure to high concentrations of bifidobacteria inhibits gene expression of Mouse's mucosal immunity. *Heliyon*, 5, e02866. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02866>.
- Hausjell, J., Miltner, M., Herzig, C., Limbeck, A., Saracevic, Z., Saracevic, E., et al. (2019). Valorisation of cheese whey as substrate and inducer for recombinant protein production in *E. coli* HMS174(DE3). *Bioresource Technology Reports*, 8, 100340. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100340>.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., & Pot, B., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506-514, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.



- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., & Eskesen, D. (2014). The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. *Microorganisms*, 2, 92-110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>.
- Kozłowicz, K., Góral, M., Góral, D., Pankiewicz, U., & Bronowicka-Mielniczuk, U. (2019). Effect of ice cream storage on the physicochemical properties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. *LWT - Food Science and Technology*, 116, 108562. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108562>.
- Liu, Z., Bhandari, B., & Zhang, M. (2020). Incorporation of probiotics (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) into 3D printed mashed potatoes: Effects of variables on the viability. *Food Research International*, 128, 108795. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108795>.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44, 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.010>.
- Menchik, P., & Moraru, C. I. (2019). Nonthermal concentration of liquid foods by a combination of reverse osmosis and forward osmosis. Acid whey: A case study. *Journal of Food Engineering*, 253, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.015>.
- Muñoz, I. B., Rubio, A., Blanco, M., Raventós, M., Hernández, E. & Prudêncio, E. S. (2018). Progressive freeze concentration of skimmed milk in an agitated vessel: Effect of the coolant temperature and stirring rate on process performance. *Food Science and Technology International*, 25, 150-159. <https://doi.org/10.1177/1082013218803263>.
- Petzold, G., Moreno, J., Lastra, P., Rojas, K., & Orellana, P. (2015). Block Freeze Concentration Assisted by Centrifugation Applied to Blueberry and Pineapple Juices. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 30, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.007>.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48e68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.
- Remón, J., García, L., & Arauzo, J. (2016). Cheese whey management by catalytic steam reforming and aqueous phase reforming. *Fuel Processing Technology*, 154, 66–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.08.012>.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J. P., Sousa Lobo, J. M., & Costa, P., et al. (2011). Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, 21, 869e876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.005>.

- Rodrigues, V. C. C., Silva, L. G. S., Simabuco, F. M., Venema, K., & Antunes, A. E. C., (2019). Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. *Journal of Functional Foods*, 55, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.046>.
- Sánchez, B., Champomier-Vergès, M-C., Stuer-Lauridsen, B., Ruas-Madiedo, P., Anglade, P., & Baraige, F., et al. (2007). Adaptation and Response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to Bile: a Proteomic and Physiological Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6757–6767. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-07>.
- Saremnezhad, S., Zargarchi, S., & Kalantari, Z. N. (2020). Calcium fortification of prebiotic ice-cream. *LWT - Food Science and Technology*, 120, 108890. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108890>.
- Shu, G., Tian, M., Chen, L., Ma, D., Cui, X., & Meng, J. (2020). Probiotic goat milk tablets: Formulation optimization and stability evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, 119, 108862. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108862>.
- Silva, P. D. L., Bezerra, M. F., Santos, K. M. O., & Correia, R. T. P. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 452e457. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.055>.
- Soares, M. B., Martinez, R. C. R., Pereira, E. P. R., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., & Ranadheera, C. S., et al. (2019). The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Research International*, 125, 108542. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108542>.
- Tamime, A. Y., Saarela, M., Søndergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2006). Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-Organisms in Dairy Products. In A. Tamime (Ed.), *Probiotic Dairy Products* (pp. 39-72). Oxford: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995785.ch3>.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10, 271-275. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00045-5).
- Yasmin, I., Saeed, M., Pasha, I., & Zia, M. A. (2019). Development of whey protein concentrate-pectin-alginate based delivery system to improve survival of *B. longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 413-426. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9407-x>.
- Zhang, C., Zhang, W., Liang, W., Shao, Y., Zhao, X., & Li, C. (2019). A sigma factor RpoD negatively regulates temperature-dependent metalloprotease expression in a pathogenic *Vibrio splendidus*. *Microbial Pathogenesis*, 128, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.021>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o uso do soro lácteo como matéria-prima para elaboração de gelados comestíveis é promissor, representando uma alternativa para a valorização desse produto. O método de crioconcentração em blocos estudado para concentrar o soro lácteo contribuiu para um ingrediente natural econômico de alto valor nutritivo. A aplicação do soro concentrado em substituição ao leite na elaboração de gelados comestíveis se mostrou eficaz em relação as suas propriedades estruturais. Dentre os cinco gelados comestíveis elaborados, destaca-se o gelado comestível 4 com substituição de 50% de leite por soro concentrado, devido ao maior valor de overrun, pois remete diretamente no rendimento e conseqüentemente nos lucros do produto.

