



**UNIWERSYTET RZESZOWSKI**

**Kolegium Nauk Przyrodniczych**

**mgr inż. Magdalena Kowalczyk**

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wpływ dodatku błonnika i różnych szczepów probiotycznych na  
przeżywalność bakterii, biodostępność makroelementów oraz jakość lodów  
z mleka owczego**

DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE  
DYSCYPLINA: TECHNOLOGIA ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIA

Rozprawa doktorska wykonana  
w Zakładzie Technologii Mleczarstwa  
Instytut Technologii Żywności i Żywienia  
Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Rzeszowski

Pod kierunkiem  
Promotor: **dr hab. inż. Agata Znamiorska - Piotrowska, prof. UR**  
Promotor pomocniczy: **dr inż. Małgorzata Pawlos**

RZESZÓW, 2024

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania*

*mojej Promotor –*

***Pani dr hab. inż. prof. UR Agacie Znamirowskiej - Piotrowskiej,***

*która swoją postawą inspirowała do ciągłego rozwoju i doskonalenia.*

*Dziękuję za nieocenione wsparcie, cierpliwość i profesjonalizm.*

*To prawdziwy zaszczyt móc rozwijać się pod opieką tak wyjątkowej osoby*

*oraz*

***Promotor Pomocniczej dr inż. Małgorzacie Pawłos** za okazaną życzliwość,  
słowa wsparcia, pomoc i cenne wskazówki podczas prowadzenia badań.*

## SPIS TREŚCI

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	5
Wykaz skrótów .....	6
1. WSTĘP .....	8
2. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE .....	14
2.1 Cel pracy.....	14
2.2 Zakres pracy .....	14
2.3 Hipotezy badawcze .....	14
3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE.....	15
3.1 Materiał badawczy .....	15
3.1.1 Mleko.....	15
3.1.2 Błonnik pokarmowy .....	15
3.1.3 Kultury starterowe .....	15
3.1.4 Dodatki .....	15
3.1.5 Odczynniki chemiczne i materiały .....	15
3.1.5.1 Trawienie <i>in vitro</i> .....	15
3.1.5.2 Odczynniki do oznaczeń fizykochemicznych i mikrobiologicznych .....	16
3.2 Technologia produkcji lodów probiotycznych.....	17
3.3 Metody badań.....	18
3.3.1 Ocena składu chemicznego .....	18
3.3.2 Kwasowość.....	18
3.3.3 Barwa.....	18
3.3.4 Puszystość.....	19
3.3.5 Całkowity czas topnienia oraz czas pojawienia się pierwszej kropli .....	19
3.3.6 Ocena mikrobiologiczna.....	19
3.3.7 Oznaczanie zawartości makroelementów.....	19
3.3.8 Trawienie <i>in vitro</i> oraz ocena przeżywalności bakterii probiotycznych i biodostępności składników mineralnych.....	20
3.3.9 Ocena organoleptyczna .....	20
3.3.10 Analiza statystyczna .....	20
4. OPIS WYNIKÓW I OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH.....	21
4.1 Właściwości mieszanek lodowych.....	21
4.2 Wpływ zastosowania różnych szczepów probiotycznych na cechy fizykochemiczne i organoleptyczne lodów z inuliną .....	27

4.3 Wpływ czasu przechowywania lodów z mleka owczego na cechy fizykochemiczne, organoleptyczne oraz mikrobiologiczne .....	35
4.4 Wpływ rodzaju zastosowanych błonników na cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne lodów .....	42
4.5 Wpływ zastosowanych szczepów probiotycznych na biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego .....	51
4.6 Wpływ rodzaju zastosowanego błonnika na biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego .....	54
4.7 Wpływ zastosowanego szczepu probiotycznego na przeżywalność bakterii w układzie pokarmowym.....	57
4.8 Wpływ rodzaju zastosowanych błonników na przeżywalność bakterii probiotycznych w układzie pokarmowym .....	62
WNIOSKI .....	64
SPIS LITERATURY .....	66
SPIS WYKRESÓW I SCHEMATÓW.....	80
Streszczenie .....	82
Summary.....	85
Pozostałe osiągnięcia naukowe.....	87
ANEKS .....	91
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów.....	91

## Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Podstawę niniejszej dysertacji stanowią cztery opublikowane oryginalne artykuły w czasopismach naukowych.

### Publikacja 1

**Magdalena Kowalczyk**, Agata Znamirowska, Magdalena Buniowska. Probiotic Sheep Milk Ice Cream with Inulin and Apple Fiber. *Foods* 2021, 10, 678. <https://doi.org/10.3390/foods10030678>

Punkty MNiSW: 100

IF: 5,561

### Publikacja 2

**Magdalena Kowalczyk**, Agata Znamirowska, Małgorzata Pawlos, Magdalena Buniowska. The Use of Olkuska Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream. *Animals* 2022, 12, 70. <https://doi.org/10.3390/ani12010070>

Punkty MNiSW: 100

IF: 3,000

### Publikacja 3

**Magdalena Kowalczyk**, Agata Znamirowska-Piotrowska, Magdalena Buniowska-Olejniak, Małgorzata Pawlos. Sheep Milk Symbiotic Ice Cream: Effect of Inulin and Apple Fiber on the Survival of Five Probiotic Bacterial Strains during Simulated *In Vitro* Digestion Conditions. *Nutrients* 2022, 14, 4454. <https://doi.org/10.3390/nu14214454>

Punkty MNiSW: 140

IF: 5,900

### Publikacja 4

**Magdalena Kowalczyk**, Agata Znamirowska-Piotrowska, Magdalena Buniowska-Olejniak, Grzegorz Zagała, Małgorzata Pawlos. Bioavailability of Macroelements from Synbiotic Sheep's Milk Ice Cream. *Nutrients* 2023, 15, 14, 3230. <https://doi.org/10.3390/nu15143230>

Punkty MNiSW: 140

IF: 5,900

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego obowiązującego w roku wydania pracy: **480 pkt.**

**Impact Factor** publikacji zgodnie z listą Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania: **20,361.**

(dane: <http://bibliografia.ur.edu.pl/>, współczynnik IF i punktacja podane na rok opublikowania pracy)

## Wykaz skrótów

Skrót	Objaśnienie
<b>AFbb12</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<b>Abb12</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<b>BFLr</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. rhamnosus</i>
<b>BLr</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. rhamnosus</i>
<b>CAF</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. acidophilus</i>
<b>CA</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. acidophilus</i>
<b>CCF</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. casei</i>
<b>CC</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. casei</i>
<b>CPF</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. paracasei</i>
<b>CP</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. paracasei</i>
<b>CLC</b>	Lody/mieszanki fermentowane przez <i>L. casei</i>
<b>CLA</b>	Lody/mieszanki fermentowane przez <i>L. acidophilus</i>
<b>CLP</b>	Lody/mieszanki fermentowane przez <i>L. paracasei</i>
<b>CLR</b>	Lody/mieszanki fermentowane przez <i>L. rhamnosus</i>
<b>CBB12</b>	Lody/mieszanki fermentowane przez <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<b>ILC</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. casei</i>
<b>ILA</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. acidophilus</i>
<b>ILP</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. paracasei</i>
<b>ILR</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>L. rhamnosus</i>
<b>IBB12</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% inuliny fermentowane przez <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<b>IFLC</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. casei</i>
<b>IFLA</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. acidophilus</i>
<b>IFLP</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. paracasei</i>
<b>IFLR</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. rhamnosus</i>
<b>IFBB12</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego

	fermentowane przez <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<b>FLC</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. casei</i>
<b>FLA</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. acidophilus</i>
<b>FLP</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. paracasei</i>
<b>FLR</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>L. rhamnosus</i>
<b>FBB12</b>	Lody/mieszanki z dodatkiem 4% błonnika jabłkowego fermentowane przez <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
<b>JTK</b>	Jednostki tworzące kolonie

## 1. WSTĘP

Mleko owcze jest doskonałym źródłem korzystnych dla zdrowia ludzi składników odżywczych. Według raportu Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Żywności i Rolnictwa (FAO) z 2018 r. mleko owcze (około 10,4 mln ton) produkowane jest głównie w Azji (około 45,6%), przy czym największe ilości pochodzą z Chin i Turcji, a następnie z Europy (około 29,0%) i Afryki (około 24,5%). Szacuje się, że w 2030 r. produkcja mleka owczego wzrośnie o 26%, do około 13,1 mln ton (FAOSTAT, 2018).

Mleko owcze w porównaniu do mleka innych ssaków cechuje się większą zawartością białka ogółem (6,2%), w tym kazeiny (5,1%), suchej masy (19,3%), tłuszczu (7,4%), oraz składników mineralnych (1%) przy jednoczesnym wyższym udziale laktozy (odpowiednio 5,4% w mleku owczym, 3,3–4,8% w mleku krowim) (Ramos i Juarez 2003, Park i in. 2007, Raynal-Ljutovac i in. 2008, Molik i in. 2018). Udowodniono, że mleko owcze ma wyższy ciężar właściwy, lepkość, współczynnik załamania światła, kwasowość miareczkową i niższą temperaturę zamarzania niż mleko krowie (Haenlein i Wendorff 2006). Biorąc pod uwagę wysokie stężenie sprzężonego kwasu linolowego CLA (1,17% mleko owcze, 1,01% mleko krowie, 0,65% mleko kozie) oraz kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3 (o ok. 1% więcej niż w mleku krowim) mleko owcze wykazuje korzystne działanie antyoksydacyjne. Mleko owcze zawiera również najwięcej kwasów orotowych (350 - 450 mg L<sup>-1</sup>) (Patkowska-Sokoła i in. 2001, Cichosz i in. 2004, Yuan i in. 2014, Khosravi i in. 2015, Wang i Lee 2015). Właściwości prozdrowotne mleka owczego wynikają też z obecności innych substancji, a mianowicie:  $\alpha$ -tokoferolu, koenzymu Q10, witaminy A i D, fosfolipidów. Mleko owcze w porównaniu do mleka innych ssaków jest bogatsze w białka serwatkowe (17-22% białek ogółem):  $\beta$ -laktoglobulinę i  $\alpha$ -laktoalbuminę (1,02%) oraz kazeinę (4,18%),  $\alpha$ s1 i  $\alpha$ s2-kazeinę - 48,5% (mleko krowie - 49,6%),  $\beta$ -kazeinę - 38,1% (mleko krowie - 37,3%),  $\kappa$ -kazeinę - 13,4% (mleko krowie - 13,3%) (76-83% wszystkich białek), aminokwasy, w tym lizynę, histydynę, serynę, walinę oraz laktoferynę, która ma zdolność wiązania żelaza wykazując działanie bakteriostatyczne (Park i in. 2007, Ashokbhai i in. 2022). Spośród innych ważnych białek mleka owczego należy wymienić immunoglobuliny, laktoferynę, transferynę, ferrytynę, peptyd proteozowy, kalmodulinę (białko wiążące wapń), prolaktynę oraz białko wiążące kwas foliowy (Park i in. 2007). Białka mleka owczego, poddane trawieniu, w całości pokrywają zapotrzebowanie organizmu na niezbędne aminokwasy egzogenne. Co więcej, mleko owcze wykazuje mniejszą alergenicność w porównaniu z mlekiem kozim i krowim (Masoodi i Shafi 2010). Swoiste przeciwciała u osób uczulonych na mleko (IgE) słabo rozpoznają frakcje białkowe  $\alpha$ s1-kazeiny,  $\alpha$ s2-kazeiny i  $\beta$ -kazeiny z mleka koziego i owczego, czego nie obserwuje się w przypadku mleka krowiego (Ah-Leung i in. 2006, Balthazar i in. 2017). Dlatego też polimorfizm białek odgrywa zasadniczą rolę w wywoływaniu reakcji alergicznej o różnym stopniu nasilenia. Mleko owcze jest pozbawione aglutynin i ma wyższą strawność niż mleko krowie (Park i in. 2007). Z tego powodu spożywanie mleka owczego i jego przetworów jest rekomendowane zarówno dla dzieci, jak i dorosłych. Z licznych badań wynika, że mleko owcze zawiera znacznie wyższą zawartość makroelementów w porównaniu z mlekiem innych ssaków (wapń 193 mg 100 g<sup>-1</sup>, magnez 18 mg 100 g<sup>-1</sup>, fosfor 158 mg 100 g<sup>-1</sup> i potas 136 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Raynal-Ljutovac i in. 2008, Park 2009). W szczególności mleko owcze wykazuje wyższą zawartość o około 36% wapnia niż mleko krowie i o 31%

w porównaniu do mleka koziego (Chia i in. 2017). Dlatego mleko owcze stanowi doskonały surowiec do produkcji lodów mlecznych, z uwagi na bogactwo zawartych w nim składników.

Lody są powszechnie spożywanym i lubianym deserem na całym świecie, a ich konsumpcja stale rośnie (Góral i in. 2018). Najwyższe spożycie lodów odnotowuje się w Nowej Zelandii (28,3 litra na mieszkańca/rok), Stanach Zjednoczonych (20 litrów na mieszkańca/rok), Norwegii i Finlandii (9,5 litra na mieszkańca/rok) oraz Danii (6,5 litra na mieszkańca/rok) (USDA 2022). W Polsce na przestrzeni ostatnich 10 lat konsumpcja lodów wzrosła z około 3,5 litra do około 4 litrów na osobę rocznie (Palka 2015) i nadal rośnie (Woźniak 2019). Lody charakteryzują się atrakcyjnymi walorami sensorycznymi, wartością odżywczą, a przede wszystkim właściwościami orzeźwiającymi. Według Goff (2002) lody to napowietrzona i zamrożona emulsja mleka lub jogurtu, zawierająca połączone agregaty kuleczek tłuszczowych (powstałych podczas zamrażania), oddzielne kuleczki tłuszczowe (powstałe podczas homogenizacji), kryształki lodu, pęcherzyki powietrza, polisacharydy, białka, minerały, cukry oraz wodę.

Technologia produkcji lodów zazwyczaj rozpoczyna się od procesu mieszania, pasteryzacji, homogenizacji i wstępnego chłodzenia mieszanki lodów, która poddawana jest napowietrzaniu i zamrażaniu (Goff 2008, Hartel i in. 2017, Freire i in. 2020). Podczas procesu napowietrzania i zamrażania zachodzi wiele zmian fizykochemicznych, w tym tworzenie i stabilizacja piany na skutek działania białek, częściowa koalescencja emulsji tłuszczowej, powodująca zarówno wchłanianie tłuszczu na granicy powietrza, jak i tworzenie skupisk kuleczek tłuszczu, które stabilizują lamele między pęcherzykami, oraz zamrażanie, w wyniku którego mieszanka jest zagęszczana poprzez usunięcie wody w postaci lodu. Twardość lodów zależy od napowietrzania i wielkości kryształków lodu. Warunkiem wysokiej jakości lodów jest uzyskanie odpowiedniej wielkości kryształków lodu i zminimalizowanie procesu rekrytalizacji podczas przechowywania. Parametry jakościowe lodów są nie tylko bezpośrednio związane z technologią produkcji, ale także z zawartością składników w lodach. Wyższa zawartość tłuszczu oraz białek w mleku owczym wpływa na lepszą jakość sensoryczną lodów. Tłuszcz mleczny znacząco zmienia strukturę lodów podczas ubijania i zamrażania, nadaje im gładkość, kremowość, wpływa na topnienie i właściwości sensoryczne, łagodząc uczucie zimna i szorstkości (Warren i Hartel 2018, Liu i in. 2023). Wcześniejsze badania wykazały, że zdestabilizowany tłuszcz tworzy sieć między przestrzeniami powietrznymi w lodach, zwiększając w ten sposób twardość (Muse i Hartel 2004, Goff i Hartel 2013). Białka pełnią istotną rolę w strukturze lodów. Ich obecność przyczynia się do częściowej koalescencji i formowania struktury tłuszczu, a ponadto są adsorbowane na granicy faz z powietrzem, co prowadzi do zwiększonego napowietrzania, stabilności piany i lodów (Rossa i in. 2011). Według Hartel i in. (2004) obecne w mleku sole mineralne, dodane cukry i laktoza obniżają temperaturę zamrażania mieszanki lodowej, ale również zwiększają uczucie piaszczystości (Alvarez i in. 2005).

Produkty na bazie mleka owczego, ze względu na swoje właściwości odżywcze i antyalergiczne, stanowią czołową pozycję w żywności funkcjonalnej i mogą być dobrym nośnikiem bakterii probiotycznych i prebiotyków. Naukowcy dowiedli, że kultury probiotyczne mają lepszą żywotność w produktach mrożonych niż w fermentowanym mleku (McMahon 1992, Hekmat i Kailasapathy i in. 2003, Mohammadi i in. 2011). Jak podaje International Dairy Foods Association (2022) obecnie światowy rynek lodów charakteryzuje się trendami, które

obejmują naturalne lody, o tzw. czystej etykietce, które uważane są za zdrowe i korzystnie wpływające na kondycję i samopoczucie konsumentów (Teixeira i in. 2023).

Rosnąca świadomość roli mikroflory jelitowej w utrzymaniu zdrowia człowieka sprawia, że na całym świecie prowadzone są intensywne badania nad możliwościami pozytywnej modyfikacji ludzkiego mikrobiomu. Wychodząc naprzeciw zapotrzebowaniu konsumentów na „zdrową żywność”, powstają receptury lodów wzbogacone o wartości odżywcze, jak lody z dodatkiem bakterii probiotycznych i prebiotyków.

Ze względu na wysoką zawartość białka i tłuszczu w mleku owczym, możliwa jest produkcja lodów o większej gęstości, co pozwala na zwiększoną ochronę komórek szczepów probiotycznych przed tlenem na etapie mrożenia i przechowywania lodów oraz podczas ich pasażu przez układ pokarmowy.

Według najnowszych raportów, ponad 60% światowego rynku żywności funkcjonalnej stanowi rynek probiotyków (Misra i in. 2023). Oczekuje się, że wzrośnie on o 8% w latach 2023-2032 (Cunningham i in. 2021, Global Market Insights 2023-2032). Dotychczasowe badania dowodzą, że regularne spożywanie pokarmów i napojów zawierających odpowiednią ilość probiotyków jest bardziej skuteczne w osiąganiu korzyści zdrowotnych niż spożywanie suplementów probiotycznych (McFarland 2010). FAO (Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa) oraz WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) definiują bakterie probiotyczne jako żywe mikroorganizmy, które zapewniają korzyści zdrowotne gospodarzowi (FAO/WHO 2001). Niemniej jednak, do uzyskania efektu probiotycznego, wymagana jest minimalna liczba żywych komórek probiotycznych wynosząca  $10^6$  jtk  $g^{-1}$  -  $10^9$  jtk  $g^{-1}$  produktu spożywczego lub dzienne spożycie w ilości  $10^8$  jtk  $g^{-1}$  a  $10^{11}$  jtk  $g^{-1}$  komórek bakterii (Gibson i in. 2017). Aspekt ten jest wyzwaniem, ponieważ podczas przetwarzania i przechowywania istnieje kilka czynników wpływających na stabilność oraz rozwój i wzrost bakterii probiotycznych. Na przeżywalność szczepów probiotycznych w żywności wpływają różne czynniki, takie jak zawartość tlenu, aktywność wody, temperatura, obróbka termiczna, kwasowość, zawartość wody, stres osmotyczny i materiał opakowania (Feng i in. 2019, Deng i in. 2021, Naseem i in. 2023).

Bakterie probiotyczne są otoczone produkowanymi przez siebie egzopolisacharydami, co zabezpiecza je przed uszkodzeniem, odwodnieniem, antybiotykami, substancjami toksycznymi, stresem osmotycznym i wirusami bakteryjnymi (Castro-Brawo i in. 2018). Ponadto mają zdolność do regulowania wewnątrzkomórkowego pH. Jest to kluczowe, ponieważ umożliwia utrzymanie pH między 4,5 a 7,0 (Gajewska i Błaszczuk 2012). Według Purwandari (2012) aktywność biologiczna egzopolisacharydów jest związana z zawartością wapnia, co również ma wpływ na przeżywalność komórek probiotycznych w przewodzie pokarmowym. W produkcji żywności, najczęściej wykorzystywane są bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Lee i Salminen 2009, Muninathan i in. 2021). Aby zapewnić potencjalne korzyści zdrowotne, mikroorganizmy probiotyczne muszą posiadać zdolność przylegania do nabłonka jelitowego, wykazywać tolerancję na niskie pH kwasu żołądkowego (1-4), działanie enzymów trawiennych soku trzustkowego i soli żółciowych w jelicie, niskie temperatury podczas zamrażania, toksyczne metabolity powstające podczas trawienia i konkurencyjne warunki jelitowe (Mei i in. 2014, Razavi i in. 2021). Badania naukowe potwierdzają bioterapeutyczne działanie probiotyków, m.in. utrzymują równowagę pomiędzy korzystnymi i patogennymi bakteriami obniżając pH treści jelit, wpływając tym

samym również na zwiększenie wchłaniania wapnia i magnezu oraz na wzrost gęstości mineralnej kości, produkcję witamin i enzymów, w leczeniu zaparć, łagodzeniu biegunek, leczeniu nieswoistego zapalenia jelit, wrzodów żołądka, alergii, raka jelita grubego, cukrzycy, stanów zapalnych organizmu, obniżaniu poziomu cholesterolu i trójglicerydów w surowicy krwi, hamowaniu odkładania się tłuszczu wpływając na utratę masy ciała, wzmacnianiu układu odpornościowego, zmniejszaniu objawów nietolerancji laktozy oraz reakcji alergicznych, leczeniu ośrodkowego układu nerwowego (zaburzenia lękowe, depresja, spektrum autyzmu) (Hibberd i in. 2017, Zitvogel i in. 2018, Joy 2019, Lawson i in. 2020, Snigdha i in. 2021, Sharma i Barwa 2022, Harahap i Suliburska 2023, Hao i in. 2023). Ponadto potwierdzono, że dodatek kultur probiotycznych przyczynia się do wydłużenia okresu przydatności do spożycia i poprawy bezpieczeństwa żywności poprzez wydzielanie metabolitów, takich jak bakteriocyny, kwasy: octowy i mlekowy, etanol, dwutlenek węgla, diacetyl oraz nadtlenuk wodoru, hamujących namnażanie i rozwój patogenów, ale także wpływających na smak i zapach oraz zwiększających biodostępność związków bioaktywnych, takich jak witaminy z grupy B, minerały, które poprawiają wartość odżywczą (Kavitake i in. 2018, Collins i in. 2018, Khaneghah i in. 2019, Górska i in. 2019, Indira i in. 2019).

Dieta jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za mikroflorę jelitową, dlatego możliwe jest jej kształtowanie poprzez spożywanie pokarmów zawierających błonnik pokarmowy. Jednak dzienne spożycie błonnika pokarmowego wynosi zwykle mniej niż 15 g, czyli znacznie poniżej zalecanego dziennego spożycia (w Europie zalecane spożycie błonnika szacuje się na 19–38 g/osobę/dzień i różni się w zależności od wieku i płci) (Adouni i in. 2022, Khorasaniha i in. 2023).

Dodatek prebiotyków do produktów mlecznych, takich jak lody z mleka owczego, jest doskonałą alternatywą dla suplementacji błonnika w zalecanych dawkach, zwiększając ich wartość odżywczą, a także poprawiając parametry jakościowe produktu. Dzięki właściwościom żelującym, prebiotyki w lodach mogą poprawiać ich właściwości organoleptyczne. Inulina przyczynia się do poprawy lepkości i odczucia gładkości w ustach. Ponadto udowodniono zdolność inuliny do tworzenia mikrokryształicznych sieci zatrzymujących wilgoć i ograniczający wzrost kryształków lodu podczas procesu zamrażania i przechowywania. Inulina zmniejsza także temperaturę zamrażania mieszanki lodowej i wpływa na topnienie lodów oraz nadaje delikatną, kremową konsystencję przypominającą w odczuciu tłuszcz (Furlan i Campderros 2017). Przyjmuje się, że 1 g inuliny może zastąpić 4 g tłuszczu (Gramza-Michałowska i Górecka 2009). Inulina, będąc 0,4–0,6 razy słodsza niż sacharoza, może być stosowana jako substytut cukru, a także ma działanie emulgujące (Karimi i in. 2015, Rakesh i in. 2015, Bali i in. 2015, Man i in. 2021, Genovese i in. 2022).

Ponadto rozpuszczalne włókna, np. inulina oraz pektyna, są fermentowane przez bakterie probiotyczne wytwarzając korzystne krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) oraz octan, propionian i maślan, gazy (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>) oraz kwas mlekowy (Williams i in. 2017, Gibson i in. 2017, Rahim i in. 2019, Sun i in. 2019). Związki te stymulują wzrost i aktywność probiotyków oraz hamują namnażanie się patogenów w przewodzie pokarmowym (Mattila-Sandholm i in. 2002, Roberfroid 2002, Gibson 2004). Włókna prebiotyczne obniżają poziom lipidów, regulują metabolizm cukrów, stymulują perystaltykę przewodu pokarmowego i łagodzą zaparcia, zmniejszają ryzyko wystąpienia nowotworu, obniżają poziom amoniaku we krwi i zwiększają stymulację odpowiedzi immunologicznej (Bruno-Barcena i Azcarate-Peril

2015). Również zmniejszają ryzyko depresji i zwiększają wchłanianie minerałów, przede wszystkim żelaza i wapnia (Maawia i in. 2016, Gibson i in. 2017, Baye i in. 2017, Martel i in. 2022). Badając wpływ obecnej między innymi w błonniku jabłkowym pektyny na aktywność amylazy u myszy w warunkach wysokiego stężenia lipidów i glukozy, Hamden in. (2018) odkryli, że pektyna może znacząco hamować aktywność  $\beta$ -amylazy i prowadzić do 24% obniżenia poziomu glukozy we krwi. Według Manninga i Gibsona (2004), aby znacząco zwiększyć liczbę bifidobakterii w jelitach człowieka, konieczne byłoby podawanie fruktooligosacharydów (FOS) w dawce co najmniej 4 g/dobę, a najlepiej 8 g/dobę.

Składniki mineralne, przede wszystkim makroelementy, odgrywają bardzo ważną rolę prawidłowym funkcjonowaniu tkanek i narządów, co potwierdzają liczne badania naukowe. Bioprzyzwajalność to złożony proces, który definiuje się jako ilość spożytego składnika odżywczego z pożywieniem, który przechodzi przez przewód pokarmowy, jest absorbowany do krwioobiegu, przenika do tkanek i jest wykorzystywany w fizjologicznych funkcjach organizmu lub magazynowany (Etcheverry i in. 2012). Biodostępność natomiast jako „frakcję składnika żywności, która jest uwalniana z matrycy żywnościowej w przewodzie pokarmowym i staje się dostępna do wchłaniania” (Buniowska i in. 2017, Ariza i in. 2018). Zawartość makroelementów w produktach mlecznych jest zróżnicowana. Przyczyną tych różnic mogą być procesy technologiczne, takie jak obróbka cieplna, homogenizacja, pasteryzacja, rodzaj kultury starterowej, czas fermentacji oraz warunki i czas przechowywania produktu (Serafeimidou i in. 2013, Gassem i in. 2016, Paszczyk i Tońska 2022). Czynniki te skutkują zmianami strukturalnymi, które mogą wpływać na trawienie, kinetykę dostarczania minerałów i w rezultacie na biodostępność składników mineralnych z produktów mlecznych (Turgeon i Brisson 2020, Mulet-Cabero i in. 2020).

Na biodostępność minerałów wpływają także czynniki endogenne, do których zalicza się stan zdrowia, wiek, płeć, formę występowania, interakcje pomiędzy jednocześnie przyjmowanymi minerałami, czy prawidłowe funkcjonowanie przewodu pokarmowego, a także obecność substancji ułatwiających wchłanianie, tj. błonnika pokarmowego i bakterii probiotycznych. Biodostępność wapnia wynosi średnio 30-40% i wzrasta w obecności aminokwasów, laktozy, soli kwasów żółciowych, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, fosfowityny i kazeiny, witaminy D, białka, bakterii kwasu mlekowego oraz inuliny. W przypadku magnezu biodostępność wynosi około 50% i wzrasta w obecności białka, laktozy, nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz witamin B<sub>6</sub> i D. Skutecznym sposobem określenia biodostępności składników odżywczych jest zastosowanie metody symulowanego trawienia *in vitro* w warunkach laboratoryjnych (Garcia i in. 1998). Z uwagi na fakt, że badania *in vitro* są preferowaną metodą w ocenie skuteczności stosowania probiotyków, prebiotyków oraz biodostępności minerałów, istotne jest jednak uwzględnienie ograniczeń związanych z kosztami, czasem oraz kwestiami etycznymi. Badania *in vitro* charakteryzują się jednak lepszą powtarzalnością i mniejszą zmiennością. Symulowane procesy trawienia zazwyczaj obejmują fazę ustną, żołądkową, i jelita cienkiego, a czasami też także jelito grube, w ustalonych warunkach między innymi obecności enzymów trawiennych i ich stężeń, pH, czasu trawienia i stężenia soli i kwasów (Shen i in. 1994). Wchłanianie strawionych produktów w modelach *in vitro* jest symulowane za pomocą błon dializacyjnych (Miller i in. 1981). Zgodnie z wcześniejszymi badaniami, metody dializy są przydatne w analizie biodostępności związków takich jak kwasy fenolowe, flawonoidy, antocyjany, witamina C i minerały (Thakur

i in. 2020). Aby zapewnić maksymalne korzyści odżywcze i zdrowotne, kluczowe staje się zrozumienie, w jaki sposób produkt spożywczy zmienia się trakcie procesu technologicznego, a następnie trawienia oraz w jakim stopniu jest wchłaniany przez organizm.

## 2. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE

### 2.1 Cel pracy

Głównym celem pracy było określenie możliwości zastosowania 5 różnych szczepów probiotycznych (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactocaseibacillus paracasei* L-26, *Lactocaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5) w produkcji lodów z mleka owczego z dodatkiem inuliny i błonnika jabłkowego. Również określono właściwości fizykochemiczne mieszanek lodowych bezpośrednio po kondycjonowaniu oraz lodów po 7 i 21 dniach przechowywania zamrażalniczego. Postanowiono także określić biodostępność makroelementów (wapń, magnez, potas, fosfor) oraz przeżywalność szczepów probiotycznych w warunkach symulowanego trawienia *in vitro*.

### 2.2 Zakres pracy

Zakres doświadczalny pracy obejmował ocenę jakości mleka owczego surowego, produkcję mieszanek lodowych z różnym udziałem inuliny i błonnika jabłkowego oraz fermentowanych przez różne szczepy probiotyczne, ocenę jakości mieszanek lodowych oraz właściwości fizykochemicznych, organoleptycznych i mikrobiologicznych lodów w czasie przechowywania zamrażalniczego, określenie biodostępności makroelementów z lodów probiotycznych w układzie pokarmowym oraz określenie przeżywalności szczepów probiotycznych w warunkach symulowanego trawienia *in vitro*.

### 2.3 Hipotezy badawcze

**H1:** zastosowanie różnych szczepów bakterii probiotycznych kształtuje cechy fizykochemiczne i organoleptyczne lodów z inuliną.

**H2:** czas przechowywania lodów kształtuje cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne lodów z mleka owczego.

**H3:** rodzaj zastosowanych błonników kształtuje cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne lodów.

**H4:** biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego zależy od zastosowanego szczepu bakterii probiotycznych.

**H5:** zastosowanie błonników kształtuje biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego.

**H6:** przeżywalność bakterii w układzie pokarmowym zależy od zastosowanego szczepu probiotycznego.

**H7:** przeżywalność bakterii probiotycznych w układzie pokarmowym zależy od rodzaju zastosowanych błonników.

## 3. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

### 3.1 Materiał badawczy

#### 3.1.1 Mleko

Materiałem do produkcji lodów było surowe mleko owcze pozyskane w czerwcu (środkowa faza laktacji) z doju porannego, zakupione w gospodarstwie „Owczza Zagroda” (Wyżne, Polska) (**publikacja 1, 2, 3, 4**). Szczegółowe informacje dotyczące liczebności stada, sposobu żywienia i prowadzenia doju zostały zamieszczone w **publikacji 2**.

#### 3.1.2 Błonnik pokarmowy

Do produkcji lodów wykorzystano:

- inulinę, o składzie zadeklarowanym przez producenta (Orafti HP, Belgia): węglowodany 97 g/100 g, w tym cukry 7 g/100 g, błonnik 90 g/100 g, tłuszcz 0 g/100 g, białko 0 g/100 g (**publikacja 1, 2, 3, 4**)
- błonnik jabłkowy, o składzie zadeklarowanym przez producenta (Aura Herbals Jarosław Paul, Polska): węglowodany 87 g/100 g, w tym cukry 27 g/100 g, błonnik 51 g/100 g, tłuszcz 3,3 g/100 g, białko 5,1 g/100 g (**publikacja 1, 2, 3, 4**)

#### 3.1.3 Kultury starterowe

Do fermentacji mieszanek lodowych wykorzystano liofilizowane kultury starterowe, stosowane w przemyśle mleczarskim (Chr. Hansen, Dania):

- *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 (**publikacja 1, 3, 4**)
- *Lactocaseibacillus rhamnosus* (**publikacja 1, 3, 4**)
- *Lactocaseibacillus paracasei* L26 (**publikacja 2, 3, 4**)
- *Lactocaseibacillus casei* 431 (**publikacja 2, 3, 4**)
- *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (**publikacja 2, 3, 4**)

#### 3.1.4 Dodatki

- sacharoza (Cukier Polski, Polska) (**publikacja 1, 2, 3, 4**)

#### 3.1.5 Odczynniki chemiczne i materiały

##### 3.1.5.1 Trawienie *in vitro*

Enzymy i odczynniki:

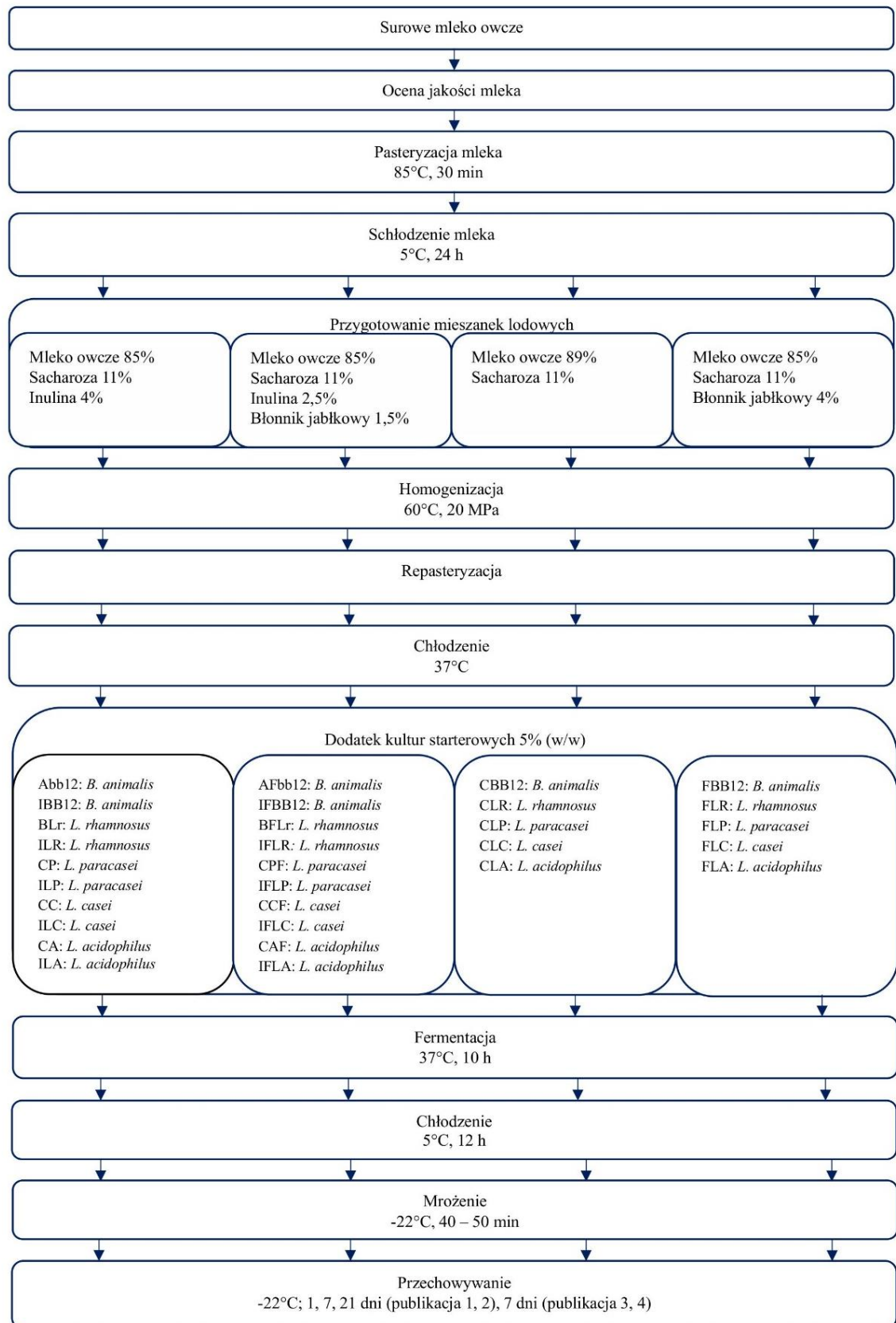
- $\alpha$ -amylaza (TDF-100A, 24 975 U ML<sup>-1</sup>), (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)
- mucyna z żołądka wieprzowego (typ II), (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)
- pepsyna z błony śluzowej żołądka wieprzowego (250 U mg<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)
- ekstrakt z żółci wieprzowej (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)
- pankreatyna z trzustki wieprzowej (8 × specyfikacje USP) (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)

- wodorofosforan disodowy bezwodny, czysty pa  $\geq 99,0\%$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $141,96 \text{ g mol}^{-1}$  (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- wodorofosforan dipotasowy,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $174,18 \text{ g mol}^{-1}$  (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- chlorek sodu, czysty pa  $\geq 99,9 \%$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $58,44 \text{ g mol}^{-1}$ , (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- kwas solny,  $\text{HCl}$  12 M (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- wodorotlenek sodu,  $\text{NaOH}$  1 M (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- kwas azotowy,  $\text{HNO}_3$  (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- sól disodowa EDTA,  $\text{EDTA Na}_2$  0,01 M (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- wodorowęglan sodu,  $\text{NaHCO}_3$  2% (Chempur, Polska) (**publikacja 3, 4**)
- wodorowęglan sodu,  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)
- dodecylosiarczan sodu,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  0,1% (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 3, 4**)
- membrana celulozowa do dializy (średnia szerokość płaska 25 mm, masa cząsteczkowa = 14 000) (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 4**)

### 3.1.5.2 Odczynniki do oznaczeń fizykochemicznych i mikrobiologicznych

- wodorotlenek sodu,  $\text{NaOH}$  0,1 N (Chempur, Polska) (**publikacja 1, 2, 3, 4**)
- eter dietylowy,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$  (Chempur, Polska) (**publikacja 1, 2**)
- kwas azotowy,  $\text{HNO}_3$  65% (Chempur, Polska) (**publikacja 4**)
- certyfikowane wzorce Ca, Mg, P, K, 10000 ppm (Merck, Niemcy) (**publikacja 4**)
- certyfikowany materiał odniesienia (CRM) NIST-1515 (Sigma-Aldrich, USA) (**publikacja 4**)
- podłoże agarowe MRS De Man, Rogosa Shapre (Biocorp, Polska) (**publikacja 1, 2, 3**)
- roztwór peptonowy, 0,1% (BTL Sp. z o.o., Polska) (**publikacja 1, 2, 3**)
- generator atmosfery beztlenowej GenBox anaer (Biomerieux, Polska) (**publikacja 1, 2, 3**)
- wskaźnik atmosfery beztlenowej Anaer (Biomerieux, Polska) (**publikacja 1, 2, 3**)

### 3.2 Technologia produkcji lodów probiotycznych



Schemat 1. Technologia produkcji lodów

Źródło: opracowanie własne na podstawie publikacji 1 – 4

W celu przygotowania mieszanek lodowych mleko podzielono na cztery części i dodano odpowiednie dodatki (schemat 1). Każdą mieszanekę lodową ogrzewano do temperatury 60°C i homogenizowano pod ciśnieniem 20 MPa, za pomocą homogenizatora laboratoryjnego (Nuoni GJJ-0.06/40, Chiny – **publikacja 1 i 2**; CAT UNIDRIVE X 1000 D, Niemcy – **publikacja 3 i 4**), a następnie pasteryzowano w kąpeli wodnej w temperaturze 85°C. Po obróbce cieplnej mieszanki schłodzono do temperatury 37°C.

Inokulum dla każdego wariantu bakterii probiotycznej przygotowano zgodnie z metodą Mituniewicz-Małek i in. (2017) oraz Kowalczyk i in. (2022). Wykorzystano monokultury probiotyczne zestawione w punkcie 3.1.3. Monokultury bakterii probiotycznych, w ilości 10 mg L<sup>-1</sup> (w/w), aktywowano w temperaturze 40°C do uzyskania 9 log jtk g<sup>-1</sup>.

Następnie inokulum dodawano do mieszanek lodowych w ilości 5% (w/w). Fermentację prowadzono w inkubatorze (ILW 115, POL-EKO-Aparatura, Polska) w temperaturze 37°C przez 10 godzin, a następnie mieszanki chłodzono do temperatury 5°C i kondycjonowano w tej temperaturze przez 12 godzin.

Mieszanki poddano mrożeniu we frezerze DeLux 48816 (UNOLD AG, Niemcy) przez 40-50 minut przy temperaturze zamrażania do -22°C. Lody zapakowano do zakodowanych plastikowych opakowań jednostkowych o pojemności 100 ml z wieczkiem i przechowywano w temperaturze -22°C przez 7 (**publikacja 3 i 4**) lub 1, 7 i 21 dni (**publikacja 1 i 2**). Eksperyment powtórzono trzykrotnie dla każdego wariantu lodów.

### 3.3 Metody badań

#### 3.3.1 Ocena składu chemicznego

Do oznaczenia zawartości białka, tłuszczu i laktozy (%) w mleku owczym (**publikacja 1, 2, 4**), mieszanek lodowych (**publikacja 1, 2**) oraz lodach (**publikacja 1**) zastosowano analizator składu mleka i produktów mlecznych Bentley B-150 (Bentley Instruments, Inc., USA).

#### 3.3.2 Kwasowość

- Wartość pH mleka (**publikacja 1, 2, 3, 4**), mieszanek lodowych (**publikacja 1, 2**) i lodów (**publikacja 1, 2**) oznaczono metodą potencjometryczną przy użyciu miernika pH FiveEasy z elektrodą In-Lab®®Solids Pro-ISM ze zintegrowanym czujnikiem temperatury (Mettler Toledo, Szwajcaria)
- Zawartość kwasu mlekowego (w g kwasu mlekowego L<sup>-1</sup>) została zmierzona w mieszanek lodowych (**publikacja 1, 2**) i rozpuszczonych lodach (**publikacja 1, 2**), przy wykorzystaniu metody Jemaa i in. (2017)

#### 3.3.3 Barwa

Pomiaru barwy lodów dokonano za pomocą metody instrumentalnej w systemie CIELab. Zmierzone zostały składowe: L\*- jasność; a\* odcień czerwonego (+), odcień zielonego (-); b\* odcień żółtego (+), odcień niebieskiego (-); C\*- nasycenie i czystość koloru

oraz  $h^0$  - odcień koloru, za pomocą kolorymetru (Precision Colorimeter, model nr 145, Chiny) (**publikacja 1, 2**).

### 3.3.4 Puszystość

Ocena puszystości została przeprowadzona na podstawie stosunku objętości powietrza w lodach zamrożonych do jego objętości w roztopionych lodach według metody Rezaei (2014). Jako rozpuszczalnik został użyty eter dietylowy (**publikacja 1, 2**).

### 3.3.5 Całkowity czas topnienia oraz czas pojawienia się pierwszej kropli

Aby ocenić całkowity czas topnienia oraz czas pojawienia się pierwszej kropli próby lodów zostały umieszczone na siatce ze stali nierdzewnej (średnica 95 mm, otwory  $5 \times 5$  mm, grubość drutu 0,5 mm) w temperaturze  $23^\circ\text{C}$  (**publikacja 1**) i  $22^\circ\text{C}$  (**publikacja 2**). Odnotowano czas pojawienia się pierwszej kropli oraz całkowity czas topnienia lodów według Goff i Hartel (2013).

### 3.3.6 Ocena mikrobiologiczna

Liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w mieszankach lodowych (**publikacja 1, 2**), lodach (**publikacja 1, 2, 3, 4**) oraz lodach na każdym etapie trawienia *in vitro* (**publikacja 3, 4**) określono metodą płytkową (posiew wgłębnny) z wykorzystaniem podłoża agar MRS. 10 g każdej próby rozcieńczano w 90 ml sterylnej wody peptonowej (0,1%) i wykonywano rozcieńczania od  $1 \log \text{ jtk g}^{-1}$  do  $8 \log \text{ jtk g}^{-1}$ . Inkubację prowadzono w inkubatorze w atmosferze beztlenowej, w ekcykatorze próżniowym, z użyciem generatorów GenBox anaer, w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 72 godziny. Do monitorowania warunków beztlenowych zastosowano wskaźnik Anaer. Wyrosłe kolonie bakterii probiotycznych zliczano za pomocą licznika kolonii (TYP J-3, Chemland, Stargard Szczeciński, Polska), a liczbę żywych komórek bakterii wyrażono jako  $\log \text{ jtk g}^{-1}$ .

### 3.3.7 Oznaczanie zawartości makroelementów

Oceniane próbki mleka, inuliny, błonnika jabłkowego oraz lodów przed trawieniem oraz po każdym etapie trawienia *in vitro* poddano mineralizacji wysokociśnieniowej w 65%  $\text{HNO}_3$  w mineralizatorze mikrofalowym Ethos Ultrawave-One (Milestone SRL, Włochy). Zawartość składników mineralnych (Ca, Mg, P, K), w  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  produktu, oznaczano techniką atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej z wykorzystaniem analizatora ICP-OES iCAP Dual 6500 (Thermo Scientific TM, USA). Szczegółowy opis procedury mineralizacji i oznaczenia zawartości związków mineralnych został przedstawiony w **publikacji 4**.

### 3.3.8 Trawienie *in vitro* oraz ocena przeżywalności bakterii probiotycznych i biodostępności składników mineralnych.

Model trawienia enzymatycznego *in vitro* obejmujący etapy jamy ustnej, żołądka oraz jelita cienkiego został wykorzystany do oceny przeżywalności bakterii probiotycznych (**publikacja 3**), natomiast na etapie jamy ustnej, żołądka, oraz jelita cienkiego i dializatu do oceny biodostępności makroelementów (**publikacja 4**).

Proces symulowanego trawienia *in vitro* został przeprowadzony zgodnie z metodą przedstawioną przez Buniowską i in. (2017) oraz Camelo-Silva (2022), z modyfikacjami. Lody zostały poddane symulowanemu trawieniu po 7 dniach przechowywania w temperaturze -22°C. Szczegółowy opis procesu trawienia został opisany w **publikacji 3 i 4**.

### 3.3.9 Ocena organoleptyczna

Ocena organoleptyczna lodów została przeprowadzona przez 20-osobowy (**publikacja 1**) i 15 osobowy (**publikacja 2**) panel przeszkolonych ekspertów. Próby lodów zakodowane trzycyfrowym losowym kodem, zostały ocenione w dziewięciopunktowej skali liniowej ustrukturyzowanej, z oznaczeniami brzegowymi. Lewy brzeg skali oznaczał cechy lodów: mało charakterystyczny wygląd, piaszczyste (gładkość), miękkie (twardość), natychmiastowa rozpuszczalność, ciemna barwa, słabo wyczuwalny (smak, zapach). Prawa strona skali określała cechy: bardzo charakterystyczny wygląd, twarde (twardość), bardzo gładkie (gładkość), opóźniona rozpuszczalność, jasna barwa, bardzo intensywny (smak i zapach).

### 3.3.10 Analiza statystyczna

Z uzyskanych wyników obliczono średnią i odchylenie standardowe przy użyciu programu Statistica v. 13.1 (StatSoft, USA) (**publikacja 1-4**). Przeprowadzona została jednoczynnikowa (**publikacja 1-4**), dwuczynnikowa (**publikacja 1-4**) oraz trzyczynnikowa (**publikacja 1, 2, 3**) analiza wariancji ANOVA. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi zweryfikowano za pomocą testu Tukeya ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. OPIS WYNIKÓW I OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH

### 4.1 Właściwości mieszanek lodowych

Struktura lodów została określona jako złożona matryca, składająca się z pęcherzyków powietrza, kuleczek tłuszczu oraz cząstek lodu, rozproszonych w niezamrożonym roztworze wodnym (Goff i Hartel 2013). Zgodnie z przeglądem przeprowadzonym przez Corvitto (2011) standardowe proporcje składników mieszanki lodowej opartej na mleku obejmują 64% wody, 18% cukrów, 10% beztłuszczowej suchej masy mleka oraz 8% stałych tłuszczów mleka. Oczekuje się, że przy tych parametrach lody będą charakteryzowały się stabilną strukturą, zachowującą swoje właściwości w ujemnej temperaturze, gładką teksturą (bez pojawiania się kryształków lodu) oraz stabilnością (zachowuje swoje właściwości w temperaturze serwowania). Inni autorzy, jak Clark (2012) i Goff (1997), przedstawiają odmienne proporcje składników w standardowych lodach. Według nich, standardowe lody składają się z 7-15% tłuszczu, 4-5% białka mleka 5-7% laktozy, oraz 12-15% roztworu cukru. W standardowych lodach uwzględnia się również inne składniki, takie jak stabilizatory, emulgatory i aromaty, których zawartość wynosi 0,5%, suchą masę, która mieści się w przedziale 28-40%, a zawartość wody oscyluje między 60% a 72%. Marshall i Arbuckle (1996) zauważyli, że zakres składu może być rozszerzony, przy czym zawartość tłuszczu może sięgać od 8% do 20%, beztłuszczowa sucha masa mleka od 8% do 15%, cukier od 13% do 20%, a stabilizator - emulgator od 0% do 0,7%. Całkowita zawartość substancji stałych mieści się w przedziale od 36% do 43%. Według Goff i Hartel (2013) przeciętne lody zawierają 3-4 razy więcej tłuszczu i około 12-16% więcej białka niż mleko.

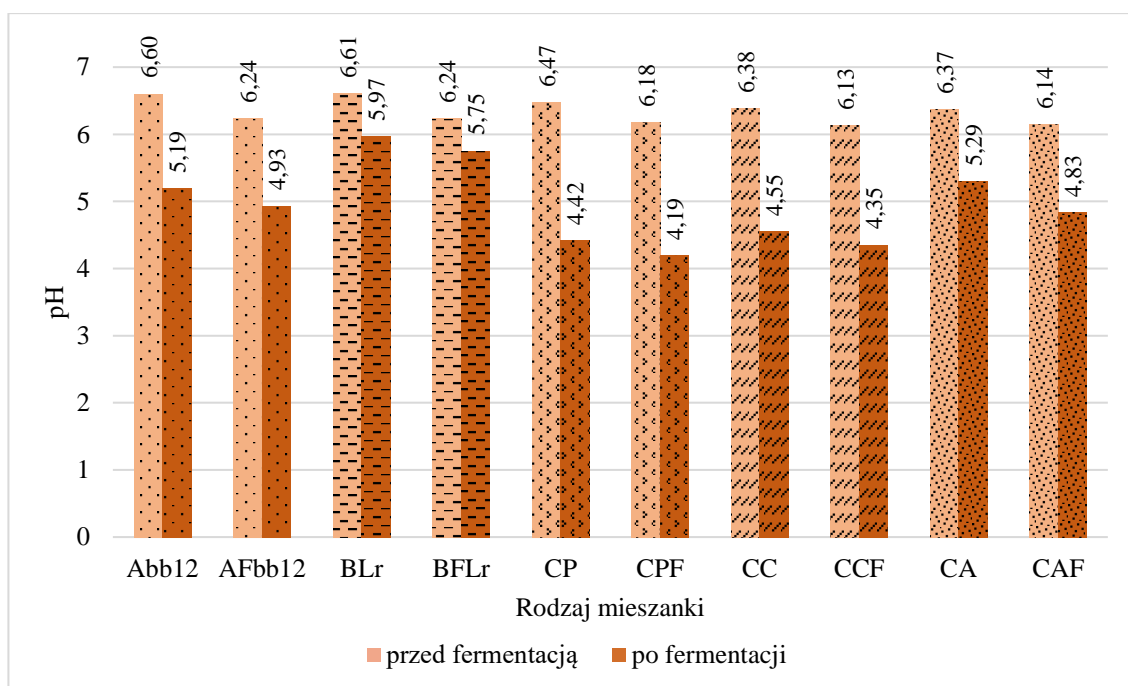
Receptura lodów może mieć wpływ na różnorodne cechy mieszanki lodowej, w tym na jej właściwości reologiczne, które są kluczowe dla końcowej tekstury lodów. Gładkość i uczucie chłodzenia są powszechnie pożądanymi cechami lodów. Badania wyraźnie wskazują na istotną rolę tłuszczu mlecznego w strukturze lodów, ponieważ kuleczki tłuszczu mają tendencję do gromadzenia się na powierzchni pęcherzyków powietrza, co wpływa na ich teksturę i stabilność. Dodatkowo, tłuszcz mleczny przyczynia się do zwiększenia lepkości mieszanki lodowej, zwiększa bogactwo smaku lodów, pomaga stabilizować pianę, w dużej mierze odpowiadającą za kremową konsystencję, zapewnia dobre właściwości topnienia, zmniejszenia rozmiarów cząstek lodu (Marshall i Arbuckle 1996).

Na strukturę lodów wpływają zarówno składniki użyte w recepturze, jak i procesy produkcyjne, takie jak pasteryzacja, homogenizacja, dojrzewanie, temperatura zamrażania i przechowywanie (Patel i in. 2006, Park i in. 2015, Rolon i in. 2017). Homogenizacja jest kluczowym procesem, którego celem jest zmniejszenie wielkości kuleczek tłuszczu, co prowadzi do większej stabilności i lepkości mieszanki lodowej (Goff 1997, Marshall i Arbuckle 1996). Do homogenizacji mieszanki lodowej stosuje się na ogół ciśnienia w zakresie od 6 MPa do 20 MPa (Marshall i Arbuckle 1996). Jednak wykazano również, że homogenizacja pod wysokim ciśnieniem (200-400 MPa) zmniejsza zapotrzebowanie na stabilizatory (Monteagudo i in. 2017) i ułatwia większą interakcję między białkami i polisacharydami, prowadząc w ten sposób do stabilnej struktury sieciowej (Martinez i in. 2020). Dodatkowo, proces dojrzewania mieszanki w odpowiedniej temperaturze może wpłynąć na poprawę jakości i konsystencji lodów poprzez lepsze uwodnienie białek mleka i stabilizatorów, a także krystalizację kuleczek

tłuszczu. W efekcie uzyskuje się sieć częściowo aglomerowanych kuleczek, które otaczają komórki powietrza, prowadząc do bardziej stabilnej struktury pianki.

W badaniach własnych mieszanki lodowe zawierały od 3,68% (CC) do 5% (AFbb12) białka, od 5,97% (AFbb12) do 6,46% (CCF) tłuszczu oraz od 18,04% (Abb12) do 18,50% (CAF) węglowodanów. Należy dodać, że mieszanki fermentowane przez *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactocaseibacillus casei* i *Lactobacillus acidophilus* (**publikacja 2**) miały niższą zawartość białka o 1,1-1,3%, niż mieszanki z *Lactocaseibacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (**publikacja 1**). Różnice te wynikają z ilości białka w mleku owczym użytym do produkcji.

Badacze Vardar i Öksüz (2007) zaobserwowali podobny poziom zawartości tłuszczu (5,77–5,90%) w lodach mlecznych zawierających truskawki i bakterie probiotyczne. W badaniach przeprowadzonych przez Akalin i Erişir (2008) opracowano lody mleczne z dodatkiem probiotyków, cechujące się całkowitą zawartością suchej masy wynoszącą 33%, w tym 4% błonnika. Natomiast Homayouni i in. (2008) badali lody synbiotyczne o wyższej zawartości suchej masy (38,5%) i tłuszczu (8,1%). Z kolei lody wytwarzane z mleka owczego przez Balthazar i in. (2017) cechowały się wyższą zawartością tłuszczu (10,03%) i niższą zawartością białka (3,2%).