A capacidade de proteção dos gelados comestíveis produzidos com o concentrado de soro lácteo e produzido a base de leite foram observados para *Bifidobacterium* BB-12 nas condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. Todas as amostras apresentaram contagens superior a 6 log UFC/g acima do recomendado para o produto ser considerado probiótico. Em todas as fases, foi possível observar que, para todas as amostras, as taxas de sobrevivência das bifidobactérias permaneceram altas (> 90%). Verificou-se que o gelado comestível de soro concentrado do segundo estágio da crioconcentração serviu como melhor matriz protetora de *Bifidobacterium* BB-12 seguido pelo gelado de leite após as fases gastrointestinais simuladas *in vitro*.

Os gelados comestíveis produzidos de soro concentrado mostram ser uma alternativa atraente para a indústria, principalmente, pela possibilidade de redução do preço e utilização desse produto secundário altamente poluente. Entretanto, sugere-se a realização de mais estudos que permitam avaliar a viabilidade da bactéria probiótica no produto durante seu armazenamento congelado. Além disso, recomenda-se avaliar as características sensoriais das formulações de gelados comestíveis com adição de soro lácteo concentrado em relação ao adicionado de leite.

## ANEXO A – TRABALHO APRESENTADO NO XV ERSCTA- ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS-2019.

PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

### Propriedades físicas de soro lácteo concentrado pela crioconcentração em blocos

Eulália Lopes da Silva Barros\*, Callebe Camelo Silva, Silvani Verruck, Maria Helena Machado Canella, Amanda Alves Prestes, Elane Schwinden Prudêncio

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

A crioconcentração em blocos é uma técnica de concentração que apresenta a vantagem de manter a qualidade nutricional de alimentos através da recuperação de um soluto por meio da separação de cristais de gelo. Esta técnica possui aplicações bastante promissoras em relação ao valor nutritivo de seu concentrado quando comparada com os processos tradicionais de concentração, os quais utilizam temperaturas maiores do que a de congelamento. Para a realização de dois estágios da crioconcentração, o soro lácteo foi primeiramente congelado em blocos (200 g) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Depois do congelamento, 50% da massa inicial (g) foi descongelada gravitacionalmente em temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C}$ ). Assim, o líquido descongelado constituiu o concentrado do primeiro estágio de crioconcentração (C1). Como no primeiro estágio da crioconcentração, este concentrado (C1) foi congelado e descongelado novamente até 50% da massa inicial, resultando no concentrado do segundo estágio (C2) e numa fração de gelo. Como a fração concentrada apresenta maior valor nutritivo determinou-se além de suas propriedades físicas, o seu teor de sólidos totais. Este teor foi também determinado, a fim de avaliar a sua interferência sobre as propriedades físicas das frações concentradas do soro lácteo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar o teor de sólidos totais do soro lácteo e das suas frações concentradas resultantes do primeiro (C1) e do segundo estágio (C2), bem como os seus valores de viscosidade e densidade. A viscosidade dinâmica foi obtida pelo viscosímetro de bolas, enquanto a densidade empregando o densímetro portátil. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão. Com os resultados obtidos verificou-se que C2 apresentou maior ( $p < 0,05$ ) teor de sólidos totais ( $18,95 \pm 0,99 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), seguido por C1 ( $11,88 \pm 0,15 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e pelo soro lácteo ( $6,55 \pm 0,06 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). O mesmo comportamento foi verificado para a viscosidade e para a densidade do soro lácteo, C1 e C2, cujos valores aumentaram ( $P < 0,05$ ) com o aumento do estágio de crioconcentração e foram iguais a  $1,883 \pm 0,182 \text{ mPa s}$  e  $1,17 \pm 0,00 \text{ g cm}^{-3}$ ;  $2,491 \pm 0,121 \text{ mPa s}$  e  $1,19 \pm 0,00 \text{ g cm}^{-3}$ ; e  $3,180 \pm 0,192 \text{ mPa s}$  e  $1,23 \pm 0,00 \text{ g cm}^{-3}$ , respectivamente. Verificou-se que o comportamento das propriedades físicas (viscosidade e densidade) está relacionado ao aumento do teor de sólidos totais observado no processo de crioconcentração do soro lácteo.