Wykres 1. Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na wartość pH mieszanek lodowych przed i po fermentacji

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

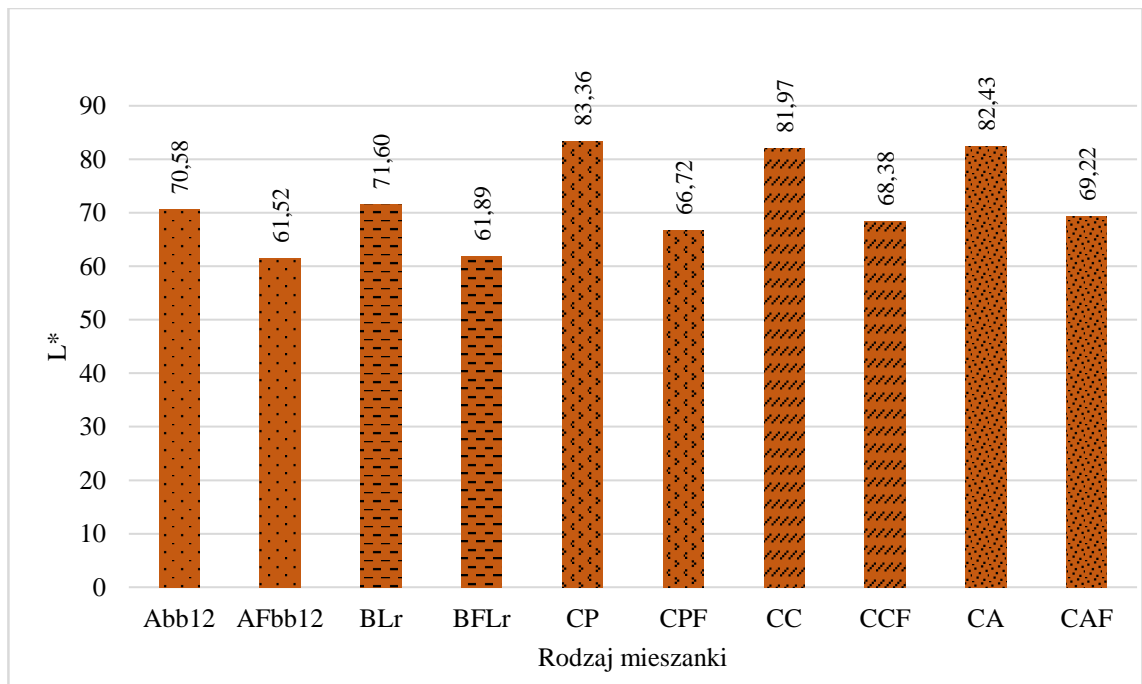
Należy dodać, że głównym źródłem węgla dla bakterii może być laktoza lub dodane sacharydy. Jednak częściowe zastąpienie inuliny błonnikiem jabłkowym oraz fermentacja mieszanek lodowych różnymi szczepami probiotycznymi nie różnicowała istotnie zawartości węglowodanów w mieszankach lodowych AFbb12, BFLr, CPF, CCF i CAF (**publikacja 1 i 2**). Również w badaniu Góral i in. (2018) nie zarejestrowano istotnego wpływu rodzaju, gatunku oraz szczepu badanych bakterii, a także dodatku magnezu na zawartość węglowodanów

(26,52–27,48%) w lodach. W badaniu przeprowadzonym przez Balthazar i in. (2017B) zawartość węglowodanów oznaczono w przedziale od 18,1% do 18,6% w lodach z mleka owczego, a więc podobnie jak w **publikacji 1 i 2**.

Dodatek 1,5% błonnika jabłkowego obniżył wartość pH mieszanek lodowych (AFbb12, BFLr, CPF, CCF, CAF) jeszcze przed fermentacją, o około 0,2 - 0,3 jednostki, w porównaniu z próbkami z 4% dodatkiem inuliny (wykres 1). Również po fermentacji mieszanki lodowe z błonnikiem jabłkowym charakteryzowały się istotnie niższą (od 0,46 - CAF do 0,26 - AFbb12) wartością pH niż mieszanki sporządzone wyłącznie z inuliną (Abb12, BLr, CP, CC, CA). Istotne różnice w wartości pH stwierdzono również w zależności od szczepu przeprowadzającego fermentację. Najwyższą wartość pH stwierdzono w mieszankach fermentowanych przez *L. rhamnosus* (BLr, pH=5,97 oraz BFLr, pH=5,75). W tych mieszankach (z *L. rhamnosus*) także wykazano istotnie niższą ( $p \leq 0,05$ ) zawartość kwasu mlekowego, mieszczącą się w przedziale od 0,38 g L<sup>-1</sup> (BLr) do 0,42 g L<sup>-1</sup> (BFLr). Natomiast najniższą wartość pH oznaczono w mieszankach fermentowanych przez *L. paracasei*: CP - pH=4,42, CPF - pH=4,19 (wykres 1). W tych mieszankach zawartość kwasu mlekowego wynosiła kolejno od 0,77 g L<sup>-1</sup> do 0,97 g L<sup>-1</sup>. Prawdopodobnie wynika to ze specyfiki szczepu *L. paracasei*, ponieważ w przeciwieństwie do szczepu *L. casei*, metabolizuje laktozę na drodze fermentacji do kwasu L (+) mlekowego. Ponadto około 50% komórek tego szczepu wykazuje zdolność do fermentacji inuliny (Minervini 2011).

Przeprowadzone badania wskazują, że przy zachowaniu tych samych warunków fermentacji dla wszystkich mieszanek, zawsze niższą wartość pH i wyższą zawartość kwasu mlekowego otrzymano w mieszankach z błonnikiem jabłkowym (AFbb12, BFLr, CPF, CCF, CAF) w porównaniu do ich odpowiedników zawierających tylko inulinę (Abb12, BLr, CP, CC, CA), co wynika z obecności w błonniku jabłkowym kwasów organicznych (0,6 - 0,9%), takich jak: jabłkowy, chinowy, cytrynowy i szikimowy, które najprawdopodobniej zwiększyły kwasowość ogólną (Giryn i in. 2004). Obniżenie poziomu pH mieszanek wynika także z aktywności metabolicznej szczepów probiotycznych obecnych w mieszance lodowej oraz z dodatku preparatów prebiotycznych, tj. błonnika jabłkowego. Trójczynnikiowa analiza wariancji wykazała, że rodzaj bakterii probiotycznych w istotny sposób wpływa na wartość pH i zawartość kwasu mlekowego w mieszankach lodowych (**publikacja 1 i 2**).

Składowa barwy L\* oznacza jasność (luminację) i przyjmuje wartości od 0 (czerń) do 100 (biel). Najwyższe wartości jasności L\* (83,36) dla mieszanek lodowych z inuliną uzyskano dla mieszanki CP fermentowanej przez *L. paracasei* (**publikacja 2**, wykres 2). Natomiast najniższą jasnością (61,52) charakteryzowała się mieszanka Abb12 fermentowana przez *Bifidobacterium* (**publikacja 1**). Częściowe zastąpienie inuliny 1,5% dodatkiem błonnika jabłkowego spowodowało pociemnienie barwy tych mieszanek lodowych. Dodatek 1,5% błonnika jabłkowego zmniejszył jasność barwy o około 9 jednostek w mieszankach AFbb12 i BFLr (**publikacja 1**, wykres 2). Natomiast w mieszankach fermentowanych przez *L. casei* (CC), *L. paracasei* (CP) i *L. acidophilus* (CA) wprowadzenie 1,5% błonnika jabłkowego zmniejszało wartość parametru L\* odpowiednio o: 13,59, 16,64, 13,21 (**publikacja 2**).



Wykres 2. Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na jasność L\* mieszanek lodowych po fermentacji

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Składowa barwy  $a^*$  określa udział koloru od zielonego ( $-a^*$ ) do czerwonego ( $+a^*$ ). W mieszanekach lodowych tylko z inuliną stwierdzono ujemne wartości parametru  $a^*$ , świadczące o wyższym udziale barwy zielonej niż czerwonej. W zależności od rodzaju użytego szczepu do fermentacji mieszanek stwierdzono różnice w wartości parametru  $a^*$  w mieszanekach z inuliną: od  $-0,04$  w mieszance Abb12 (mieszanka z *Bifidobacterium*) do  $-1,88$  w mieszance CP (z *L. paracasei*). Z kolei 1,5% dodatek błonnika jabłkowego istotnie zwiększył udział koloru czerwonego w mieszanekach AFbb12, BFLr (**publikacja 1**) oraz CPF, CCF, CAF (**publikacja 2**), w porównaniu do ich odpowiedników tylko z inuliną. Najwyższe wartości parametru  $a^*$  oznaczono w mieszance CCF =  $4,40$  oraz AFbb12 =  $4,29$ . Wyższy udział barwy czerwonej niż zielonej wynika z zawartych w błonniku jabłkowym związków fenolowych i pektyn (Hu i in. 2023). Beżowa barwa błonnika jabłkowego, ujawniająca się w procesie suszenia pozostałości po przetworzeniu jabłek, jest efektem działania enzymu oksydazy polifenolowej, który prowadzi do utleniania polifenoli i wywołuje brązowienie proszku. Podobny efekt obserwuje się w wyniku nieenzymatycznej reakcji brunatnienia, gdzie cukry oddziałują z aminokwasami. Ten proces ma miejsce w podwyższonej temperaturze, przy wilgotności na poziomie około 30% (Roos 2001, Perera 2005, Hu i in. 2023). Wyniki badań Rzący i Witrowej-Rajchert (2007) wykazały obecność znaczącej ilości barwników czerwonych i żółtych w suszu błonnika jabłkowego. Ta obserwacja pozwala na lepsze zrozumienie istotnej roli tych związków w kształtowaniu barwy lodów w kontekście przeprowadzonych badań własnych.

Składowa barwy  $b^*$  reprezentuje kolor niebieski ( $-b^*$ ) i żółty ( $+b^*$ ). We wszystkich mieszanekach lodowych odnotowano wartość dodatnią parametru  $b^*$ , która świadczy o większym udziale barwy żółtej (**publikacja 1 i 2**). Najniższą wartość parametru  $b^*$ ,

świadcząca o najmniejszym udziale barwy żółtej, oznaczono w mieszankach B<sub>Lr</sub> (**publikacja 1**). Natomiast najwyższy udział barwy żółtej oznaczono w mieszance z błonnikiem jabłkowym CAF, fermentowanej przez *L. acidophilus* (**publikacja 2**). Jedynie w mieszance fermentowanej przez *B. animalis* (AFbb12) dodatek błonnika jabłkowego istotnie obniżył udział barwy żółtej, lecz zwiększył czerwonej, w porównaniu do próby z 4% dodatkiem inuliny Abb12 ( $p \leq 0,05$ ). W pozostałych mieszankach (**publikacja 1 oraz 2**) wprowadzenie błonnika jabłkowego spowodowało istotne zwiększenie parametru  $b^*$ , czyli zwiększenie intensywności koloru żółtego ( $p \leq 0,05$ ).

Dla całościowego opisu barwy mieszanek lodowych potrzebne są informacje o kolejnych jej składowych, czyli odcieniu ( $h^0$ ) i nasyceniu ( $C^*$ ). Nasycenie  $C^*$  opisuje czystość barwy, czyli w jakim stopniu dominująca czystość fali jest „zanieczyszczona” innymi. Nasycenie to odległość punktu od środka układu. Im dalej od środka układu tym barwa jest głębsza i czystsza. W badaniach własnych najniższą wartość nasycenia  $C^*$  (9,52) oznaczono w mieszance z inuliną, fermentowanej przez *L. rhamnosus* (B<sub>Lr</sub>). Analizując mieszanki tylko z dodatkiem inuliny największą wartość nasycenia  $C^*$  (17,43), świadcząca o czystości barwy, wykazano w mieszance Abb12 fermentowanej *B. animalis*. W mieszance AFbb12 dodatek błonnika jabłkowego spowodował istotne zmniejszenie nasycenia barwy, co może być związane z małym udziałem barwy żółtej. W pozostałych mieszankach CPF, CCF i CAF (**publikacja 2**) i B<sub>Lr</sub> (**publikacja 1**) 1,5% dodatek błonnika jabłkowego istotnie zwiększył nasycenie barwy w porównaniu do ich odpowiedników tylko z inuliną.

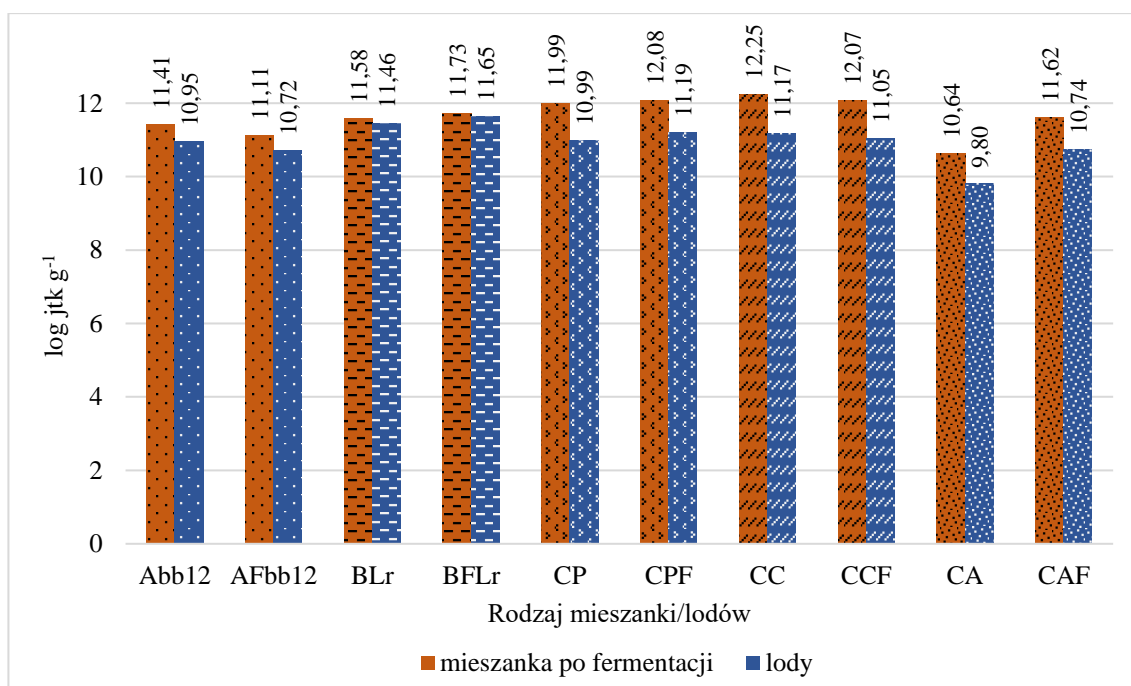
Odcień  $h^0$  (ton) określa dominującą długość fali w spektrum tej barwy. Długość ta decyduje o tym jaki odcień ma dana barwa. Najwyższą wartość  $h^0$  w mieszankach z inuliną oznaczono w B<sub>Lr</sub> (fermentowanych przez *L. rhamnosus*), a najniższą w CA (fermentowaną przez *L. acidophilus*). Dodatek błonnika jabłkowego we wszystkich analizowanych mieszankach zmieniał odcień barwy powodując istotnie obniżenie wartości  $h^0$  (**publikacja 1 i 2**).

W procesie produkcji lodów składniki użyte w recepturze mogą niekorzystnie lub korzystnie wpływać na bakterie probiotyczne, np. poprzez zmianę pH, ponieważ optymalne dla wzrostu *Lactobacillus* i *Lactocaseibacillus* jest pH w zakresie 5,5–6,2, a dla *Bifidobacterium* korzystne jest wyższe pH w przedziale 6,0–7,0 (Mohammadi i in. 2011; Śliwińska i Lesiów 2013). Szczególnie *L. acidophilus* charakteryzuje się wysoką zdolnością do buforowania cytoplazmy w zakresie pH od 3,72 do 7,74, co umożliwia efektywną reakcję na zmiany pH wewnątrzkomórkowego i zachowanie stabilności w środowisku o kwaśnym odczynie (Godward i Kailasapathy 2003, Tamime i in. 2005, Takahashi i in. 2007). Po fermentacji mieszanek liczba komórek bakterii wahała się od 10,64 log jtk g<sup>-1</sup> (CA) do 12,25 log jtk g<sup>-1</sup> (CC) (**publikacja 2**). Dodatek błonnika jabłkowego nie wpłynął istotnie na wzrost *B. animalis* (**publikacja 1**) oraz *L. paracasei* i *L. rhamnosus* (**publikacja 2**) w mieszankach, w porównaniu z ich odpowiednikami tylko z inuliną. Z kolei dodatek ten przyczynił się do istotnego wzrostu liczby komórek *L. acidophilus* (w mieszance CAF), o około 1 log jtk g<sup>-1</sup>, w porównaniu z liczbą komórek w mieszance z dodatkiem inuliny (CA). Natomiast po fermentacji mieszanki przez *L. casei* (CCF) wykazano, że 1,5% dodatek błonnika jabłkowego przyczynił się do zmniejszenia liczby komórek tego szczepu o 0,18 log jtk g<sup>-1</sup>, w porównaniu do próby CC (wyłącznie z inuliną). Uzyskane wyniki badań wskazują, że istotnym problemem jest dobór bakterii probiotycznych do fermentacji mieszanek z mleka owczego, gdyż częściowe

zastąpienie inuliny błonnikiem jabłkowym zmieniało warunki fermentacji (np. wartość pH) i różnicowało liczbę komórek szczepu probiotycznego po fermentacji.

Komórki bakterii probiotycznych ulegają zniszczeniu podczas zamrażania i napowietrzania mieszanek lodowych oraz podczas przechowywania, jednak wyniki badań wielu autorów wykazały, że kultury probiotyczne mają lepszą żywotność w produktach mrożonych niż w mleku fermentowanym (Hekmat i McMahon 1992, Kailasapathy i Sultana 2003, Mohammadi i in. 2011).

Proces zamrażania zmniejszył populację komórek bakterii probiotycznych we wszystkich grupach lodów (**publikacja 1 i 2**). Po zamrożeniu zaobserwowano istotną redukcję liczby żywych komórek bakterii, o 0,84 log jtk g<sup>-1</sup> w lodach CA, 1,0 log jtk g<sup>-1</sup> w lodach CP i 1,08 log jtk g<sup>-1</sup> w lodach CC, tylko z inuliną (wykres 3). Również w wyniku zamrożenia mieszanek lodowych z inuliną Abb12, fermentowanych przez *B. animalis*, oraz BLr z *L. rhamnosus*, nastąpiło zmniejszenie liczby komórek bakterii w zakresie od 0,12 log jtk g<sup>-1</sup> do 0,46 log jtk g<sup>-1</sup>, w porównaniu do liczby komórek tych bakterii w mieszankach przed zamrożeniem. Również Akalin i Erisir (2008) zaobserwowali podczas zamrażania mieszanki lodowej z *L. acidophilus* i *B. animalis* BB-12 redukcję tych bakterii o 1,5-2 log jtk g<sup>-1</sup>. Według Akbari i in. (2016), po zamrożeniu zaobserwowano redukcję populacji *L. acidophilus* o 0,28 log jtk g<sup>-1</sup> oraz *L. rhamnosus* o 0,33 log jtk g<sup>-1</sup>. Natomiast Mohamamadi i in. (2011) uzyskali 8 log jtk ml<sup>-1</sup> *L. acidophilus* i 8 log jtk ml<sup>-1</sup> *B. bifidum* bezpośrednio po zamrożeniu lodów. Z kolei w badaniu Akin i in. (2007), przeprowadzono analizę lodów, w których obecne były bakterie probiotyczne, w tym *L. acidophilus* i *B. lactis*. Autorzy uzyskali odmienne wyniki, na podstawie których można wykazać pozytywny wpływ inuliny na wzrost bakterii probiotycznych, co skutkowało także zwiększeniem ich przeżywalności.



Wykres 3. Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na liczbę bakterii probiotycznych w mieszankach przed zamrożeniem i lodach

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Rozpatrując wpływ dodatku błonnika jabłkowego na poziomie 1,5% należy podkreślić, że wpłynął istotnie na redukcję liczby komórek bakterii w lodach CPF z *L. paracasei* (o 0,89 log jtk g<sup>-1</sup>), CCF z *L. casei* (o 1,02 log jtk g<sup>-1</sup>) i CAF z *L. acidophilus* (o 0,88 log jtk g<sup>-1</sup>), w porównaniu do mieszanek przed procesem mrożenia.

W lodach z *L. rhamnosus* nie stwierdzono istotnego zmniejszenia populacji żywych komórek bakterii bezpośrednio po zamrożeniu (**publikacja 1**, wykres 3). Można zatem stwierdzić, że przeżywalność bakterii podczas zamrażania mieszanek lodowych z mleka owczego zależy od szczepu probiotycznego. Jednak w badaniach własnych szczep *L. rhamnosus* charakteryzował się najlepszą przeżywalnością i najmniejszą redukcją populacji po zamrożeniu. Jest to kluczowa informacja dla producentów lodów, ponieważ w produkcji przemysłowej zastosowanie szczepu odpornego na proces zamrażania i napowietrzania pozwala na produkcję lodów probiotycznych gwarantujących wysoką przeżywalność komórek bakterii. Spożycie takich lodów zapewnia efekt terapeutyczny.

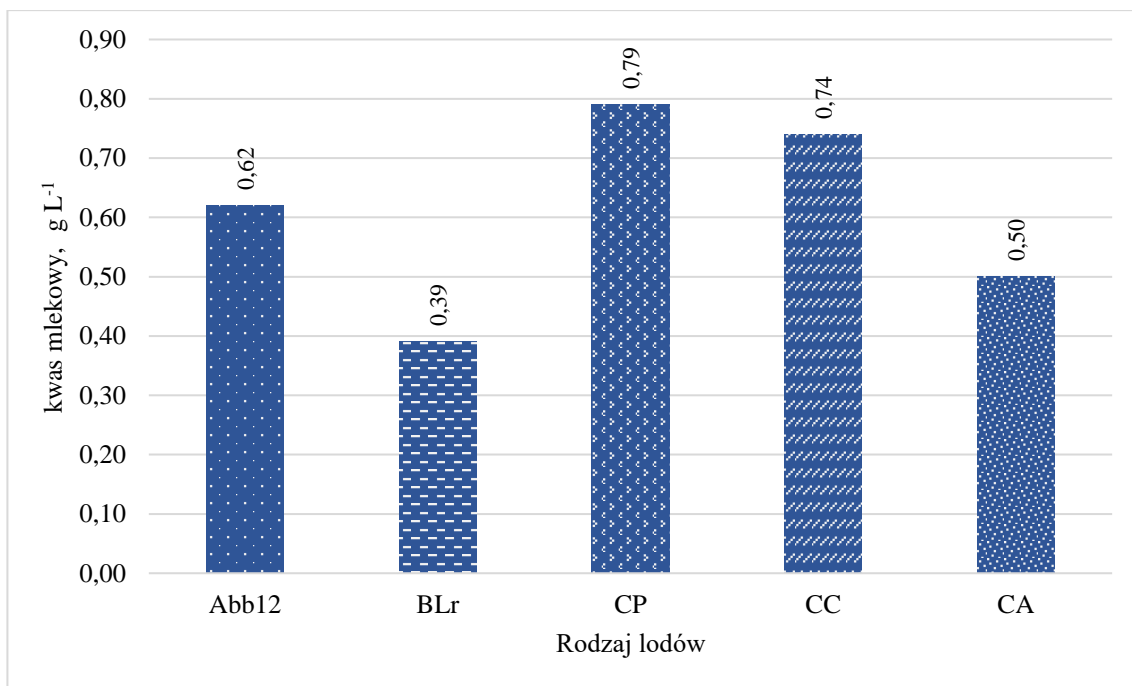
#### 4.2 Wpływ zastosowania różnych szczepów probiotycznych na cechy fizykochemiczne i organoleptyczne lodów z inuliną

Aby zweryfikować pierwszą hipotezę **H1** przeanalizowano właściwości lodów wyprodukowanych z mieszanek fermentowanych przez pięć szczepów probiotycznych. Do tego celu wybrano lody wyłącznie z dodatkiem inuliny.

W **publikacji 1 i 2** zamieszczono wyniki określające wartość pH lodów po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego. Wykazano, że najwyższą wartością pH cechowały się lody z inuliną fermentowane przez *L. rhamnosus* (BLr), a najniższą lody z *L. paracasei* (CP) i różnice te okazały się statystycznie istotne ( $p \leq 0,05$ ) (**publikacja 1**). Wartość pH lodów z inuliną powyżej 5 oznaczono w lodach z *B. animalis*, *L. rhamnosus* i *L. acidophilus*. Natomiast pH poniżej 5 oznaczono w lodach z *L. paracasei* i *L. casei*.

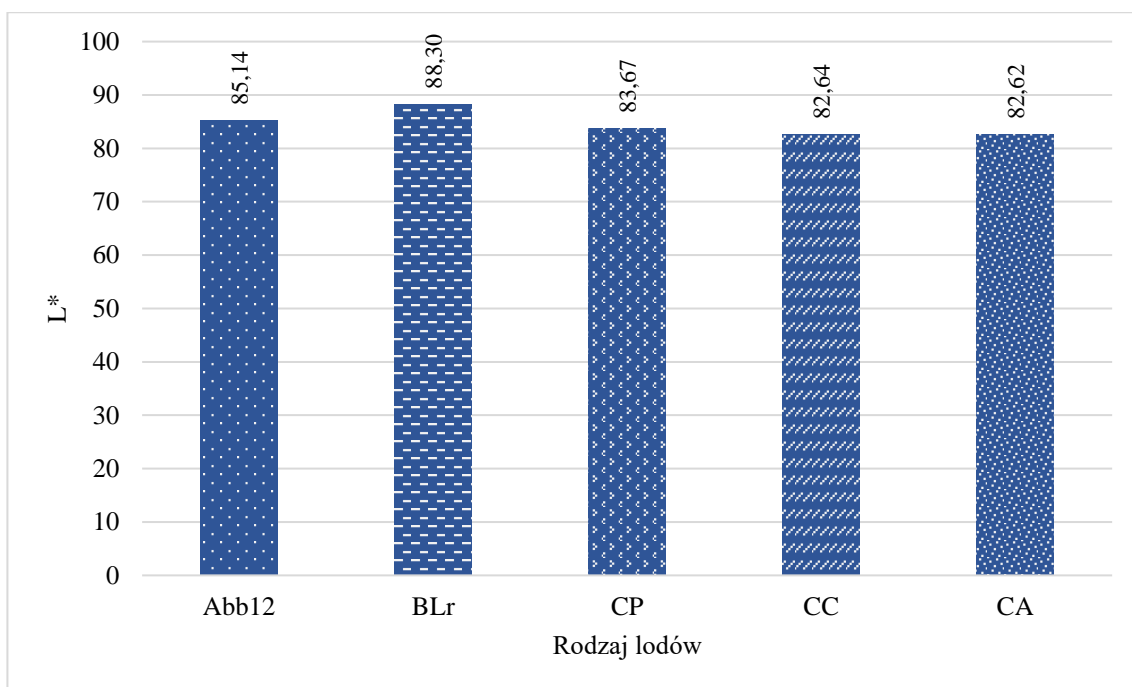
Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku zawartości kwasu mlekowego, gdzie najniższe stężenie kwasu mlekowego w lodach z inuliną wykazano w lodach BLr (wykres 4). Z kolei najwyższą zawartość kwasu mlekowego ( $>0,7$  g L<sup>-1</sup>) oznaczono w lodach z inuliną z *L. paracasei* i *L. casei*. Badania przeprowadzone przez Akalin i Erisir (2008) wykazały, że pH lodów probiotycznych z inuliną, fermentowanych przez *L. acidophilus* LA-5 i *B. animalis*, wynosiło 5,35, a w ich odpowiednikach bez inuliny kształtowało się na poziomie 5,45. Przypuszczalnie inulina mogła zainicjować metabolizm probiotyków, a tym samym zwiększyć kwasowość lodów (Syed i in. 2018). Saputro i in. (2023) zaobserwowali, że lody z dodatkiem 2% inuliny i bakterii *Lactiplantibacillus plantarum* miały pH równe 6,38 i zawartość kwasu mlekowego na poziomie 0,79%.

Według Pankiewicz i in. (2020) wartość pH lodów probiotycznych zawierających *L. rhamnosus* wynosiła od 5,73 do 5,83. Natomiast wartości pH fermentowanych i niefermentowanych lodów mlecznych według Soukoulisa i in. (2008) wahały się od 4,5 do 6,3. Według danych przedstawionych przez Mohammadi i in. (2011) oraz Da Silva i in. (2015) pH lodów niefermentowanych z dodatkiem *Bifidobacterium* BB-12 wynosiło 6,45.



Wykres 4. Zawartość kwasu mlekowego w lodach z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2



Wykres 5. Jasność L\* lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego

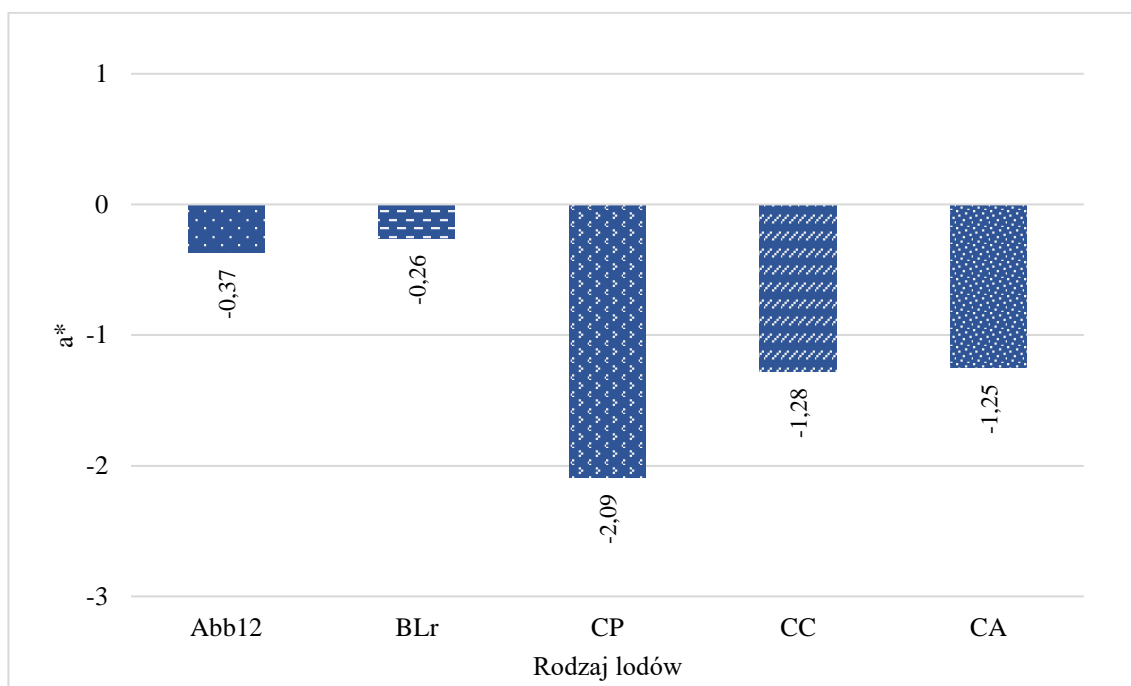
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego najwyższą jasnością L\* charakteryzowały się lody z inuliną BLr z mieszanki fermentowanej przez *L. rhamnosus* (wykres 5). Również w tej grupie lodów jasność L\* była najwyższa po 21 dniach przechowywania (**publikacja 1**). W grupie lodów tylko z inuliną najniższą wartość L\*

wykazano dla lodów CA, fermentowanych przez *L. acidophilus* oraz CC - z *L. casei*, po 7 dniach przechowywania (wykres 5).

Nozière i in. (2006) ustalili, że cząsteczki inuliny wchodzi w interakcje z micelami kazeiny, które wraz z kuleczkami tłuszczu są odpowiedzialne za rozpraszanie światła. W wyniku tego zjawiska zaobserwowano wysoką wartość parametru  $L^*$ , co wpływa na większą jasność. Według Falah et al. (2021) wartość  $L^*$  lodów z *L. brevis* wzrosła znacząco z 90,71 do 95,63, gdy poziom inuliny zwiększono z 0% do 3%. W badaniu przeprowadzonym przez Calligaris i in. (2018), jasność  $L^*$  lodów z *L. rhamnosus* wynosiła 87,93. W lodach mlecznych poddanych fermentacji przez bakterie *L. rhamnosus*, wyprodukowanych przez Pankiewicz i in. (2020), zaobserwowano zakres jasności  $L^*$  oscylujący między 71,15 a 71,31.

Analizując składową barwę  $a^*$  w lodach z inuliną po 7 (wykres 6) i 21 dniach przechowywania zamrażalniczego, stwierdzono największy udział barwy zielonej ( $a^*=-2,09$  i  $a^*=-2,08$ ) w lodach CP z *L. paracasei*. Niższym udziałem barwy zielonej ( $a^*$  od -1,25 do -1,41) charakteryzowały się lody fermentowane przez *L. casei* (CC) i *L. acidophilus* (CA). Natomiast najmniejszym udziałem barwy zielonej, zarówno w 7 i 21 dniu przechowywania, cechowały się lody fermentowane przez *L. rhamnosus* (**publikacja 1**). Analiza wariancji (ANOVA) pokazuje, że na parametr  $a^*$  wpływał rodzaj bakterii, czas przechowywania, dodatek błonnika jabłkowego i interakcje pomiędzy czasem przechowywania a dodatkiem błonnika jabłkowego (**publikacja 1**).

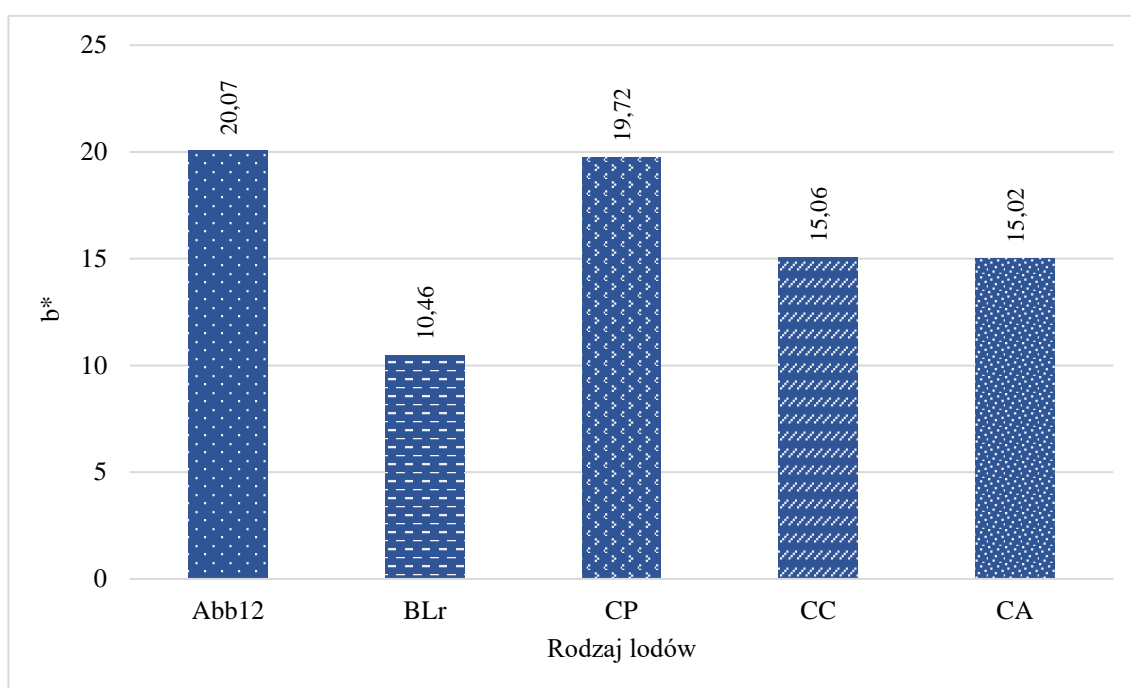


Wykres 6. Składowa barwa  $a^*$  w lodach z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Calligaris i in. (2018) zaobserwowali składową barwę  $a^*$  na poziomie 2,41. Jak wykazali Pankiewicz i in. (2020), lody mleczne fermentowane przez bakterie *L. rhamnosus* charakteryzowały się współrzędną barwy  $a^*$  o wartości 0,15.

Najmniejszy udział barwy żółtej, czyli najniższą wartość  $b^*$ , oznaczono w lodach z inuliną BLr, fermentowanych przez *L. rhamnosus*, po 7 (wykres 7) i 21 dniach przechowywania. Wyższą wartością parametru  $b^*$  charakteryzowały się lody fermentowane przez *B. animalis* (Abb12) i *L. paracasei* (CP) w porównaniu do pozostałych grup lodów. Nieco wyższy udział koloru żółtego oznaczono w lodach fermentowanych przez *L. acidophilus* (CA) i *L. casei* (CC). Wyniki te potwierdziła analiza wariancji, która wykazała, że rodzaj bakterii, dodatek błonnika oraz interakcja tych dwóch czynników istotnie wpływają na intensywność barwy żółtej (**publikacja 1**) oraz że rodzaj bakterii, czas przechowywania i dodatek błonnika jabłkowego i interakcja tych czynników istotnie wpływają na intensywność żółtej barwy (**publikacja 2**).



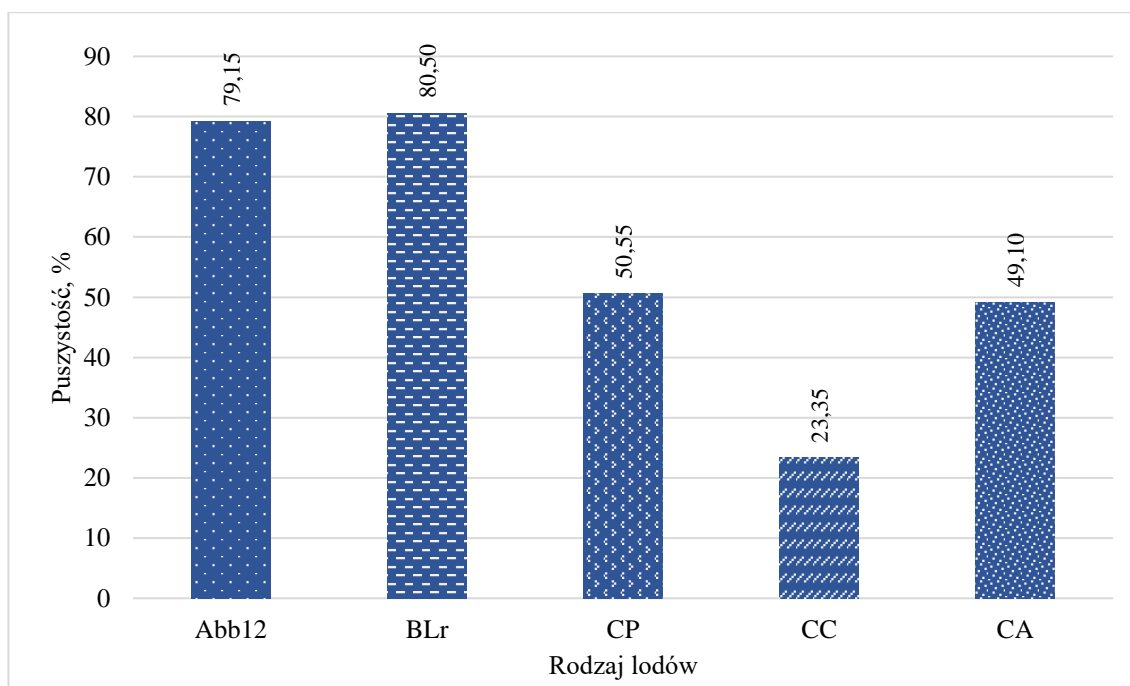
Wykres 7. Składowa barwa  $b^*$  w lodach z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

W badaniach Pankiewicz i in. (2020), przeprowadzonych na lodach mlecznych poddanych fermentacji przez bakterie *L. rhamnosus*, wykazano wartości składowych barwy  $b^*$  w przedziale od 13,29 do 13,64. Z kolei Calligaris i in. (2018) oznaczyli wartość  $b^*$  równą 6,91. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez Sabet-Sarvestani i in. (2021) można stwierdzić wyraźne różnice w parametrach barwy pomiędzy lodami poddanymi fermentacji, co sugeruje zróżnicowane zachowanie wzrostu oraz aktywności enzymatycznej *L. casei* i *L. plantarum* w środowiskach hodowlanych opartych na produktach mlecznych. Autorzy sugerują, że różnice pomiędzy wartością parametru  $b^*$  mogą być związane z procesem fermentacji oraz obecnością fruktooligosacharydów.

Po 7 i 21 dniach przechowywania najmniejszym nasyceniem  $C^*$  charakteryzowały się lody BLr fermentowane przez *L. rhamnosus*. Wyższe nasycenie barwy stwierdzono w lodach CP fermentowanych przez *L. paracasei* i w lodach Abb12 fermentowanych przez *B. animalis*.

W zależności od rodzaju zastosowanego szczepu stwierdzono różnice w odcieniu barwy  $h^0$ . Potwierdzenie tego efektu można odnaleźć w badaniach przeprowadzonych przez Acevedo-Martinez i in. (2018), gdzie wykazano, że gatunek bakterii probiotycznych (*L. paracasei*, *L. casei* i *L. rhamnosus*) oraz dodatek fruktooligosacharydów w ilości 5% może znacząco modyfikować barwę badanych produktów. W badaniach własnych najwyższą wartość  $h^0$  oznaczono w lodach fermentowanych przez *L. casei* (CC), a najniższą w lodach CA fermentowanych przez *L. acidophilus* i różnice te były statystycznie istotne. Oznacza to, że rodzaj szczepu probiotycznego istotnie kształtuje odcień barwy (**publikacja 2**).



Wykres 8. Puszystość lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Napowietrzanie (puszystość) jest procesem wprowadzania i absorbowania powietrza w mieszankach lodowych podczas procesu zamrażania, wpływającym na jakość gotowych lodów. Poziom absorpcji powietrza wpływa na właściwości fizyczne i sensoryczne lodów, nadając im miękką, kremową konsystencję i przyjemny smak. Puszystość mieszanki lodowej kształtuje barwę lodów, dzięki zjawisku załamania światła. Ponadto, napowietrzenie mieszanki lodowej zwiększa odporność produktu na zmiany temperatury i zmniejsza uczucie chłodu podczas konsumpcji. Z reguły producenci preferują wyższe wartości napowietrzenia, zwiększające objętość lodów. W lodach rzemieślniczych zwykle utrzymuje się napowietrzenie wahające się między 20% a 40%. W przypadku masowej produkcji lodów wskaźnik ten często jest podnoszony do poziomu przekraczającego 100%, poprzez intensywne wprowadzanie powietrza w trakcie procesu zamrażania (Goff i Hartel 2013). Na puszystość lodów wpływa temperatura pasteryzacji, homogenizacja, temperatura i czas dojrzewania mieszanki lodowej (najodpowiedniejsza 4°C oraz od 10 do 12 godzin), zawartość tłuszczu i białka, czas i temperatura procesu zamrażania i odpowiednia ilość mieszanki we frezerze oraz temperatura podczas przechowywania (Karaca i in. 2009, Soukoulis i in. 2010, Warren i Hartel 2014).

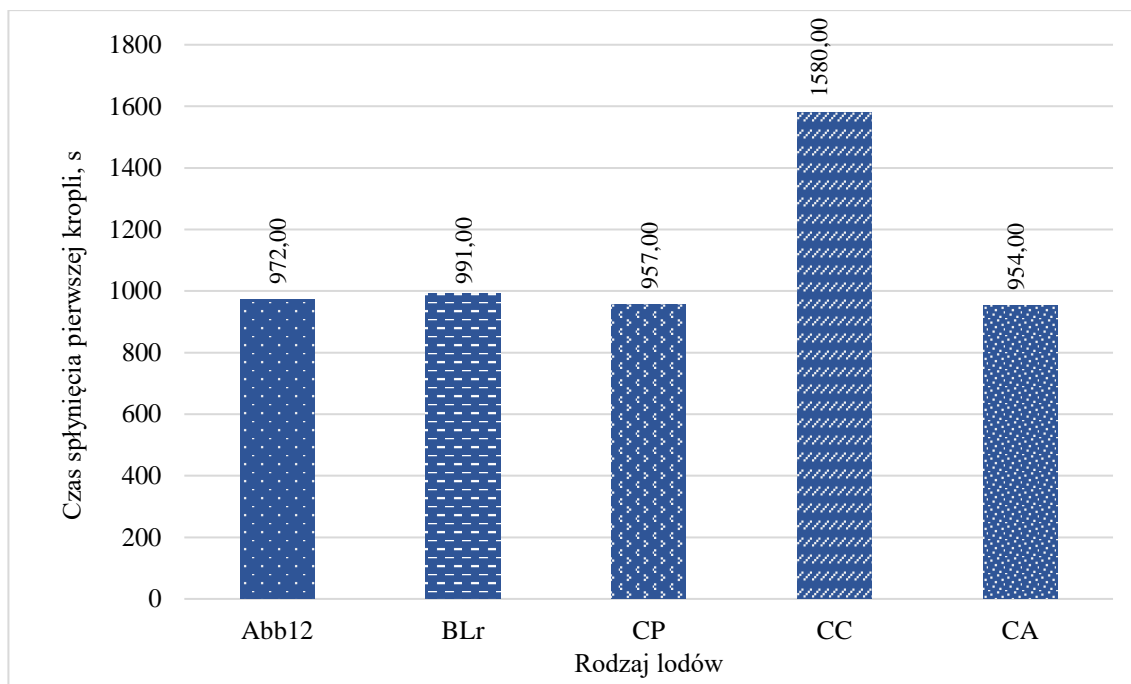
Zwiększenie puszystości lodów, według Falah i in. (2021), było wyraźnie związane z różnymi poziomami zawartości inuliny. Najwyższe i najniższe wartości napowietrzenia stwierdzono odpowiednio dla lodów synbiotycznych zawierających 3% inuliny (puszystość 32%) oraz dla lodów bez inuliny (puszystość wynosząca 10%). Karaca i in. (2009) również zauważyli, że wyższy dodatek inuliny w mieszaninie lodów prowadził do ich zwiększonego napowietrzenia.

W badaniach własnych najmniejszą puszystością charakteryzowały się lody z inuliną fermentowane przez *L. casei* (CC), natomiast wyższą puszystość oznaczono w lodach BLr fermentowanych przez *L. rhamnosus* oraz lodach z *B. animalis* (Abb12) (wykres 8).

Należy dodać, że pomimo wysokiego napowietrzenia lodów fermentowanych przez *L. rhamnosus* (BLr) i *B. animalis* (Abb12), nie zaobserwowano wpływu na wielkość populacji ( $>10 \log \text{ jtk g}^{-1}$ ) tych szczepów podczas przechowywania (**publikacja 1**). Najmniejsze napowietrzenie stwierdzono w lodach CC fermentowanych przez *L. casei* i w tym przypadku liczba żywych komórek bakterii przekraczała  $9 \log \text{ jtk g}^{-1}$ . Oznacza to, że procent napowietrzenia w różnym stopniu wpływa na przeżywalność szczepów probiotycznych. W przypadku badań własnych, szczepem charakteryzującym się dużą odpornością na warunki zamrażania był *L. rhamnosus*. Według Saputro i in. (2023) największe napowietrzenie (wynoszące 35,72%), oraz najwolniejszą szybkość topnienia (40,71% w czasie 20 minut) wykazano w lodach synbiotycznych zawierających 2% inuliny.

Według Góral i in. (2018), szybkość topnienia lodów zależy od różnych czynników, m.in. zawartości suchej masy, kryształków lodu oraz rozmiaru i liczby kuleczek tłuszczu. Warto zauważyć, że produkt charakteryzujący się zbyt szybkim tempem topnienia może być mało akceptowalny. Nadmiernie wolne topnienie jest również uznawane za wadę, mającą wpływ na doznania podczas konsumpcji lodów (Zhang i in. 2018). W przeprowadzonych badaniach najdłuższy czas spłynięcia pierwszej kropli (1580 s) w lodach z 4% dodatkiem inuliny po 7 dniach przechowywania oraz całkowity czas topnienia (7381 s) oznaczono w lodach CC fermentowanych przez *L. casei* (**publikacja 2**). Zgodnie z doniesieniami literaturowymi Di Criscio i in. (2010) oraz El-Nagar i in. (2002) lody zawierające 5% inuliny cechowały się istotnie dłuższą szybkością topnienia, w porównaniu do lodów kontrolnych i lodów zawierających 2,5% inuliny. Balthazar i in. (2018) także wykazali, że lody probiotyczne z 10% dodatkiem inuliny cechowały się dłuższym czasem topnienia w porównaniu do lodów probiotycznych bez inuliny.

Akin i in. (2007) w swoich badaniach nad lodami probiotycznymi z inuliną zauważyli, że czas spłynięcia pierwszej kropli wynosił 1780 s – wariant z 15% cukru bez inuliny i 2058 s – lody z 21% cukru i 2% inuliny. Natomiast całkowity czas topnienia w lodach z dodatkiem 21% cukru bez inuliny wynosił 4806 s i w lodach z dodatkiem 18% cukru z 2% inuliny - 5313 s. W badaniach własnych istotnie krótszym czasem spłynięcia pierwszej kropli charakteryzowały się lody CA (954 s = 15,9 min) fermentowane przez *L. acidophilus* i lody CP (957 s = 15,95 min) fermentowane przez *L. paracasei* (**publikacja 2**, wykres 9).



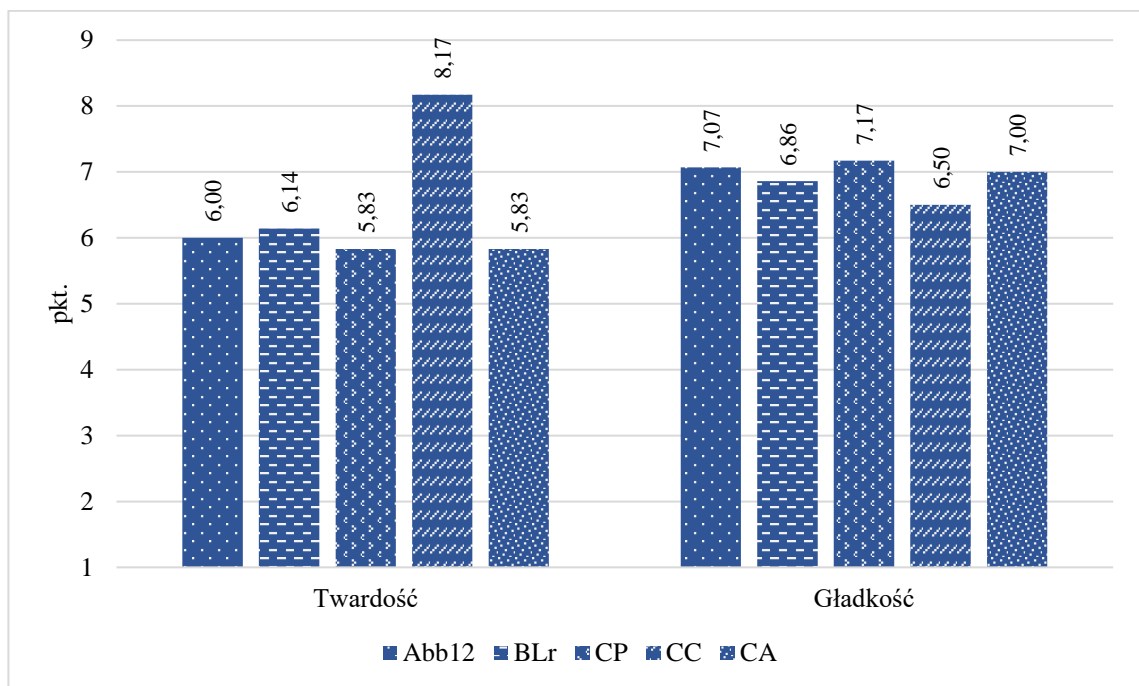
Wykres 9. Czas spłynięcia pierwszej kropli lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

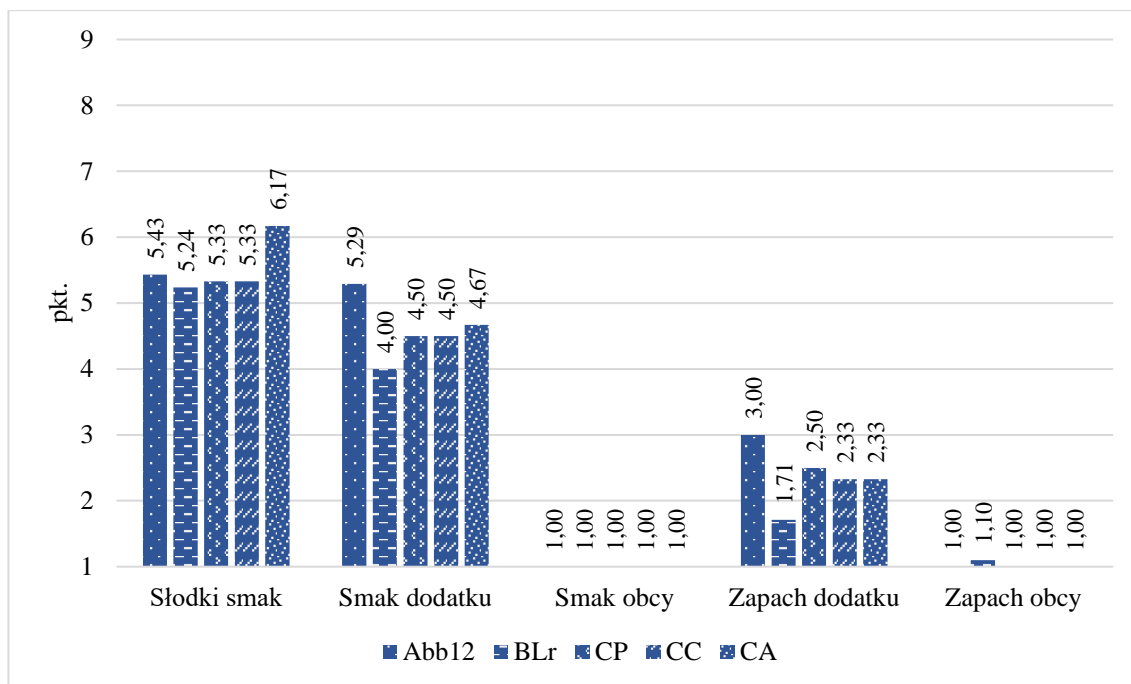
W badaniach Falah i in. (2021) szybkość topnienia lodów zmniejszała się wraz ze zwiększeniem dodatku inuliny do 3%. Natomiast w lodach jogurtowych dodanie 5% inuliny spowodowało zmniejszenie szybkości topnienia z 5% do 9% na skutek wiązania wody (El-Nagar i in. 2002). Wyniki badań przedstawione przez Akbari i in. (2016) oraz przez Akalin i in. (2018) podają sprzeczne wnioski dotyczące wpływu inuliny na charakterystykę topnienia lodów. Cytowani autorzy zauważyli, że lody o obniżonej zawartości tłuszczu, z różnymi poziomami inuliny (do 4%), wykazywały istotnie gorsze parametry topnienia w porównaniu z lodami kontrolnymi (bez inuliny, o zawartości tłuszczu wynoszącej 10%). W badaniach opublikowanych przez Sabet-Sarvestani i in. (2021) czas spłynięcia pierwszej kropli lodów fermentowanych przez *L. casei* wynosił 10,66 minut. Natomiast dodanie inuliny do tych lodów spowodowało wydłużenie czasu do 11,33 minut. Dla porównania, w badaniach własnych, całkowity czas topnienia w lodach CA i CP był krótszy od czasu topnienia lodów CC, kolejno o 1101 s (18,35 min) i 1815 s (30,25 min). Natomiast najkrótszym czasem topnienia (972 s = 16,2 min) charakteryzowały się lody Abb12 fermentowane przez *B. animalis*. Balthazar i in. (2018) przeprowadzili badania topnienia lodów probiotycznych i synbiotycznych produkowanych przy użyciu kombinacji inuliny i *L. casei*. Ich wyniki pokazały, że szybkość topnienia próbek lodów kontrolnych, probiotycznych i synbiotycznych wynosiła odpowiednio 2,04, 1,94 i 2,00 g/min.

W opinii oceniających najbardziej charakterystycznym wyglądem typowym dla lodów mlecznych z inuliną cechowały się lody Abb12 fermentowane przez *B. animalis* oraz lody CA fermentowane przez *L. acidophilus* (**publikacja 1 i 2**). Niższe noty za wygląd przyznano lodom CP fermentowanym przez *L. paracasei* i lodom CC fermentowanym przez *L. casei*. Analiza ANOVA potwierdza również, że dodatek błonnika miał istotny wpływ na wygląd lodów

z mleka owczego (**publikacja 2**). Rodzaj użytego do fermentacji szczepu różnicował także twardość i gładkość lodów, ponieważ najbardziej twarde okazały się lody CC, a najmniej twarde lody CP fermentowane przez *L. paracasei* i CA - z *L. acidophilus* (wykres 10). Należy dodać, że lody CC charakteryzowały się najmniejszym napowietrzeniem, co z pewnością wpłynęło na ich dużą twardość. W opinii oceniających jako bardzo gładkie wyróżniono lody fermentowane przez *L. paracasei* (CP) w 7 dniu przechowywania (wykres 10), a jako najmniej gładkie lody z inuliną BLr fermentowane przez *L. rhamnosus* w 21 dniu przechowywania. Lody z inuliną charakteryzowały się słodkim smakiem, jednak zdecydowanie najśłodsze były lody fermentowane przez *L. acidophilus* (CA) (wykres 11). Nie wykazano wpływu zastosowanego szczepu bakterii probiotycznych na obecność smaku i zapachu obcego w lodach. Przeprowadzona analiza ANOVA (**publikacja 2**) pokazuje, że czas przechowywania i rodzaj bakterii użytych do fermentacji oraz ich wzajemne oddziaływanie nie wpływają istotnie na cechy organoleptyczne lodów probiotycznych z mleka owczego. Przedstawiona weryfikacja postawionej **hipotezy H1** nie daje podstaw do jej odrzucenia, można więc uznać, że została zweryfikowana pozytywnie.