**Palavras-chave:** Concentração. Soro Lácteo. Viscosidade. Densidade.

Rev. Acad. Ciênc. Anim. 2019;17(Supl 5):67.  
ISSN: 2596-2868

XV Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos

\* Autor correspondente: barroseulalialopes@gmail.com



**XV Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos**  
**"Caminhos da produção de alimentos: Biodiversidade e Inovação"**

**CERTIFICADO**

Certificamos que

**EULÁLIA LOPES DA SILVA BARROS, CALLEBE CAMELO SILVA, SILVANI VERRUCK, MARIA HELENA  
MACHADO CANELLA, AMANDA ALVES PRESTES, ELANE SCHWINDEN PRUDÊNCIO**

Participou(aram) da XV ERSCTA - Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado no período de 28 e 29 de novembro de 2019, em  
Curitiba - PR.

Na qualidade de autor(es) do Trabalho Científico: PROPRIEDADES FÍSICAS DE SORO LÁCTEO CONCENTRADO PELA CRIOCONCENTRAÇÃO EM  
BLOCOS

Curitiba, 29 de Novembro de 2019.

*Leomara F. Ribeiro*

Leomara Floriano Ribeiro  
Coordenadora da Comissão Científica do XV ERSCTA

*Agnes de Paula Scheer*

Agnes de Paula Scheer  
Presidente do XV ERSCTA

Promocão



Organização



o W  
Acesse Config

**ANEXO B - ARTIGO “CONCENTRATED WHEY FROM BLOCK FREEZE CONCENTRATION OR MILK-BASED ICE CREAMS ON BIFIDOBACTERIUM BB-12 SURVIVAL UNDER IN VITRO SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS” SUBMETIDO À “LWT - FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY”**

Assunto **Track your recent Co-Authored submission to LWT**  
 De LWT - Food Science & Technology  
 <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
 Remetente <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
 Para <elane.prudencio@ufsc.br>  
 Responder para LWT - Food Science & Technology  
 <lwt@elsevier.com>  
 Data 14.01.2020 11:13



\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. **Elane Prudencio**,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

**Journal: LWT - Food Science and Technology**

Title: Concentrated whey from block freeze concentration or milk-based ice creams on Bifidobacterium BB-12 survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions

Corresponding Author: Maria Helena Machado Canella

Co-Authors: **Eulália S Barros**, MSc; Silvani Verruck; Bruna M Maran; Callebe Camelo-Silva; Elane S Prudencio, PhD

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/lwt/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Elane&lname=Prudencio&email=elane.prudencio@ufsc.br>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/lwt/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=elane.prudencio@ufsc.br>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at [helenacanella@gmail.com](mailto:helenacanella@gmail.com).

Thank you,

LWT - Food Science and Technology