Wykres 10. Twardość i gładkość lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2



Wykres 11. Smak i zapach lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

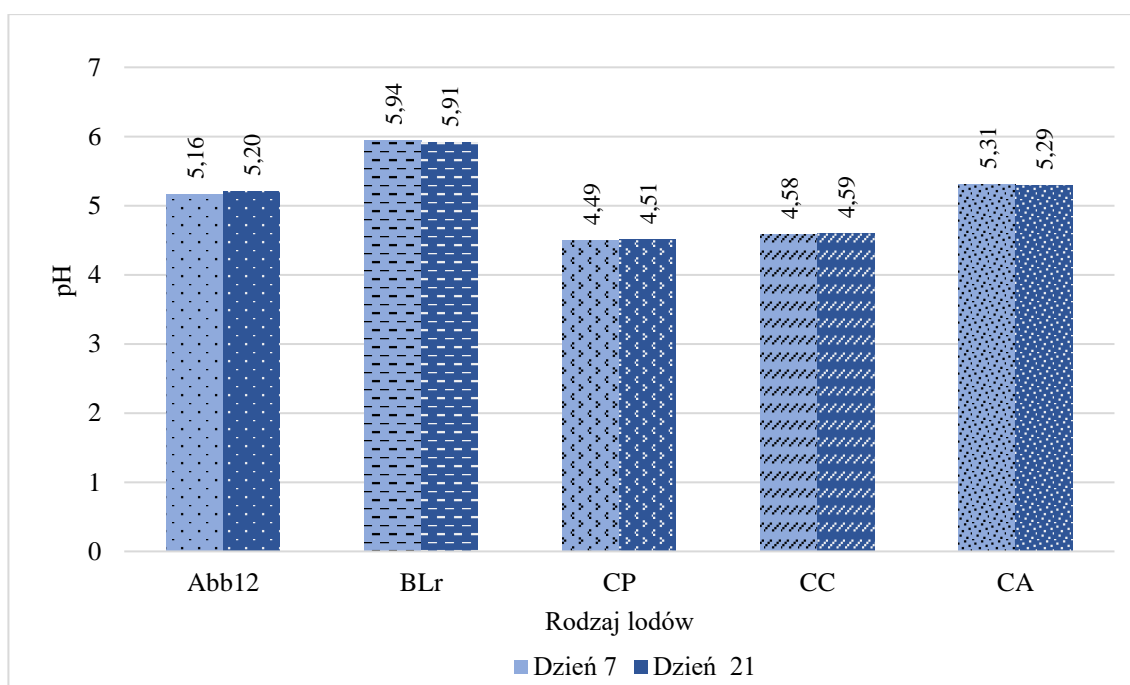
Franck (2002) wskazuje, że dodatek inuliny do lodów przyczyniał się do poprawy ich konsystencji poprzez zdolność do wiązania cząsteczek wody i tworzenia żelowej struktury. El-Nagar i in. (2002) zaobserwowali zwiększoną twardość lodów jogurtowych po dodaniu inuliny. Również Florowska i in. (2013) wykazali, że dodatek inuliny do lodów mlecznych skutkowało pogorszeniem jednorodności i wyprodukowaniem twardszych lodów, w porównaniu do lodów kontrolnych. Podobne wnioski przedstawiają Tiwari i in. (2015), którzy stwierdzili, że lody mleczne zawierające 4% inuliny charakteryzowały się większą twardością niż lody kontrolne. Badania Akalin i Erisir (2008) oraz Di Criscio i in. (2010) także potwierdzają wpływ inuliny na twardość lodów. Hashemi i in. (2015) zaobserwowali zwiększoną twardość lodów po zastąpieniu uwodornionego oleju roślinnego inuliną. Dodatkowo Akbari i in. (2016) stwierdzili, że zastosowanie inuliny jako substytutu tłuszczu skutkowało, że oceniający preferowali smak lodów zawierających 3% i 4% inuliny, w porównaniu do smaku lodów bez dodatku inuliny. W badaniach Di Criscio i in. (2010), dodatek mikroorganizmów i inuliny nie miał istotnego wpływu na intensywność smaku, teksturę oraz gładkość produktu.

#### 4.3 Wpływ czasu przechowywania lodów z mleka owczego na cechy fizykochemiczne, organoleptyczne oraz mikrobiologiczne

Podczas przechowywania obserwuje się często wystąpienie rekrytalizacji w lodach, które jest zjawiskiem niepożądanym, negatywnie wpływającym na ich teksturę (Soukoulis i in. 2010). Proces rekrytalizacji, polegający na ponownym tworzeniu się kryształków lodu, stanowi kluczowy aspekt w kontekście produkcji lodów, determinując ich ostateczną jakość i trwałość (Liu i in. 2017, Hernández-Parra i in. 2018). Proces wzrostu kryształków lodu można zinterpretować korzystając z dwóch teorii: koalescencji i migracji. Te modele tłumaczą, w jaki

sposób kryształki lodu rosną i ewoluują w czasie. Koalescencja polega na łączeniu dwóch sąsiadujących drobnych kryształków w jeden większy (Sutton i Wilcox 1998, Adapa i in. 2000, Kamińska i Gaukel 2009). Natomiast migracja związana jest z topnieniem małych kryształków pod wpływem wzrostu temperatury, a powstała skondensowana woda zamarza wokół większych kryształków, prowadząc do ich dalszego rozrostu (Gruda i Postolski 1999, Heiss i Eichner 2002, Regand i Goff 2003). Podczas produkcji lodów gładkich istotne jest, aby większość kryształków lodu miała rozmiar mniejszy niż 50  $\mu\text{m}$ . Kryształki o większych rozmiarach, przekraczające wartości 40-55  $\mu\text{m}$ , mogą prowadzić do powstania niekorzystnej, szorstkiej i piaszczystej tekstury lodów (Donhowe i Hartel 1996). Tempo tego procesu ściśle zależy od temperatury i czasu przechowywania. Wahania temperatury mogą prowadzić do znacznych defektów tekstury lodów związanych z rekrytalizacją kryształków lodu (Dalen 2012, Clark 2012, Varela i in. 2014, Tsevdou i in. 2019, Martinez i in. 2020).

Wydłużenie czasu przechowywania z 7 do 21 dni nie wpłynęło istotnie na zmianę wartości pH we wszystkich lodach z inuliną (**publikacja 1 i 2**, wykres 12).

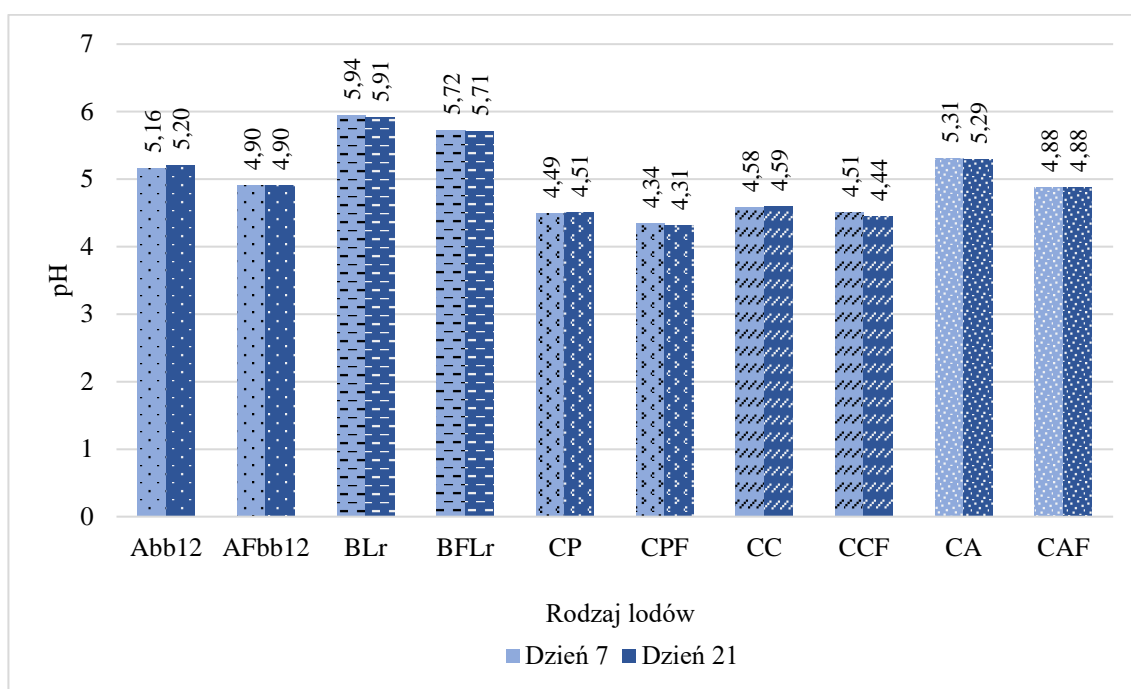


Wykres 12. Wpływ czasu przechowywania na wartość pH lodów z inuliną

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

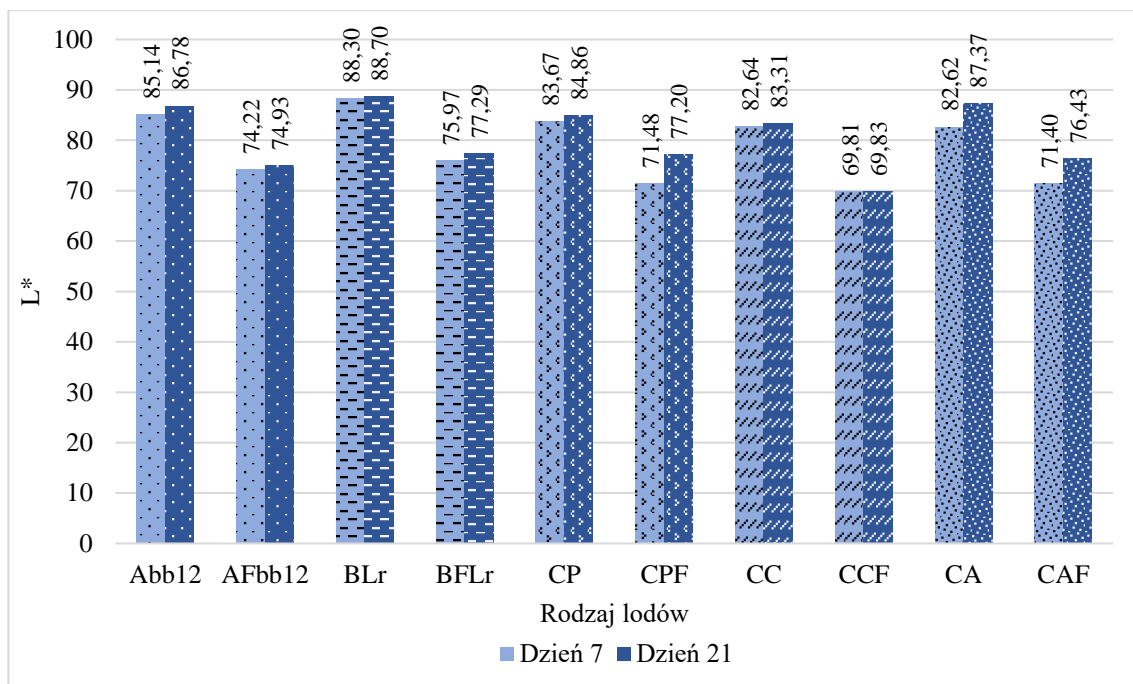
Natomiast analizując wartość pH w lodach z błonnikiem jabłkowym należy stwierdzić, że tylko w lodach CCF (fermentowanych przez *L. casei*) nastąpiło istotne obniżenie wartości pH z 4,51 do 4,44 (wykres 13). W pozostałych grupach lodów z błonnikiem jabłkowym (AFbb12, BFLr – **publikacja 1**, CPF, CAF – **publikacja 2**) zmiany w wartości pH nie były istotne. Nie wykazano istotnych różnic w zawartości kwasu mlekowego w lodach z inuliną (Abb12, BLr, CP, CC, CA) oraz w lodach z błonnikiem jabłkowym (AFbb12, BFLr, CPF, CCF, CAF) w zależności od czasu przechowywania. Probiotyczne lody mleczne z *L. rhamnosus* i *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12, w badaniach Akca i Akpınar (2021), charakteryzowały się pH w przedziale 5,18 – 5,54 w czasie 90 dni przechowywania, gdzie najniższą wartość pH

w pierwszym dniu przechowywania stwierdzono w lodach z dodatkiem sproszkowanych pestek winogron, posiadających właściwości prebiotyczne. De Farias i in. (2019) wykazali, że zarówno pH, jak i kwasowość lodów pozostają stabilne w trakcie przechowywania, bez względu na to, czy zostały poddane fermentacji, czy nie. Również w badaniach dotyczących lodów probiotycznych z *L. acidophilus* LA-5, Arslaner i Ali Salik (2022), oznaczyli wartość pH na poziomie 6,28 w 1 dniu przechowywania i 6,27 po 60 dniach przechowywania.



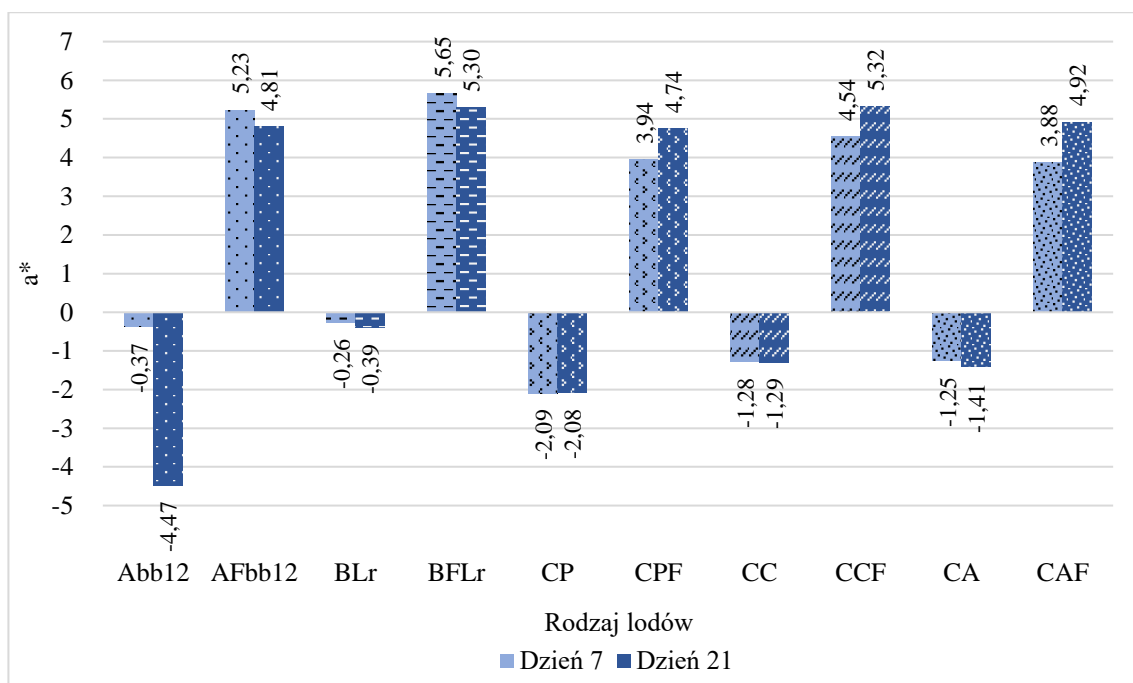
Wykres 13. Wpływ czasu przechowywania na wartość pH lodów z błonnikami  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Wydłużenie czasu przechowywania z 7 do 21 dni przyczyniło się do zwiększenia jasności barwy we wszystkich grupach lodów (wykres 14). Jednak istotne różnice wykazano tylko w lodach z błonnikiem jabłkowym CPF fermentowanych przez *L. casei* oraz lodach z błonnikiem jabłkowym CAF i lodach z inuliną CA fermentowanych przez *L. acidophilus* (**publikacja 2**).



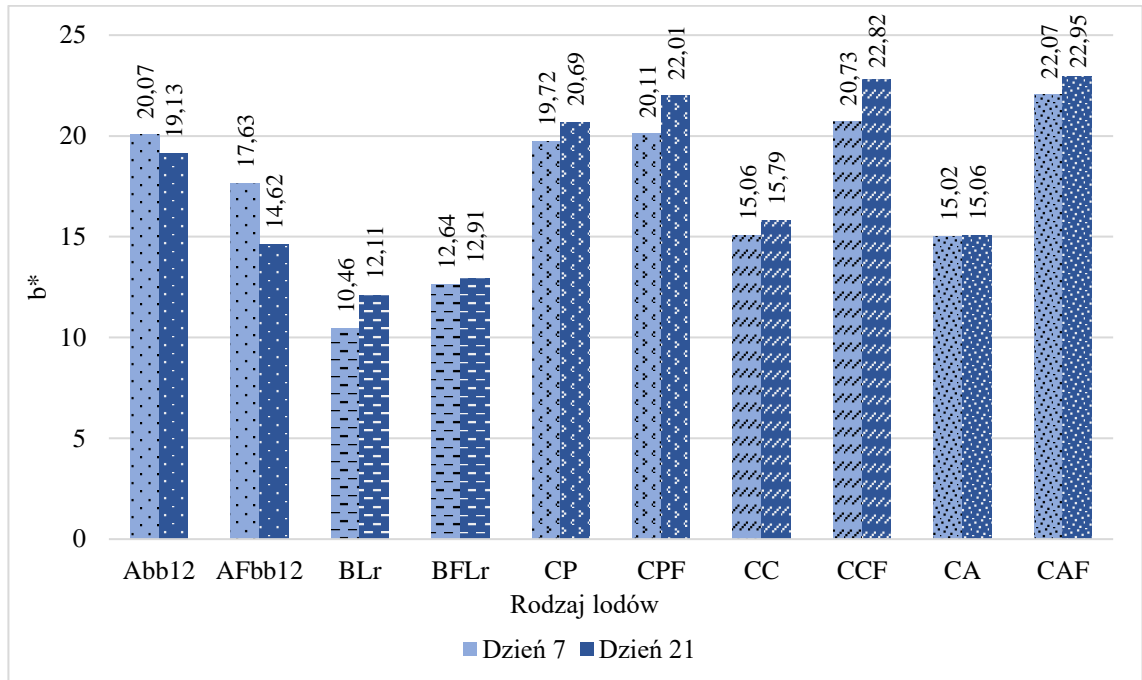
Wykres 14. Wpływ czasu przechowywania na jasność L\* lodów z błonnikami  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Nie stwierdzono istotnego wpływu czasu przechowywania na wartość parametru a\*, z wyjątkiem lodów z błonnikiem jabłkowym CCF, CAF i CPF, gdzie istotnie zwiększył się udział barwy czerwonej (wykres 15).

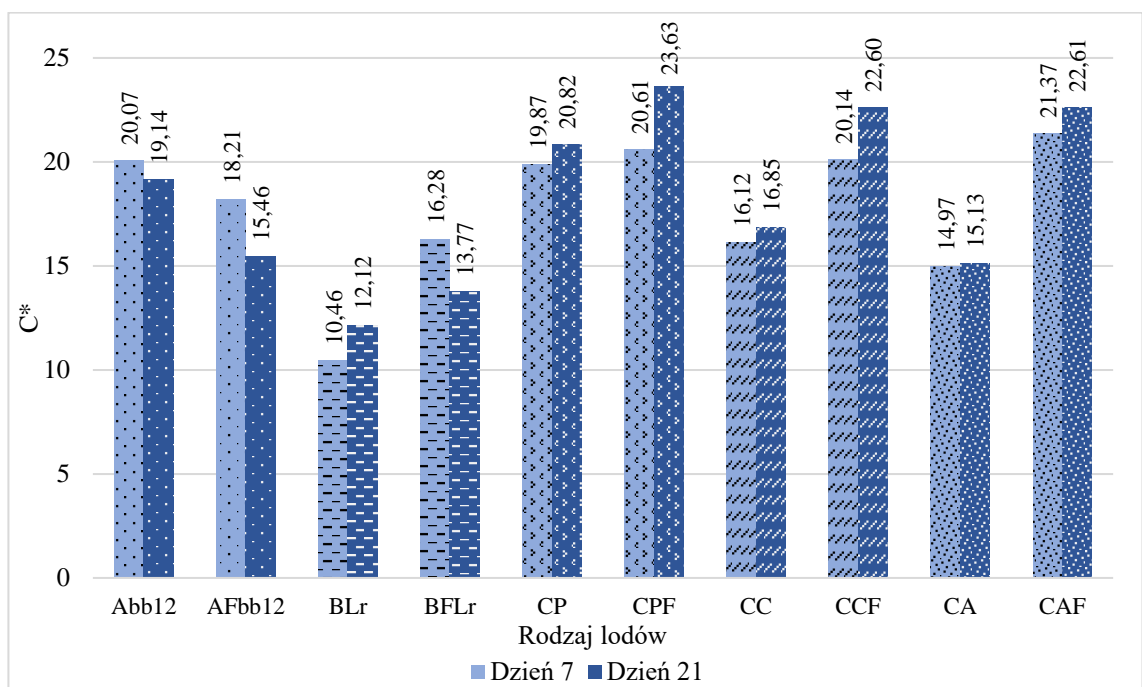


Wykres 15. Wpływ czasu przechowywania na wartość parametru a\* lodów z błonnikami  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Z kolei w lodach fermentowanych przez *B. animalis* (Abb12, AFbb12) stwierdzono zmniejszenie udziału barwy żółtej wraz z wydłużeniem czasu przechowywania. Natomiast w pozostałych grupach lodów wraz z wydłużeniem czasu przechowywania wzrastała intensywność barwy żółtej (wykres 16).



Wykres 16. Wpływ czasu przechowywania na wartość parametru b\* lodów z błonnikami  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

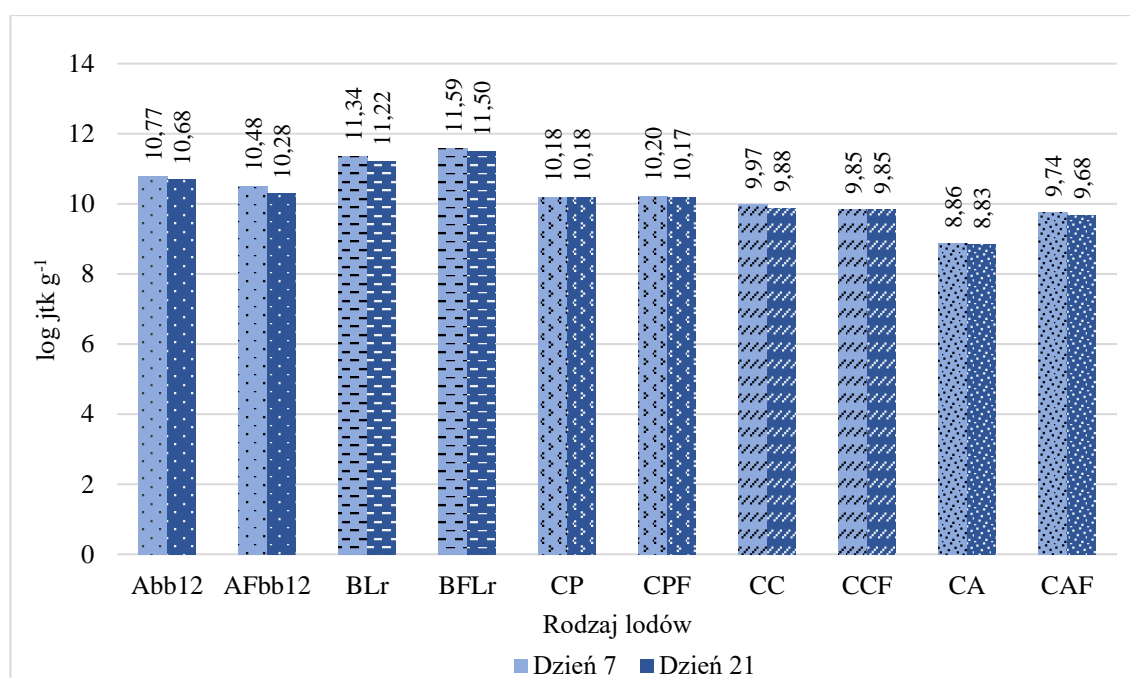


Wykres 17. Wpływ czasu przechowywania na wartość parametru C\* lodów z błonnikami  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Nasycenie barwy  $C^*$  wraz z wydłużeniem czasu przechowywania z 7 do 21 dni zwiększyło się w lodach BLr, CP, CPF, CC, CCF, CA, CAF (wykres 17). Natomiast w lodach BFLr, Abb12i AFbb12 poziom parametru  $C^*$  istotnie obniżył się w podczas przechowywania. W lodach tylko z inuliną (Abb12, BLr – **publikacja 1** oraz CP, CC, CA – **publikacja 2**) odcień barwy nie zmienił się istotnie wraz z wydłużeniem czasu przechowywania. Z kolei we wszystkich lodach z błonnikiem jabłkowym (AFBB12, BFLr, CPF, CCF, CAF) stwierdzono obniżenie wartości dominującej długości fali w spektrum barwy ( $h^0$ ) wraz z wydłużeniem czasu przechowywania.

Puszystość lodów CCF, CA i CAF zwiększyła się istotnie pomiędzy 7 a 21 dniem przechowywania. W pozostałych grupach lodów czas przechowywania nie wpłynął istotnie na ich puszystość. Jednak analizując wpływ czasu przechowywania na czas spłynięcia pierwszej kropli zaobserwowano, że w każdej grupie lodów wydłużenie czasu przechowywania skutkowało istotnym skróceniem czasu spłynięcia pierwszej kropli. Również całkowity czas topnienia skracał się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania (**publikacja 1 i 2**).

W badaniach Akalin i in. (2018) największą masą roztopionych lodów w ciągu 180 dni przechowywania cechowały się lody kontrolne (11,08 g) i z błonnikiem owsianym (11,26 g). Najniższe wartości topnienia podczas całego okresu przechowywania (180 dni) wykazywały lody z 2% dodatkiem błonnika pomarańczowego (4,49 g) i 2% dodatkiem błonnika jabłkowego (4,23 g). Ilość roztopionych lodów znacząco zmniejszyła się we wszystkich próbach pod koniec okresu przechowywania w porównaniu do pierwszego terminu badań. Dodatek inuliny w lodach probiotycznych wyprodukowanych przez Akalin i Erisir (2008) spowodował wolniejszą zmianę właściwości topnienia i najdłuższy czas spłynięcia pierwszej kropli, w porównaniu z próbą kontrolną podczas 90 dniowego okresu przechowywania.



Wykres 18. Wpływ czasu przechowywania na liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w lodach z błonnikami

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego w temperaturze  $-22^{\circ}\text{C}$  liczba żywych komórek bakterii probiotycznych we wszystkich grupach lodów obniżyła się i populacja zmniejszyła się o kolejne 0,2 - 1,2 log jtk  $\text{g}^{-1}$ , w porównaniu z liczbą komórek po zamrożeniu. Istotną redukcję komórek bakterii stwierdzono w lodach fermentowanych *L. casei*, *L. paracasei* i *L. acidophilus* w porównaniu z liczbą komórek po zamrożeniu. Wydłużenie czasu przechowywania lodów z 7 do 21 dni nie wpłynęło istotnie na liczbę żywych komórek bakterii we wszystkich grupach lodów (wykres 18). Zarówno po 7 jak i 21 dniach przechowywania najniższą liczbę komórek bakterii stwierdzono w lodach CA i CAF, fermentowanych przez *L. acidophilus*. Z kolei najwyższą liczbę komórek bakterii po 21 dniach przechowywania stwierdzono w lodach BLr i BFLr, z *L. rhamnosus*. Najkorzystniejszą przeżywalnością w czasie przechowywania charakteryzował się szczep *L. rhamnosus* (96,89% dla BLr i 98,04% dla BFLr), co predysponuje go do wykorzystania w produkcji probiotycznych lodów z mleka owczego. Po 21 dniach przechowywania lodów liczba komórek bakterii w każdej grupie przekroczyła 8 log jtk  $\text{g}^{-1}$  i tym samym lody te spełniają wymagania stawiane żywności probiotycznej oraz mogą zapewnić osiągnięcie efektu terapeutycznego.

Według badań przeprowadzonych przez Acu i in. (2020), w ciągu 120 dni przechowywania w lodach synbiotycznych z mleka koziego, liczba komórek bakterii probiotycznych *L. paracasei* ssp. *paracasei* oraz *Bifidobacterium* była wyższa niż 7 log jtk  $\text{g}^{-1}$ . W badaniu Akalin i in. (2018), w lodach mlecznych wzbogaconych błonnikiem jabłkowym oraz pszenicznym, przechowywanych przez okres 1, 30, 60 i 90 dni, stwierdzono liczbę komórek *L. acidophilus* porównywalną do liczby tych bakterii w próbie kontrolnej. Również *L. acidophilus* miał lepszy współczynnik przeżywalności w ciągu 180 dni w porównaniu z *B. animalis* ssp. *lactis*. Badania przeprowadzone przez Turgut i Cakmakci (2009) wykazały, że populacja *L. acidophilus* w lodach probiotycznych zmniejszyła się o 0,38 log jtk  $\text{g}^{-1}$  z 7,13 log jtk  $\text{g}^{-1}$  w pierwszym dniu przechowywania, do 6,75 log jtk  $\text{g}^{-1}$  w 90 dniu przechowywania, w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Jednak liczba komórek bakterii probiotycznych *L. acidophilus* oraz *B. bifidum* nie zmniejszyła się istotnie podczas 90 dni przechowywania zamrażalniczego. W lodach przechowywanych przez okres 12 tygodni w warunkach zamrażalniczych w temperaturze  $-26^{\circ}\text{C}$ , Salem i in. (2005) odnotowali redukcję liczby żywych komórek dla różnych szczepów probiotycznych o 2,23 log jtk  $\text{g}^{-1}$  dla *L. acidophilus*, 1,68 log jtk  $\text{g}^{-1}$  dla *B. bifidum*, 1,54 log jtk  $\text{g}^{-1}$  dla *L. reuteri*, 1,23 log jtk  $\text{g}^{-1}$  dla *L. gasseri* oraz 1,77 log jtk  $\text{g}^{-1}$  dla *L. rhamnosus*. Arslaner i Ali Salik (2022) wykazali niższą liczbę komórek *L. acidophilus* LA-5 w grupach kontrolnych w 15, 30 oraz 60 dniu przechowywania, w porównaniu z próbkami z dodatkiem musu jabłkowego. Jednak różnice te były nie istotne, a liczba żywych komórek we wszystkich próbach wynosiła powyżej 6,00 log jtk  $\text{g}^{-1}$  przez cały okres przechowywania (7,37 log jtk  $\text{g}^{-1}$  w 60 dniu przechowywania). Nie stwierdzono także istotnych różnic w liczebności populacji *L. acidophilus* LA-5 w dniach 15, 30 i 60. W badaniach Goktas (2023) w lodach z *L. rhamnosus* po 1 dniu przechowywania oznaczono liczbę komórek bakterii 8,41 log jtk  $\text{g}^{-1}$ , natomiast po 120 dniach przechowywania populacja zmniejszyła się do 8,24 log jtk  $\text{g}^{-1}$ . Ayar i in. (2017), po 60-dniowym okresie przechowywania lodów na bazie jabłek z błonnikiem, stwierdzili liczbę komórek *L. acidophilus* LA-5 wynoszącą 7,24 log jtk  $\text{g}^{-1}$ . Ahmad i in. (2020) w lodach wykazali wyższą liczbę komórek probiotycznych, co może wynikać z właściwości ekstraktu polifenolowego ze skórki jabłka, który wpływa na zwiększenie przeżywalności szczepów probiotycznych powyżej zalecanych poziomów. Podobnie, zbadana przez Arslaner

i Ali Salik (2022), przeżywalność szczepu *L. acidophilus* LA-5 w próbach z dodatkiem musu jabłkowego (100,69%), była istotnie wyższa niż w próbach kontrolnych lodów (96,47%). Prawdopodobną przyczyną zwiększonej żywotności komórek probiotycznych podczas przechowywania była wysoka zawartość składników odżywczych, profil cukru inwertowanego oraz dostępne fitochemikalia z dodatku jabłkowego do lodów. Odkrycia te zgadzają się z wynikami niektórych badań, z których wynika, że fruktoza jest głównym cukrem metabolizowanym przez *Lactobacillus* w soku z granatów, soku jabłkowym oraz z cytryny (Mousavi i in. 2011, Hashemi i in. 2017, Peng i in. 2021). Saputro i in. (2023) wykazali, że żywotność komórek w lodach synbiotycznych zawierających 2% inuliny zmniejszyła się o 1 log jtk g<sup>-1</sup>, utrzymując stabilną wartość przez 12 tygodni przechowywania i pozostając na poziomie 7 log jtk g<sup>-1</sup>. Według Sabet-Sarvestani i in. (2021) w sześćdziesiątym dniu przechowywania lodów, liczba komórek bakterii w lodach fermentowanych przez *L. casei* była wyższa niż w lodach fermentowanych przez *L. plantarum*. Sabet-Sarvestani i in. (2021) dokonali analizy, która wykazała, że lody synbiotyczne charakteryzowały wyższą liczbą probiotyków w porównaniu z lodami probiotycznymi, co sugeruje korzystny wpływ fruktooligosacharydów na ich wzrost. Jednak w trakcie przechowywania nastąpiła redukcja populacji komórek probiotycznych. Autorzy sugerują, że było to rezultatem obniżenia pH oraz działania szoku termicznego. Podobne wyniki uzyskali Afzaal i in. (2019), którzy badali lody probiotyczne zawierające *L. acidophilus* przez 60 dni przechowywania zamrażalniczego. Stopień redukcji liczby komórek bakterii w lodach synbiotycznych był niższy niż w próbach probiotycznych. Badania Balthazar i in. (2018) skupiły się również na wpływie dodatku inuliny i szczepu *L. casei* na właściwościach lodów probiotycznych i synbiotycznych. Ich wyniki potwierdziły, że liczba komórek bakterii w lodach była niższa niż w mieszance lodowej oraz nastąpiła redukcja populacji w czasie przechowywania, a także komórki szczepów probiotycznych wykazywały większą przeżywalność w lodach synbiotycznych, niż probiotycznych.

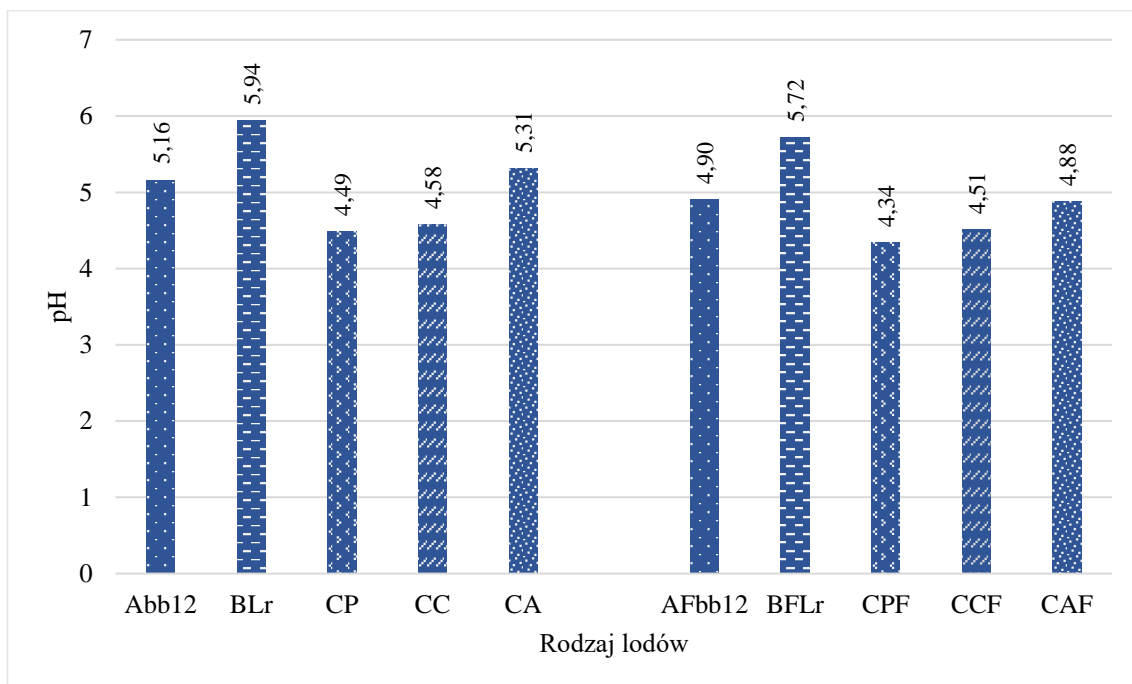
W badaniach własnych czas przechowywania wpłynął korzystnie na wygląd lodów Abb12 i BLr, jednak różnice te nie były istotne. W pozostałych grupach lodów z inuliną noty przyznane za wygląd obniżyły się w 21 dniu oceny, w porównaniu do 7 dnia przechowywania. Wyniki oceny pozostałych cech organoleptycznych jednoznacznie wskazują brak istotnego wpływu czasu przechowywania na te parametry (**publikacja 1 i 2**). Również Salem i in. (2005) w lodach mlecznych zawierających szczepy probiotyczne nie zidentyfikowali zmian w smaku i zapachu podczas przechowywania.

W rezultacie, nie ma podstaw do odrzucenia **hipotezy H2** brzmiącej: czas przechowywania lodów kształtuje cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne lodów z mleka owczego. Można więc w pełni uznać, że została ona zweryfikowana pozytywnie.

#### **4.4 Wpływ rodzaju zastosowanych błonników na cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne lodów**

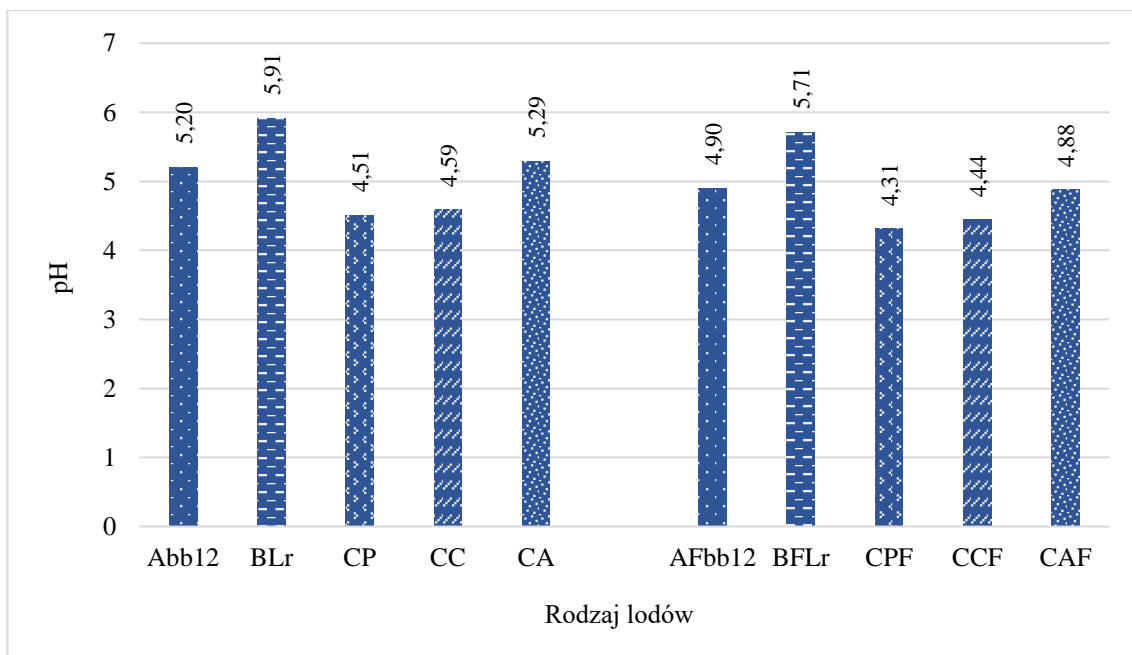
Kolejnym z podjętych działań była weryfikacja **hipotezy H3** brzmiącej: rodzaj zastosowanych błonników kształtuje cechy fizykochemiczne, mikrobiologiczne i organoleptyczne lodów.

Przeprowadzone badania wskazują, że częściowe zastąpienie inuliny 1,5% dodatkiem błonnika jabłkowego skutkowało obniżeniem wartości pH we wszystkich grupach lodów oraz utrzymaniem niższego pH w tych grupach badawczych przez cały okres przechowywania (wykres 19, 20). Również w lodach z błonnikiem jabłkowym zawartość kwasu mlekowego była wyższa o  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  –  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  niż w odpowiednikach zawierających samą inulinę. Także w tym przypadku różnice utrzymywały się podczas przechowywania lodów (**publikacja 1 i 2**).

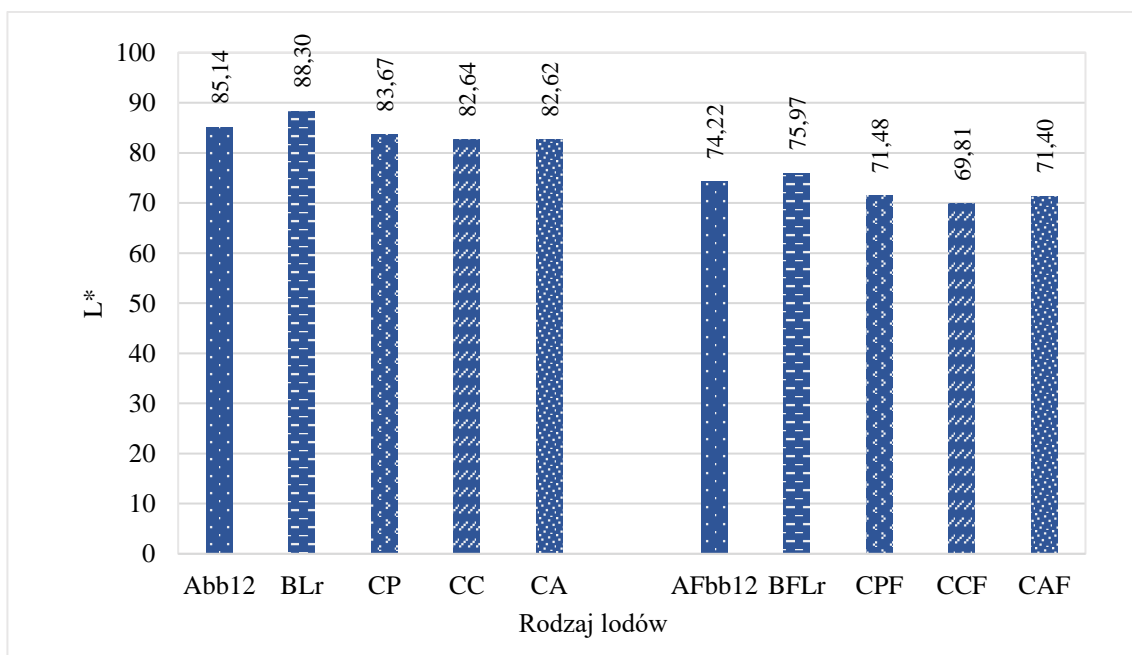


Wykres 19. Wpływ dodatku błonnika na wartość pH lodów po 7 dniach przechowywania  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Wyższa kwasowość próbek zawierających błonnik jabłkowy przed pasteryzacją może prowadzić do zwiększenia denaturacji cieplnej białek serwatkowych, a także poprawiać zdolność wiązania wody przez mieszanę lodową. Według Akalin i in. (2018) obecność błonnika jabłkowego, pomarańczowego i bambusowego w lodach probiotycznych zwiększyła kwasowość odpowiednio o:  $0,16 \text{ g } 100^{-1}$ ,  $0,24 \text{ g } 100^{-1}$  i  $0,07 \text{ g } 100^{-1}$ , w porównaniu do próby kontrolnej. Dodatek 2% sproszkowanego imbiru do lodów wyprodukowanych przez Gabbi i in. (2018) powodował wzrost kwasowości w porównaniu do próby kontrolnej (z  $0,20 \text{ g}^{-1}$  do  $0,21 \text{ g}^{-1}$ ) i obniżenie wartości pH, odpowiednio z 6,65 do 6,55. Było to prawdopodobnie spowodowane obecnością kwasu askorbinowego oraz substancji fenolowych w imbirze, które charakteryzują się właściwościami kwaśnymi. Według Ayar in. (2017) najniższymi wartościami pH (5,61) cechowały się lody probiotyczne z *L. acidophilus* i *B. animalis*, z 4% dodatkiem błonnika winogronowego. Natomiast Ismail i in. (2020) wykazali, że wartości pH lodów wzbogaconych sproszkowaną skórką granatu oraz lodów kontrolnych różniły się istotnie. Lody z dodatkiem 0,25% sproszkowanej skórki z granatu charakteryzowały się niższym pH, wynoszącym 6,47, w porównaniu do lodów kontrolnych, których pH wynosiło 6,73. Ponadto, kwasowość lodów wzbogaconych wynosiła  $0,28 \text{ g L}^{-1}$ , podczas gdy w lodach kontrolnych zawartość kwasu mlekowego wyniosła  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ . Podobne wyniki uzyskali Rashid i Hassan (2005), którzy wyprodukowali lody z dodatkiem owocu palmy Doum.

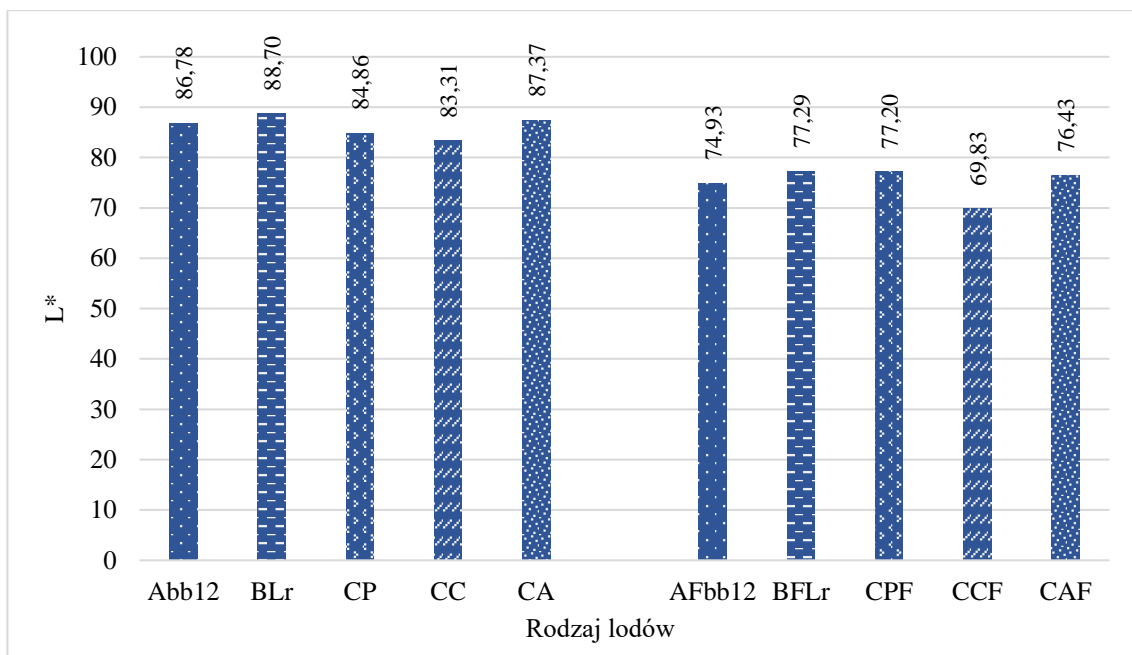


Wykres 20. Wpływ dodatku błonnika na wartość pH lodów po 21 dniach przechowywania  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

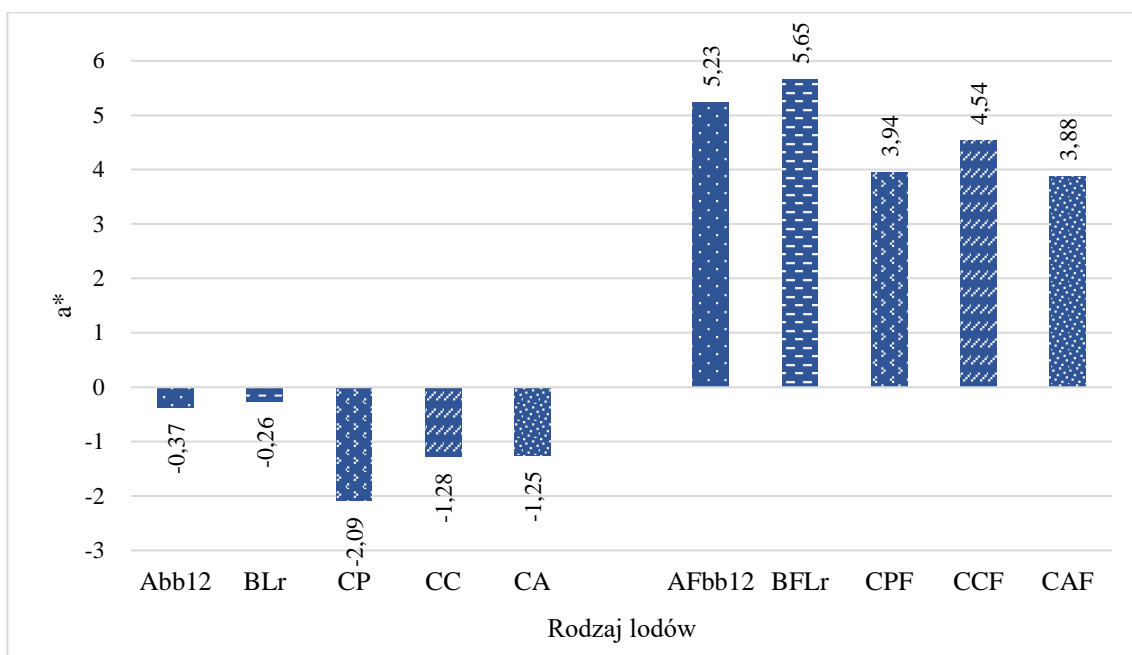


Wykres 21. Wpływ dodatku błonnika na jasność L\* lodów po 7 dniach przechowywania  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Zastosowanie 1,5% dodatku błonnika jabłkowego spowodowało istotne pociemnienie barwy lodów utrzymujące się w czasie przechowywania zamrażalniczego (wykres 21, 22). Dodatek błonnika jabłkowego zmniejszył jasność barwy L\* o 7,6 - 13,4 jednostki w porównaniu do lodów z inuliną.

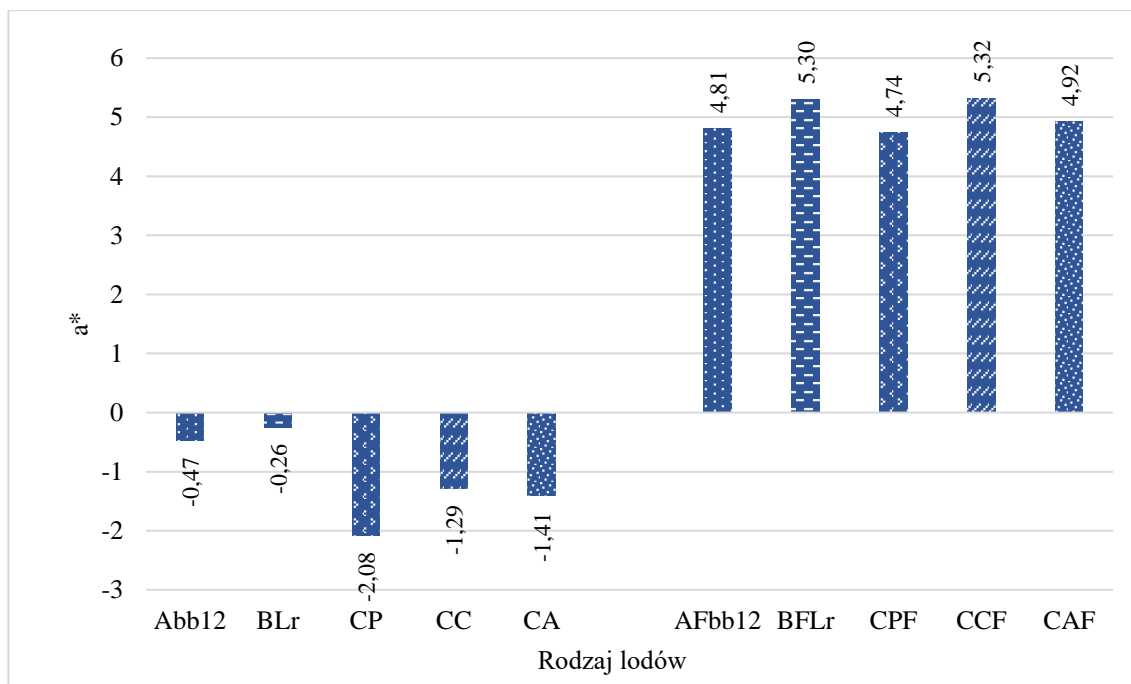


Wykres 22. Wpływ dodatku błonnika na jasność L\* lodów po 21 dniach przechowywania  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2



Wykres 23. Wpływ dodatku błonnika na składową barwy a\* lodów po 7 dniach przechowywania  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Lody z dodatkiem błonnika jabłkowego charakteryzowały się wyższym udziałem barwy czerwonej, która spowodowana była obecnością w błonniku związków fenolowych i pektyn. Natomiast lody z dodatkiem inuliny cechowały się większym udziałem barwy zielonej, gdzie składowa a\* przyjmowała wartości ujemne (wykres 23, 24).



Wykres 24. Wpływ dodatku błonnika na składową barwy a\* lodów po 21 dniach przechowywania

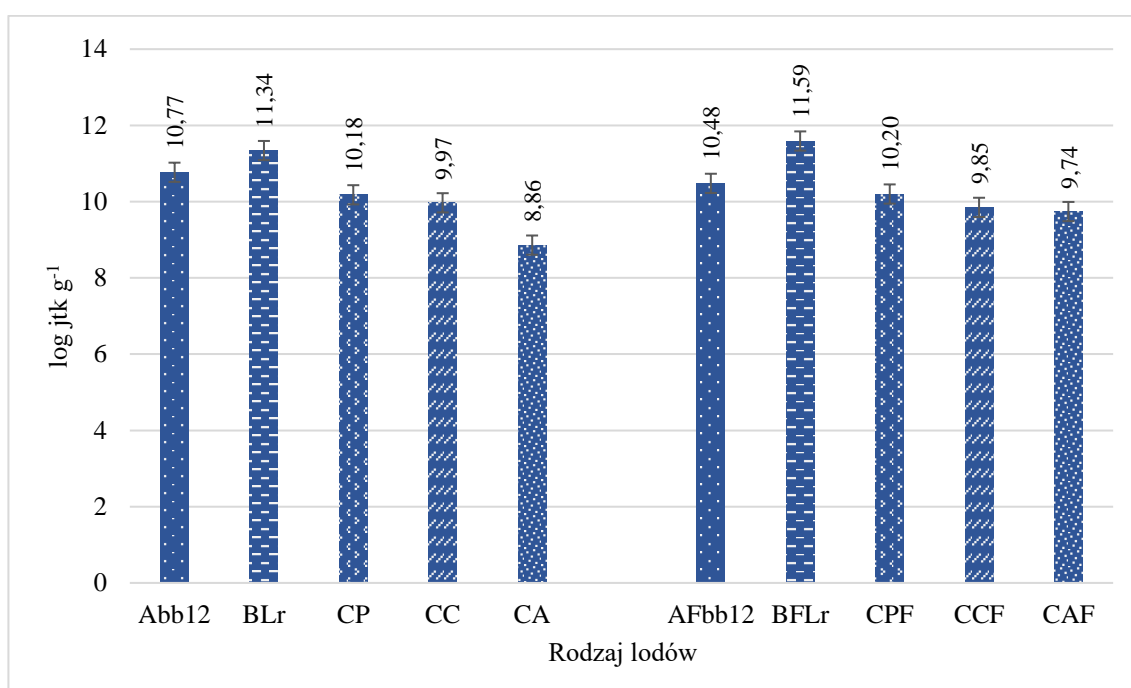
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Analizując parametr barwy b\* i nasycenie C\* stwierdzono, że w większości grup badawczych dodatek błonnika jabłkowego powodował zwiększenie czystości i intensywności barwy żółtej, która jeszcze bardziej intensyfikowała się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania do 21 dni. Wyjątek stanowią lody Abb12 (dodatek 4% inuliny) i AFbb12 (dodatek 2,5% inuliny i 1,5% błonnika jabłkowego), fermentowane przez *B. animalis*, gdzie parametry b\* i C\* w lodach z błonnikiem jabłkowym przyjmowały niższe wartości niż w lodach z inuliną (**publikacja 1**). Ocień barwy h<sup>0</sup> w lodach z błonnikiem jabłkowym przyjmował niższe wartości niż w lodach z inuliną przez cały okres badań.

W badaniach przeprowadzonych przez Dervisoglu i in. (2006) oraz przez Crizel i in. (2014) stwierdzono, że lody wzbogacone o błonnik cytrusowy charakteryzowały się niższymi wartościami parametru L\*, a jednocześnie wyższymi wartościami a\* i b\*. Wynika to z faktu, że błonnik ma brązową barwę, co powoduje zmniejszenie jasności produktu oraz nadaje mu intensywniejszy odcień czerwono-żółty. Akalin i in. (2018) wykazali, że dodatek błonnika pomarańczowego i jabłkowego intensyfikował barwę czerwoną i żółtą oraz zmniejszył jasność L\* lodów. Analiza parametrów barwy lodów produkowanych przez Florowską i in. (2013) z dodatkiem różnych preparatów błonnikowych dowiodła, że dodatek inuliny i maltodekstryny nie wpłynął na barwę lodów. Stwierdzono, że jedynie dodatek polidekstrozy spowodował niewielki wzrost wartości parametru b\* w porównaniu do grupy kontrolnej. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Lum i Albrecht (2008), dotyczących barwy lodów z dodatkiem inuliny i innych fruktooligosacharydów, nie stwierdzono wpływu tych dodatków na składowe barwy L\* oraz b\*. Niemniej jednak, wartość a\* lodów kontrolnych była istotnie wyższa niż w przypadku lodów zawierających błonnik pokarmowy. Tsevdou i in. (2019) zauważyli, że

dodatek miąższu i skórek winogron spowodował istotny wzrost intensywności charakterystycznego zaczerwienienia próbek lodów.

Bardzo ważną informację dostarczają badania dotyczące wpływu dodatku błonnika jabłkowego na przeżywalność bakterii probiotycznych podczas przechowywania zamrażalniczego. Wykazano, że częściowe zastąpienie inuliny błonikiem jabłkowym nie wpłynęło istotnie na wielkość populacji komórek bakterii w lodach AFbb12, BFLr, CPF, CCF, CAF zbadanej w 7 i 21 dniu przechowywania zamrażalniczego (wykres 25 i 26). W lodach z *L. acidophilus* dodatek inuliny i błonnika jabłkowego spowodował zmniejszenie przeżywalności tego szczepu, od 11,1% do 31,4%, w porównaniu z przeżywalnością oznaczoną w lodach z 4% dodatkiem inuliny.



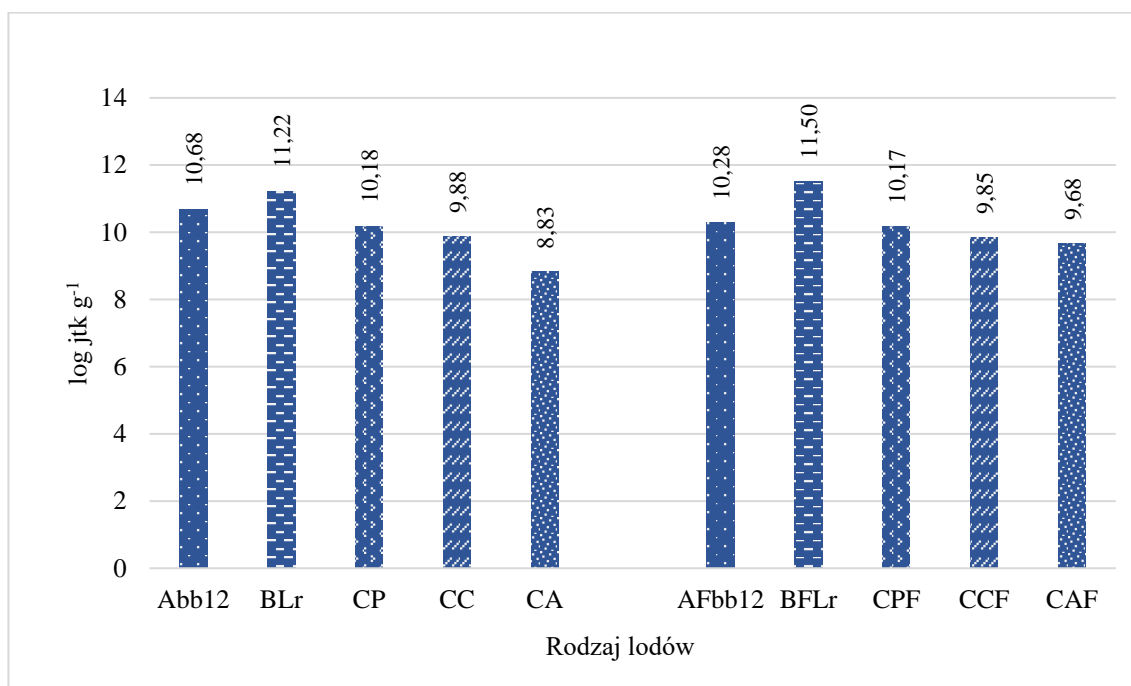
Wykres 25. Wpływ dodatku błonnika na liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w lodach po 7 dniach przechowywania

Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Szczegółowa analiza wyników napowietrzenia lodów przedstawionych w publikacjach 1 i 2 wskazuje, że dodatek błonnika istotnie zwiększył napowietrzenie lodów CPF, CCF i CAF w porównaniu do ich odpowiedników z inuliną. Natomiast nie wykazano istotnego wpływu dodatku błonnika jabłkowego na puszystość w lodach AFbb12 i BFLr w obu terminach badań.

Według dostępnych wyników badań naukowych, odpady po przetworzeniu winogron, brzoskwiń i jabłek są bogatym źródłem pektyn, które charakteryzują się korzystnymi właściwościami żelującymi (Schieber i in. 2001). Dodatkowo, ten rodzaj pektyny jabłkowej jest w stanie poprawić zdolność napowietrzania, co zostało potwierdzone przez wyniki badań własnych. Zgodnie z badaniami Feizi i in. (2021), napowietrzanie obniża się wraz z większym wzbogaceniem liofilizatu nasion chia. Poziom napowietrzania lodów zawierających liofilizat bazylii, zgodnie z wynikami Bahram-Parvar i Goff (2013), wyniósł odpowiednio 46,5% i 42,5% dla dodatku 0,1% i 0,2%. Natomiast zawartość pektyny znanej ze zdolności żelowania w błonniku jabłkowym wyjaśnia, dlaczego lody z błonikiem jabłkowym charakteryzowały się

wyższą puszystością. Wartości puszystości lodów wyprodukowanych przez Crizel i in. (2014) wynosiły od 17,3% (lody z dodatkiem 1,5% błonnika pomarańczowego) do 54,5% (lody mleczne kontrolne). Dodatek błonnika w tym przypadku zmniejszył puszystość lodów, prawdopodobnie ze względu na niższą zawartość tłuszczu. Florowska i in. (2013) wykazali, że spośród badanych lodów mlecznych, istotnie mniejszą puszystością, w porównaniu do wariantu kontrolnego, charakteryzowały się lody z dodatkiem inuliny i polidekstrozy. Nie zaobserwowano istotnego obniżenia puszystości lodów przy dodatku maltodekstryny, w porównaniu do próby kontrolnej.



Wykres 26. Wpływ dodatku błonnika na liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w lodach po 21 dniach przechowywania

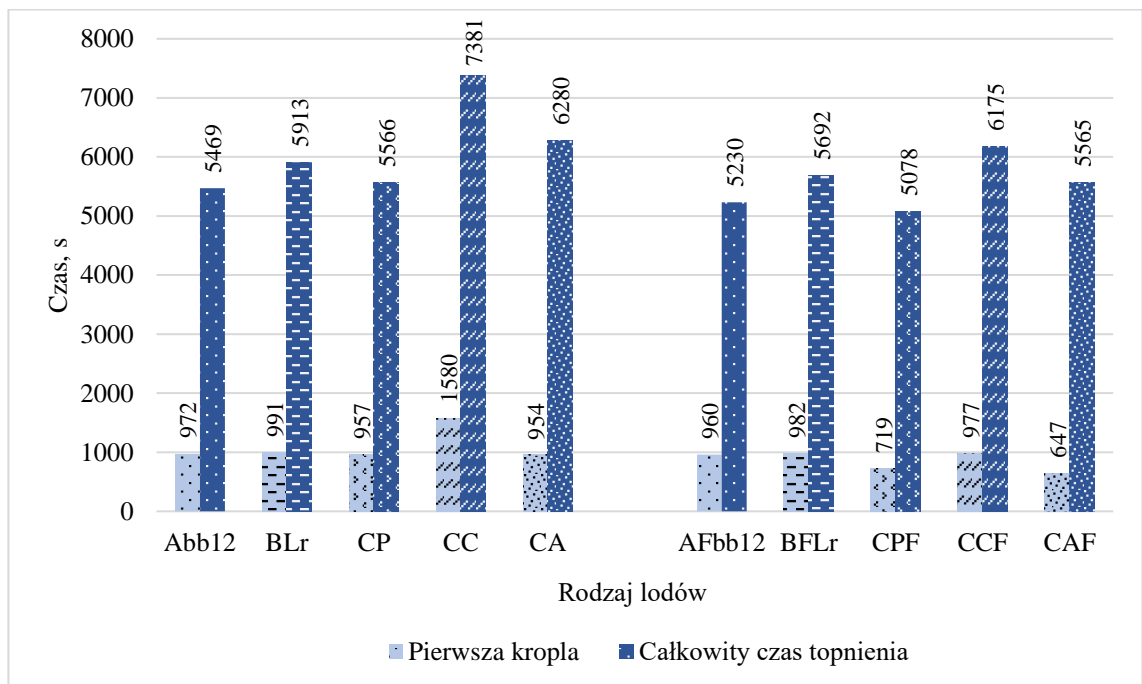
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Częściowe zastąpienie inuliny błonnikiem jabłkowym skutkowało skróceniem czasu spłynięcia pierwszej kropli oraz całkowitego czasu topnienia wszystkich grup lodów (wykres 27, 28). Najdłuższym czasem spłynięcia pierwszej kropli i całkowitym czasem topnienia charakteryzowały się lody CC fermentowane przez *L. casei* (1580 s i 7381 s, po 7 dniach) (wykres 27). Natomiast dodatek błonnika w lodach CCF wpłynął na skrócenie czasu spłynięcia pierwszej kropli do 977 s, zaś całkowitego czasu topnienia do 6175 s, w 7 dniu przechowywania.

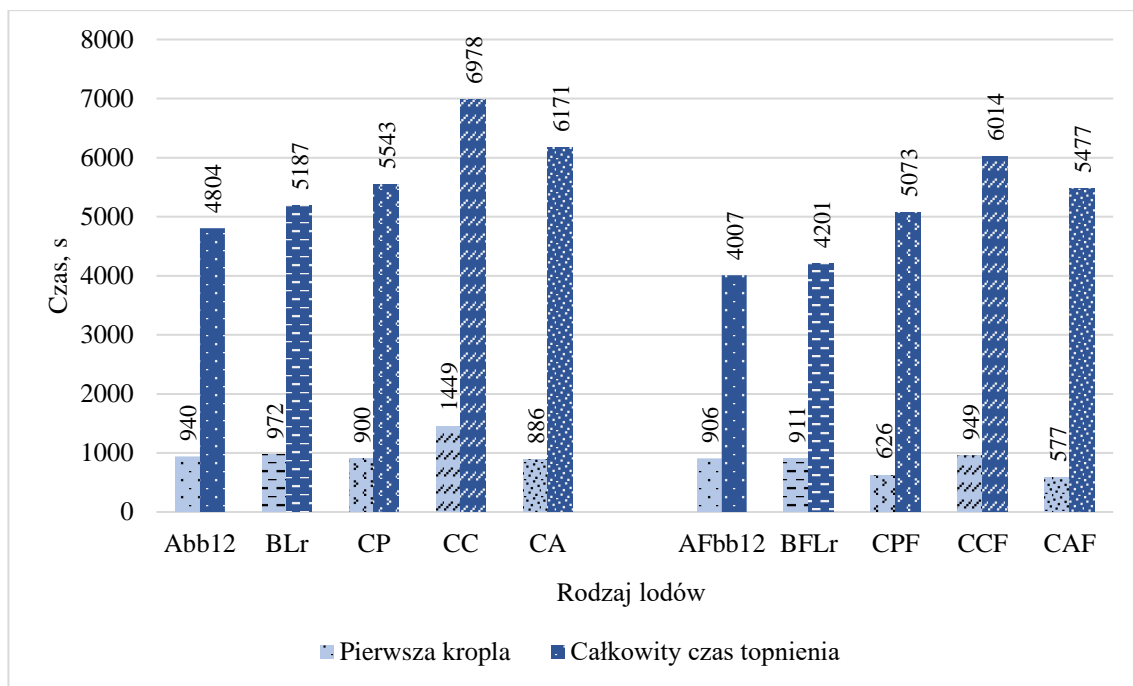
Według Lu i in. (2020) wprowadzenie dodatku błonnika cytrusowego w ilości 1,8 g 100 g<sup>-1</sup> do lodów rzemieślniczych wpłynęło znacznie na ich właściwości fizyczne, w szczególności na czas topnienia, który został wydłużony z 20 do 50 minut. Taki rozkład wyników może wynikać z właściwości pektyny zawartej w błonniku jabłkowym, która oddziałuje z innymi składnikami mleka, co prowadzi do utworzenia gęstej struktury sieciowej. Z kolei ten proces przyczynia się do ograniczenia szybkości wymiany ciepła. Ponadto, Varela i in. (2014), Pintor i in. (2017) oraz Akalin i in. (2008) zauważyli, że dodatek błonnika

jabłkowego powoduje zwiększenie temperatury zamrażania, zmniejszenie liczby kryształków lodu i zawartości procentowej zamrożonej wody oraz obniżenie współczynnika topnienia.

Według Gabbi i in. (2018) 2% dodatek proszku imbirowego do lodów znacząco wydłużył czas spłynięcia pierwszej kropli, a różnica pomiędzy próbą kontrolną wynosiła 4 minuty. Ponadto 2% dodatek błonnika pszennego zwiększył istotnie puszystość lodów probiotycznych w porównaniu z próbami bez błonnika (o 5,05%). Akalin i in. (2018) wykazali, że najszybciej topiły się lody probiotyczne z 2% dodatkiem błonnika jabłkowego i pomarańczowego. Według Crizel i in. (2014) dodatek 1,5% błonnika pomarańczowego nie miał istotnego wpływu na topnienie lodów w porównaniu do prób kontrolnych. Należy dodać, że inulina jest stabilizatorem, który przyczynia się do powstania sieci żelowej, co skutkuje produktem bardziej odpornym na topnienie. Zhang i in. (2018) udowodnili, że dodatek pektyny skutecznie redukuje tempo topnienia lodów, co prowadzi do poprawy stabilności tego produktu. Florowska i in. (2013) wykazali, że lody z 10% dodatkiem preparatów błonnikowych (inuliny, polidekstrozy, maltodekstryny) charakteryzowały się dłuższym czasem topnienia, niż lody kontrolne.



Wykres 27. Czas spłynięcia pierwszej kropli oraz całkowity czas topnienia lodów w zależności od dodatku błonnika jabłkowego i inuliny po 7 dniach przechowywania  
Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2



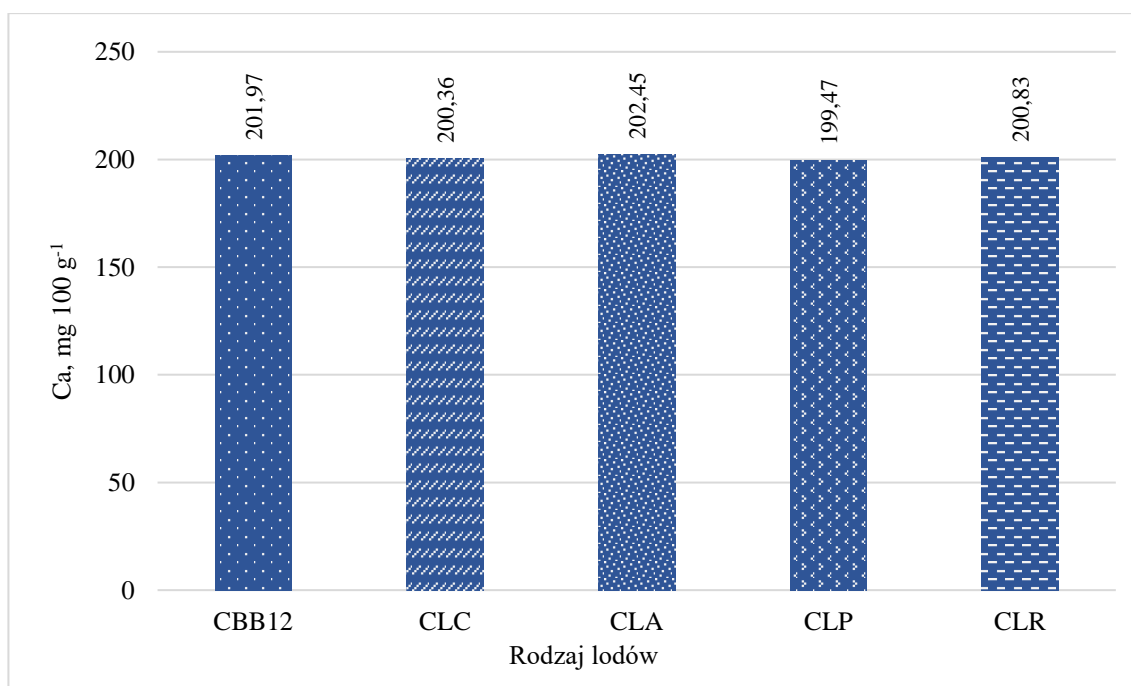
Wykres 28. Czas spłynięcia pierwszej kropli oraz całkowity czas topnienia lodów w zależności od dodatku błonnika jabłkowego i inuliny po 21 dniach przechowywania  
 Źródło: badania własne - publikacja 1 i 2

Dodatek błonnika jabłkowego wpłynął na wygląd lodów z mleka owczego. Lody z mleka owczego z błonnikiem były ciemniejsze i bardziej czerwone niż lody zawierające wyłącznie inulinę. Zespół oceniający wskazał również, że lody z mleka owczego z dodatkiem błonnika jabłkowego charakteryzowały się mniejszą gładkością i większą piaszczystością. Błonnik jabłkowy nie intensyfikował smaku słodkich lodów w obydwu terminach badań. Ponadto, w lodach AFbb12 i BLr, dodatek błonnika jabłkowego powodował zwiększenie intensywności odczucia smaku i zapachu dodatków smakowych. Natomiast w lodach CPF, CCF i CAF zależność tą potwierdzono jedynie w 7 dniu przechowywania. Należy również dodać, że nie stwierdzono wpływu zastosowanego dodatku błonnika jabłkowego na obecność smaku i zapachu obcego. Twardość lodów była uzależniona od ilości powietrza w lodach oraz od rozmiaru kryształków lodu (Liu i in. 2023). Im większe kryształki lodu, tym lody są twardsze. Jednakże, wraz z większym napowietrzeniem, lody stają się bardziej miękkie (Muse i Hartel 2004, Palka i Palich 2008). W badaniach Gabbi i in. (2018) smak, tekstura i wygląd lodów zostały uznane za akceptowalne przy wprowadzeniu 1% dodatku sproszkowanego imbiru. W badaniach Akalin i in. (2018) probiotyczne lody mleczne z 2% dodatkiem błonnika jabłkowego oraz pomarańczowego charakteryzowały się niższymi notami za smak i zapach w porównaniu z pozostałymi próbkami. Podobne noty za smak lodów mlecznych z 1,5% dodatkiem błonnika pomarańczowego zaobserwowano w badaniach Crizel i in. (2014). Przedstawiona weryfikacja postawionej **hipotezy H3** nie daje podstaw do jej odrzucenia, więc można uznać, że została zweryfikowana pozytywnie.

#### 4.5 Wpływ zastosowanych szczepów probiotycznych na biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego

Lody, jako popularny deser, są spożywane na całym świecie i mogą być doskonałym nośnikiem związków mineralnych. Dodatek bakterii probiotycznych, inuliny i błonnika jabłkowego może potencjalnie pomóc w poprawie biodostępności makroskładników odżywczych. W literaturze przedmiotu nie ma informacji na temat biodostępności wapnia, potasu, magnezu i fosforu z lodów z mleka owczego wytwarzanych z mieszanek fermentowanych przez szczepy probiotyczne. Różnice w składzie mleka (w makro i mikroskali) różnych gatunków zwierząt oznaczają, że potrzebne są dalsze badania w celu doboru szczepu probiotycznego zwiększającego biodostępność mikro- i makroelementów (Bielik i Kolisek 2021, Arbuckle 1986, Van der Hee i in. 2009). Dlatego też podjęto działania w celu weryfikacji **hipotezy H4**: biodostępność makroelementów lodów z mleka owczego zależy od zastosowanego szczepu bakterii probiotycznych (**publikacja 4**). Analizę tej hipotezy przeprowadzono z wykorzystaniem grup kontrolnych (CLC, CLA, CBB12, CLP, CLR).

W lodach z mleka owczego kluczowa jest obecność miceli kazeinowych, które są koloidami białkowymi zawierającymi około 70% całkowitego wapnia i 50% całkowitego nieorganicznego fosforanu (Bijl i in. 2013). Fosforan wapnia zamknięty jest w micelach kazeinowych w postaci małych nanoklastrów, zwykle o średnicy 4–5 nm. Dlatego micelle, które zawierają kilkaset nanoklastrów fosforanu wapnia i dziesiątki tysięcy cząsteczek kazeiny, można uznać za białkowy nośnik fosforanu wapnia (De Kruif i in. 2012, Shkemi i Huppertz 2022). Aby zapewnić odpowiedni transport, część wapnia z lodów jest kompleksowana cytrynianem, który występuje w mleku w ilości 0,20 mg 100 g<sup>-1</sup> (Dunshea i in 2019).

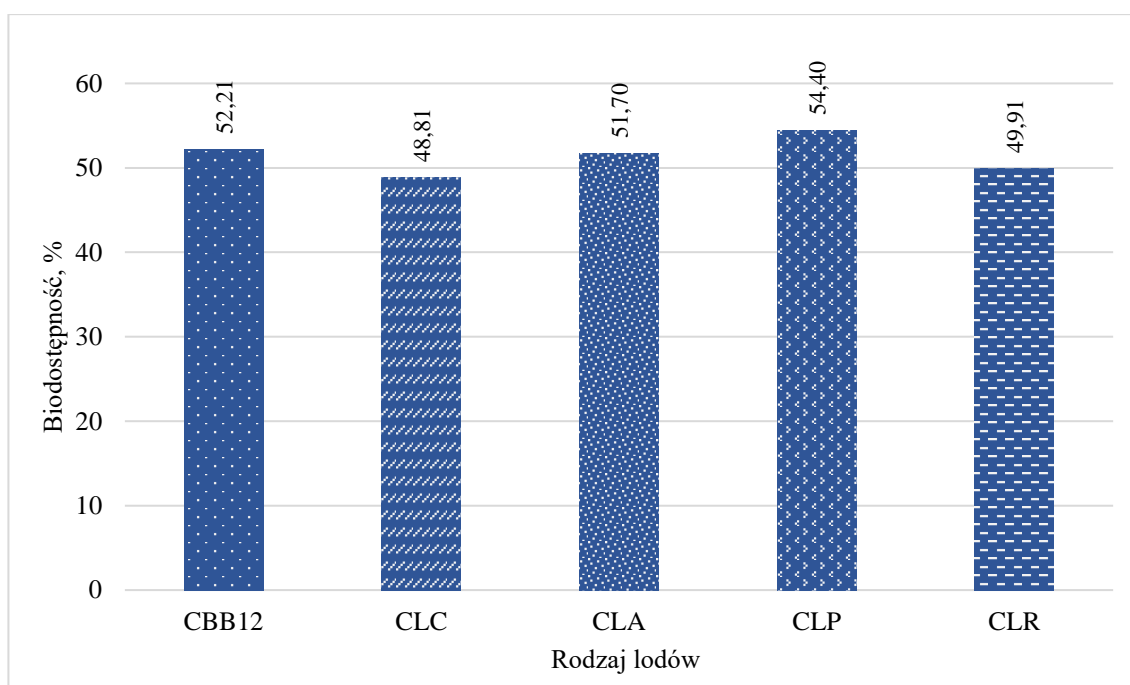


Wykres 29. Zawartość wapnia w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych

Źródło: badania własne - publikacja 4

Dla prawidłowego metabolizmu fosforanowo-wapniowego istotny jest także odpowiedni stosunek wapnia do fosforu w diecie. Dla dorosłych korzystny stosunek wynosi 1:1 lub 1,5:1 (Kaczkan i in. 2018, Nieto i in 2021), co wskazuje, że w przypadku badanych lodów z mleka owczego jest bardzo korzystny, ponieważ waha się od 1,28:1 do 1,32:1. We wszystkich kontrolnych grupach lodów (CLC, CLA, CBB12, CLP, CLR) zawartość wapnia wahała się od 199,47 mg 100 g<sup>-1</sup> do 202,45 mg 100 g<sup>-1</sup> i była porównywalna z zawartością wapnia w mleku owczym (202,83 mg 100 g<sup>-1</sup>) (wykres 29).

Największą biodostępność wapnia, w zależności od rodzaju zastosowanych szczepów bakterii probiotycznych, wykazano dla lodów CLP (54,4%) fermentowanych przez *L. paracasei* (wykres 30). Natomiast najmniejszą biodostępnością wapnia (wynoszącą 48,81%) cechowały się lody z *L. casei*. Dla porównania, zawartość fosforu w lodach CLC, CLA, CBB12, CLP, CLR wahała się od 154,35 mg 100 g<sup>-1</sup> do 157 mg 100 g<sup>-1</sup>. Największą biodostępnością fosforu (>50%) charakteryzowały się lody fermentowane przez *B. animalis* (CBB12). Pozostałe grupy kontrolne lodów charakteryzowały się niższą biodostępnością fosforu, o 1 - 2,5%.



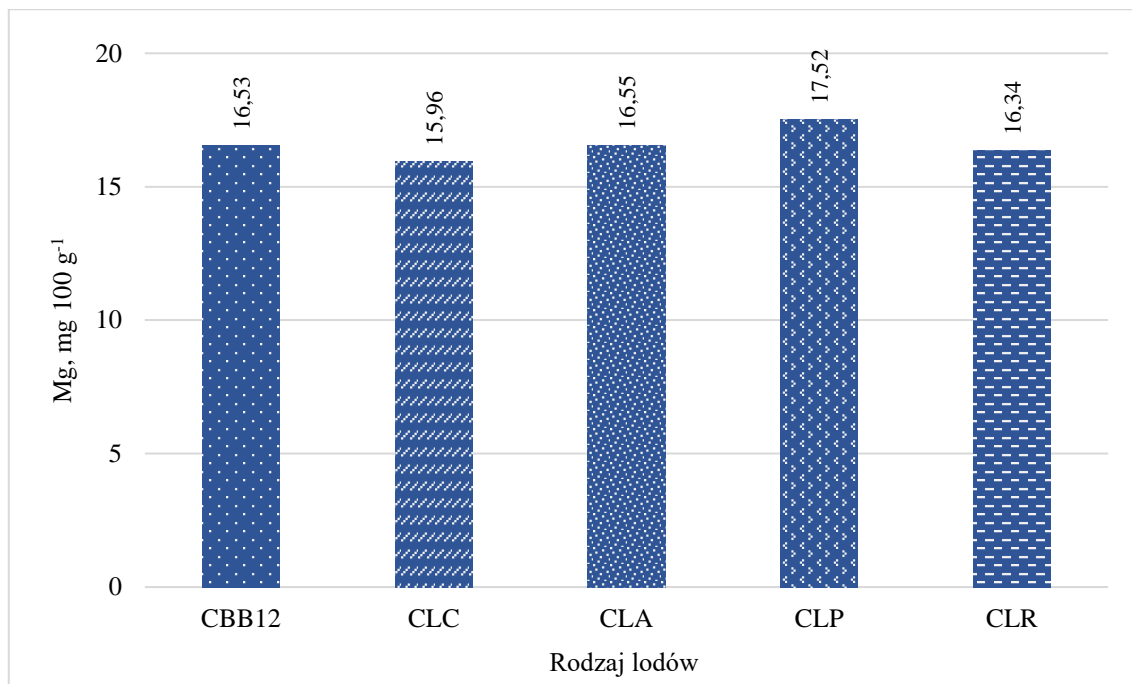
Wykres 30. Biodostępność wapnia w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych

Źródło: badania własne - publikacja 4

Przeprowadzone badania oraz dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA wskazują, że na biodostępność wapnia z lodów z mleka owczego istotny wpływ ma szczep probiotyków zastosowanych do fermentacji ( $p = 0,0001$ ). Natomiast nie stwierdzono takiego wpływu w przypadku biodostępności fosforu (**publikacja 4**).

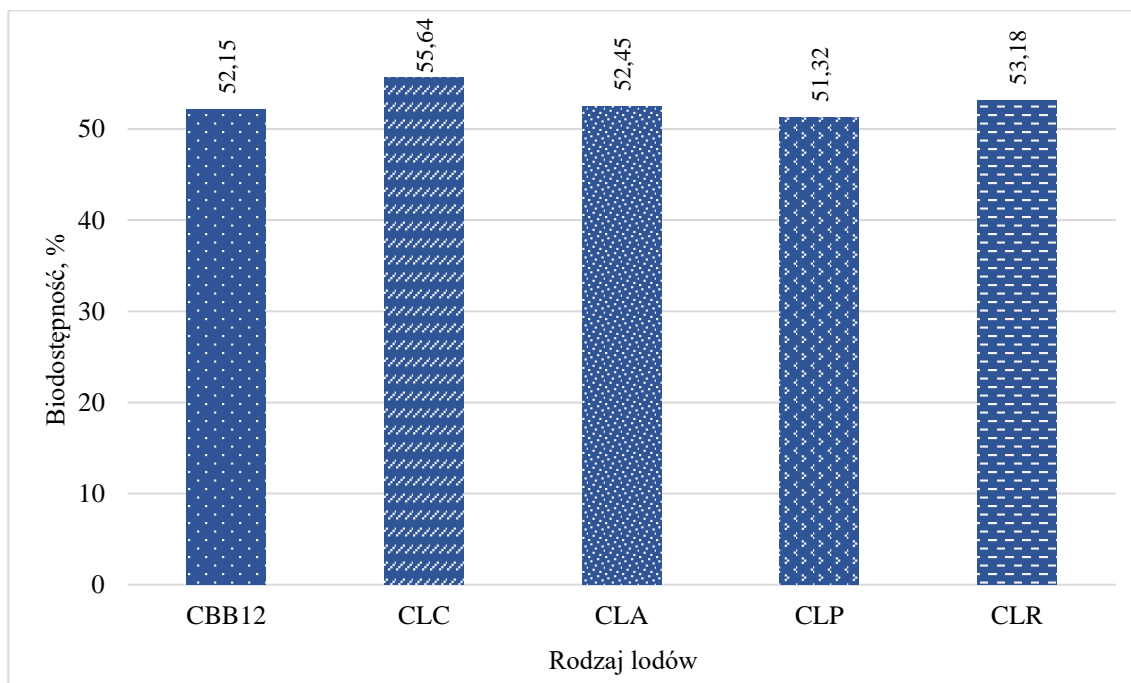
Mleko owcze dostarcza 16–18 mg na 100 g<sup>-1</sup> magnezu, który występuje w postaci związków rozpuszczalnych (ok. 73–75% Mg ogółem) i koloidalnych (fosforany, cytryniany). Tylko około 15% magnezu występuje w postaci zjonizowanej (Mayer i Fiechter 2012). Mleko owcze wykorzystane do badań zawierało 15,96 mg 100 g<sup>-1</sup> magnezu. W lodach kontrolnych

zawartość tego makroelementu oznaczono w przedziale od 15,96 mg 100 g<sup>-1</sup> w lodach z *L. casei* (CLC) do 17,52 mg 100 g<sup>-1</sup> w lodach z *L. paracasei* (CLP) (wykres 31).



Wykres 31. Zawartość magnezu w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych

Źródło: badania własne - publikacja 4



Wykres 32. Biodostępność magnezu w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych

Źródło: badania własne - publikacja 4

Biodostępność magnezu z produktów z mleka owczego jest słabo zbadana. W badaniach własnych biodostępność magnezu w lodach kontrolnych z mleka owczego wahała się od 51,32% w lodach CLP fermentowanych przez *L. paracasei*, do 55,64% w lodach fermentowanych przez *L. casei* (CLC) (wykres 32).

Analiza statystyczna wyników badań jednoznacznie wskazuje, że szczep bakterii prowadzący fermentację mieszanek lodowych istotnie kształtował biodostępność magnezu ( $p = 0,0001$ ).

W użytym do produkcji lodów mleku owczym oznaczono 146,22 mg 100 g<sup>-1</sup> potasu. Zawartość potasu w lodach bez dodatku błonników wynosiła od 124,78 mg 100 g<sup>-1</sup> w lodach CLC fermentowanych przez *L. casei*, do 125,55 mg 100 g<sup>-1</sup> w lodach CBB12 z *B. animalis*.

W lodach kontrolnych (CLC, CLA, CBB12, CLP, CLR) biodostępność potasu wynosiła około 60%. Ponadto przeprowadzone obliczenia wskazują, że na biodostępność potasu nie wpływał istotnie ( $p = 0,6731$ ) szczep bakterii zastosowany do produkcji lodów.

Przeprowadzona szczegółowa analiza biodostępności wapnia, fosforu, magnezu i potasu wskazuje, że zastosowane szczepy probiotyczne w różnym stopniu wpływały na biodostępność tych makroelementów. Potwierdzono, że szczepy probiotyczne wykorzystane w produkcji lodów istotnie wpłynęły na biodostępność wapnia i magnezu, natomiast nie miały wpływu na biodostępność fosforu i potasu. Dlatego też hipotezę **H4** należy odrzucić.

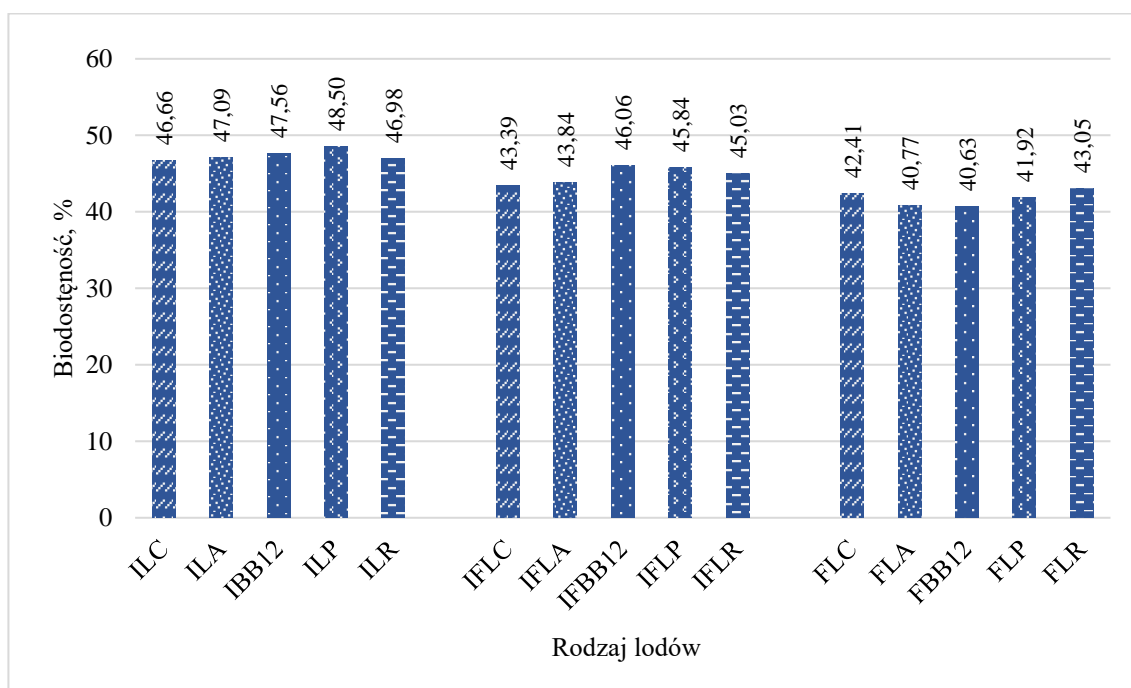
#### **4.6 Wpływ rodzaju zastosowanego błonnika na biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego**

Błonnik pokarmowy pochodzi z różnych surowców roślinnych i różni się znacznie pod względem składu chemicznego, proporcji błonnika nierozpuszczalnego i rozpuszczalnego oraz właściwości fizykochemicznych, wykazując w rezultacie różne efekty fizjologiczne (Figuerola i in. 2005). Błonnik pokarmowy składa się z długiego łańcucha cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$ . Ponieważ rozpad wiązań  $\beta$  nie zachodzi w ludzkim organizmie z powodu braku enzymów rozkładających te wiązania, błonnik pokarmowy nie jest trawiony i wchłaniany. Podczas fermentacji błonnika pokarmowego w jelitach powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwas masłowy (maślan), octan, propionian. Odgrywają one ważną rolę w poprawie wchłaniania związków mineralnych. Według Bosscher i in. (2006) włączenie inuliny i fruktooligosacharydów do diety człowieka zwiększa wchłanianie wapnia i poprawia zawartość związków mineralnych w kościach. Błonnik obniża wartość pH w jelitach, zwiększając rozpuszczalność związków mineralnych, a tym samym ułatwiają wchłanianie wapnia i magnezu w jelitach (Younes i in. 2001, Krupa-Kozak i in. 2017). Według dotychczasowych doniesień naukowych, niektóre niestrawne polisacharydy, takie jak inulina i oligofruktoza, znacznie zwiększają biodostępność związków mineralnych (Coudray i in. 2005, Vitali i in. 2008, Igual i in. 2023). Badania przeprowadzone na szczurach (Levrat i in. 1991, Ohta i in. 1994) wykazały, że zwiększone wchłanianie związków mineralnych po spożyciu inuliny lub oligofruktozy jest najprawdopodobniej spowodowane obniżeniem pH treści jelita krętego, ślepego i okrężnicy, oraz zwiększonym stężeniem lotnych kwasów tłuszczowych i kwasów żółciowych w treści jelita ślepego. Natomiast obecność fitynianów w błonniku negatywnie wpływa na wchłanianie makroskładników przez organizm. W badanych lodach z mleka owczego obecność kwasu mlekowego neutralizuje fityniany i może wpływać na wchłanianie makroelementów.

Z tego względu postanowiono zweryfikować hipotezę **H5**: zastosowanie dodatku błonników kształtuje biodostępność makroelementów z lodów z mleka owczego.

Dodatek inuliny nie zwiększał znacząco zawartości wapnia i fosforu w lodach. Natomiast błonnik jabłkowy zawierał 15,96 mg 100 g<sup>-1</sup> wapnia i 51,80 mg 100 g<sup>-1</sup> fosforu, co powodowało proporcjonalny wzrost wapnia i fosforu w lodach FLC (z *L. casei*), FLA (z *L. acidophilus*), FBB12 (z *B. animalis*), FLP (z *L. paracasei*) i FLR (z *L. rhamnosus*). Dodanie 4% inuliny zmniejszyło biodostępność wapnia o około 3–5%, a dodatek 2,5% inuliny z 1,5% błonnika jabłkowego zmniejszył biodostępność wapnia o 4–8%, w porównaniu do lodów kontrolnych. Dodatek 4% błonnika jabłkowego znacząco obniżył biodostępność wapnia z lodów owczych, aż o 6–12% (wykres 33). W lodach FLR z błonnikiem i *L. rhamnosus* wykazano znaczne zmniejszenie biodostępności wapnia, o 6,86% w porównaniu do lodów kontrolnych CLR.

Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA potwierdziła, że na biodostępność wapnia z lodów z mleka owczego istotny wpływ miał analizowany czynnik jakim jest rodzaj błonnika ( $p = 0,0000$ ).

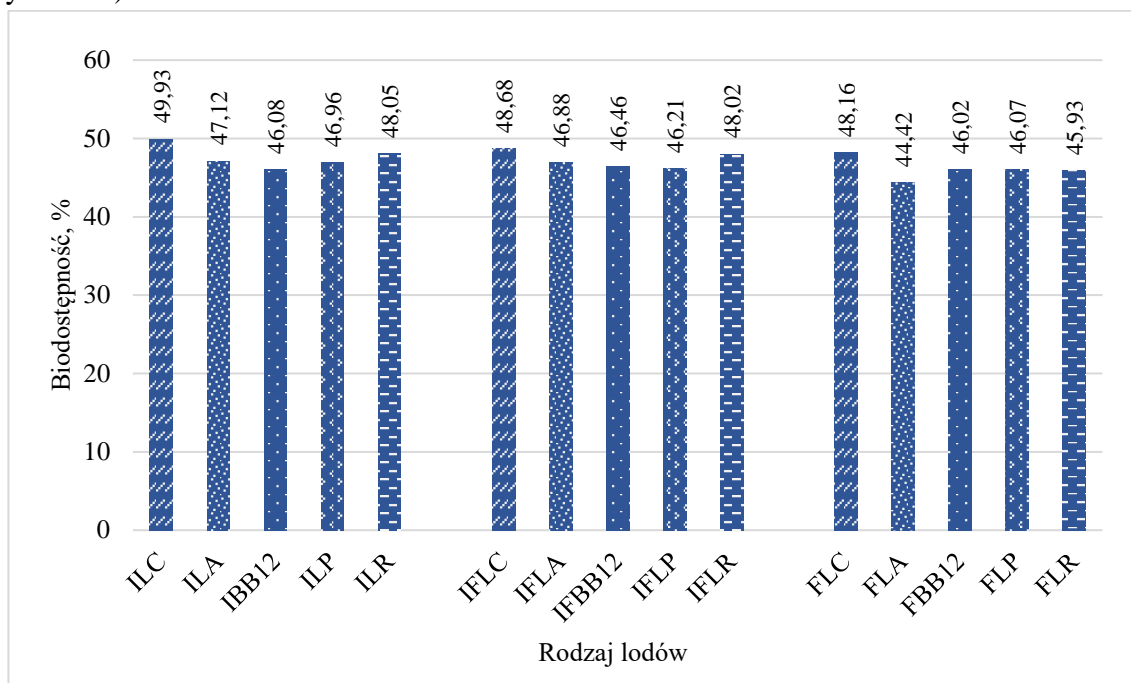


Wykres 33. Biodostępność wapnia w lodach w zależności od zastosowanych błonników  
Źródło: badania własne - publikacja 4

Dodatek 4% błonnika jabłkowego nie wpłynął znacząco na biodostępność fosforu w lodach w FLC, FLA, FBB12, FLP i FLR, w porównaniu z odpowiednikami kontrolnymi. Potwierdza to również przeprowadzona analiza statystyczna wyników badań.

Dodatek błonnika jabłkowego znacząco zwiększył zawartość magnezu w lodach FLC (*L. casei*), FLA (*L. acidophilus*), FBB12 (*B. animalis*), FLP (*L. paracasei*) i FLR (*L. rhamnosus*) o około 0,5–1,4 mg 100 g<sup>-1</sup>, ze względu na obecność magnezu w błonniku jabłkowym. Natomiast dodatek inuliny nie zmienił zawartości magnezu w lodach przed trawieniem w porównaniu z ich kontrolnymi odpowiednikami. Jednak wprowadzenie 4%

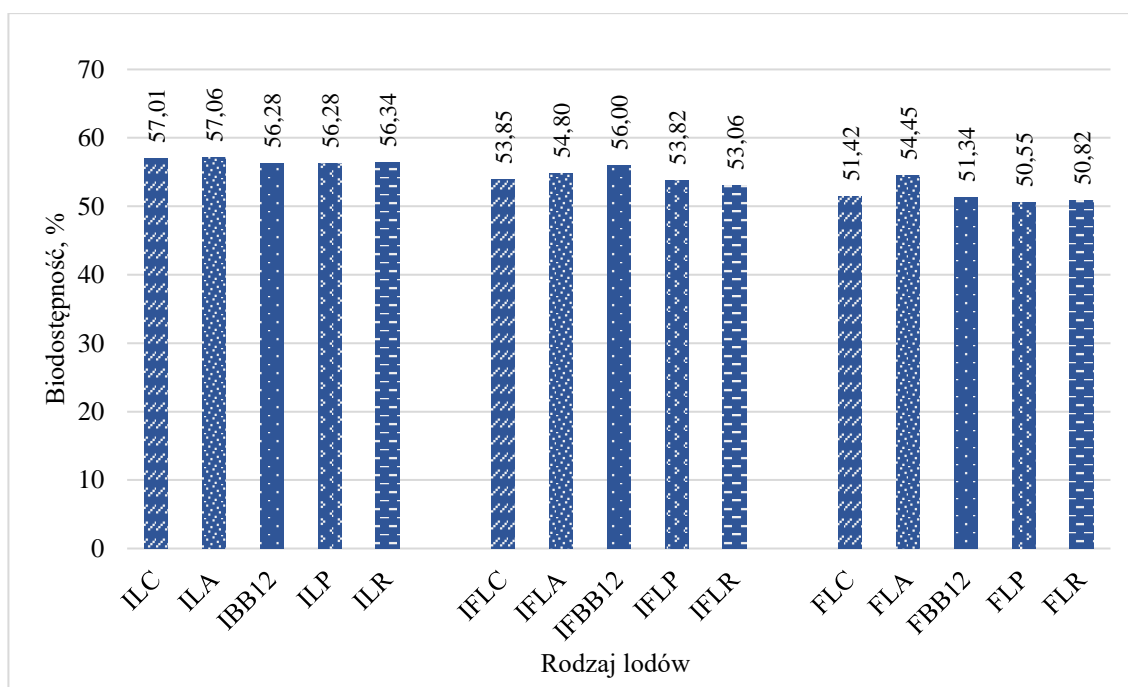
inuliny zmniejszyło biodostępność magnezu o około 5–6% w porównaniu z lodami kontrolnymi. Z kolei dodatek 4% błonnika jabłkowego najbardziej ograniczył biodostępność magnezu w lodach FLA o 8,03% (fermentowanych przez *L. acidophilus*), o 7,48% w FLC (fermentowanych przez *L. casei*) i o 7,25% w FLR (fermentowanych przez *L. rhamnosus*) (wykres 34).



Wykres 34. Biodostępność magnezu w lodach w zależności od zastosowanych błonników  
Źródło: badania własne - publikacja 4

W lodach zawierających 2,5% inuliny oraz 1,5% błonnika jabłkowego, fermentowanych przez *L. casei* (IFLC), odnotowano największe ograniczenie biodostępności magnezu - o 6,96% w porównaniu z próbą kontrolną. Niższą biodostępnością, o 5,69% w porównaniu z próbą kontrolną, charakteryzowały się lody fermentowane przez *B. animalis* (IFBB12). Najmniejsze różnice (o 5,11%) odnotowano w przypadku lodów FLCP, fermentowanych przez *L. paracasei*. W lodach z dodatkiem błonnika FBB12 (fermentowanych przez *B. animalis*) i lodach FLP (fermentowanych przez *L. paracasei*) wykazano o 5–6% niższą biodostępność magnezu w porównaniu z grupą kontrolną. Oznacza to, że dodatek błonnika istotnie obniżał biodostępność magnezu ( $p = 0,0011$ ).

W badaniach własnych biodostępność potasu była wyższa w lodach kontrolnych niż w lodach z błonnikiem (**publikacja 4**, wykres 35). W porównaniu z lodami kontrolnymi, w lodach z inuliną była niższa o 3–4%, a w lodach z błonnikiem jabłkowym o 6–9%. Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) pokazuje, że na biodostępność potasu w lodach z mleka owczego istotny wpływ ma dodatek błonnika ( $p = 0,0000$ ).



Wykres 35. Biodostępność potasu w lodach w zależności od zastosowanych błonników  
 Źródło: badania własne - publikacja 4

Przeprowadzona weryfikacja **hipotezy H5** daje podstawy do jej odrzucenia, ponieważ dodane błonniki nie kształtują biodostępności fosforu.

#### 4.7 Wpływ zastosowanego szczepu probiotycznego na przeżywalność bakterii w układzie pokarmowym

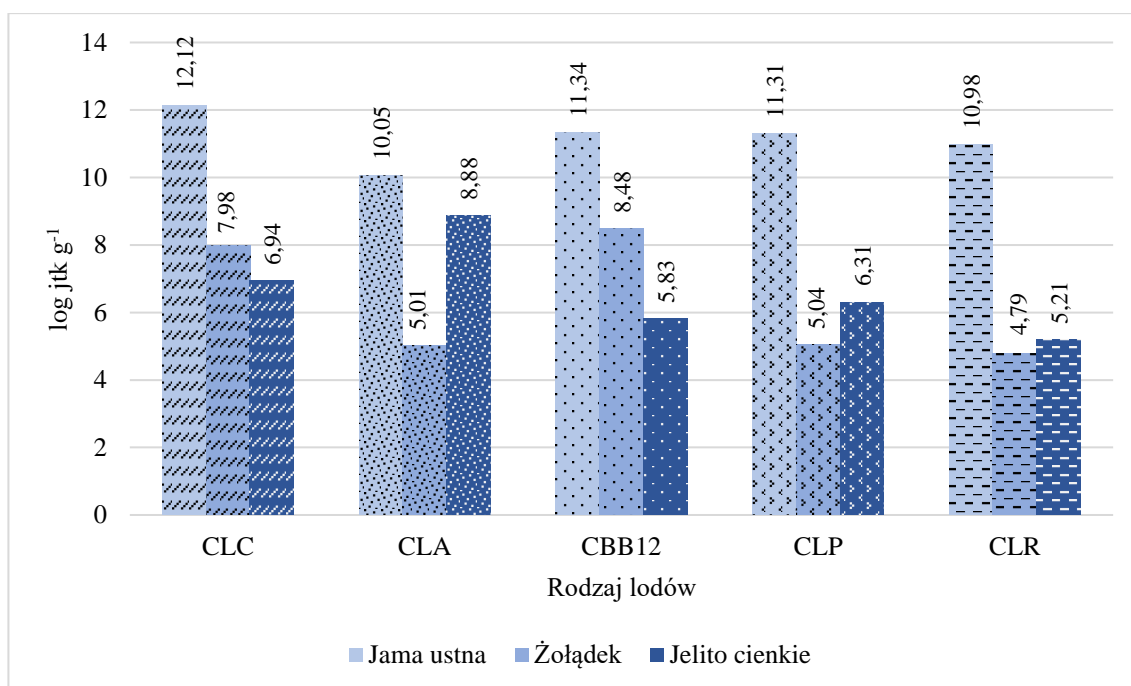
Adhezja bakterii probiotycznych do powierzchni jelit człowieka stanowi istotny element procesu kolonizacji, gdyż sprzyja usuwaniu patogenów (Paliwoda i Nowak 2017, Umu i in. 2017). Probiotyki muszą być obecne w produkcie spożywczym w wystarczającej ilości przed upływem terminu przydatności do spożycia, przechodzić przez przewód pokarmowy, być odporne na środowisko kwaśne i zasadowe oraz kolonizować jelita w wystarczającej liczbie, aby wywołać wymierny korzystny efekt (FAO/WHO 2001, Gibson i in. 2017). Dlatego też jakość szczepu probiotycznego w dużym stopniu zależy od procesów produkcyjnych, w ramach których stosuje się: fermentację, ocenia skład chemiczny środowiska wzrostu, prowadzi się izolację komórek, suszenie rozpyłowe, liofilizację i zachowuje optymalne warunki przechowywania, takie jak temperatura, wilgotność i pH (Grześkowiak i in. 2011, Nivoliez i in. 2012, Auclair i in. 2015).

Optymalne warunki wzrostu bakterii probiotycznych to temperatura 30–40°C i pH 5,5–6,2, ale niektóre mogą wzrastać w temperaturze 2–53°C (König i Berkelmann-Löhnertz 2017) i pH wahającym się w granicach 4,5–7,0. Jednakże warunki hodowli mogą wpływać na parametry kinetyki wzrostu, takie jak: właściwa szybkość wzrostu i czas trwania fazy zastoju, czyli czasu, w którym bakterie przystosowują się do nowego podłoża i nie rozmnażają się (Śliżewska i Chlebicz-Wójcik 2020). W literaturze przedmiotu można znaleźć informacje o parametrach kinetycznych zakwaszania mleka przez różne szczepy bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepy probiotyczne, gdzie maksymalna szybkość zakwaszenia ( $V_{max}$ )

wahała się od  $15,9$  do  $18,9 \times 10^{-3}$  pH min<sup>-1</sup> dla mleka fermentowanego przez *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* i *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 z kokulturami *S. thermophilus*. Po dodaniu do mleka 4% inuliny nastąpiło wydłużenie czasu maksymalnego tempa zakwaszenia  $V_{max}$ , które wahało się od  $17,0$  do  $19,0 \times 10^{-3}$  pH min<sup>-1</sup> (Oliveira i in. 2009).

Najczęściej wykorzystywanymi bakteriami probiotycznymi w produkcji żywności, w tym lodów, są *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Lee i Salminen 2009, Muninathan i in. 2021). Probiotyczne szczepy tych bakterii są potencjalnie odporne na niskie temperatury podczas zamrażania, wyjątkowo niskie pH w żołądku (pH=1–4), działanie enzymów trawiennych (sole żółciowe i pankreatyna) w jelicie oraz toksyczne metabolity powstające podczas trawienia (Lima i in. 2009, Ranadhera i in. 2012, Sangami i Sri 2017).

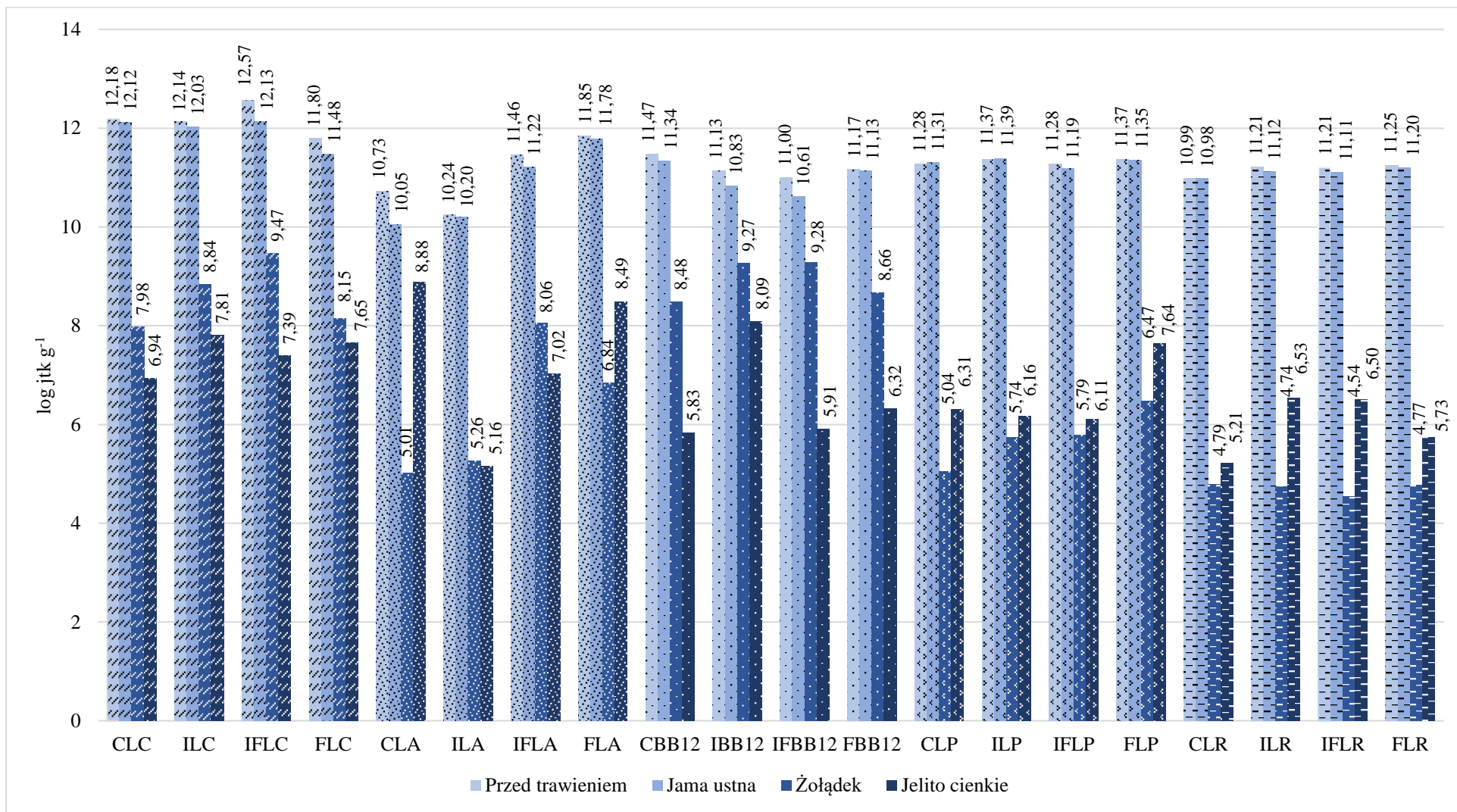
Według badań przeprowadzonych przez Goktas (2023), warunki panujące w jamie ustnej nie wpłynęły istotnie na liczbę komórek *L. rhamnosus* (96,95%, tj. 8,17 jtk g<sup>-1</sup>). Niemniej jednak, odsetek przeżywalności uległ znacznemu zmniejszeniu, szczególnie w środowisku żołądka (84,99%, tj. 6,94 log jtk g<sup>-1</sup>) i jelit (67,91%, 4,71 log jtk g<sup>-1</sup>). W warunkach jelitowych obserwowano istotną redukcję populacji i zmniejszenie przeżywalności *L. rhamnosus* do 67,91% dla grupy kontrolnej. Haghani i in. (2021) wykazali, że przeżywalność *B. lactis* w warunkach symulujących układ żołądkowo-jelitowy istotnie zmniejszyła się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania lodów. Jednak w lodach zawierających dodatek 6% i 9% skórki derenia oraz przechowywanych przez 120 dni w temperaturze -18°C, liczba tych bakterii przekraczała 6 log jtk g<sup>-1</sup>. Z kolei Balthazar i in. (2018) wykazali redukcję bakterii *L. casei* o około 2 log jtk g<sup>-1</sup> w lodach z inuliną, po przeprowadzeniu symulowanego trawienia żołądkowo-jelitowego w lodach synbiotycznych z mleka owczego, po 150 dniach przechowywania.



Wykres 36. Liczba żywych komórek bakterii na etapie jamy ustnej, żołądka i jelita cienkiego w czasie trawienia *in vitro*

Źródło: badania własne - publikacja 3

W etapie symulującym środowisko jamy ustnej największa redukcja populacji (o 0,68 log jtk g<sup>-1</sup>) wystąpiła w lodach CLA (wykres 36). Natomiast warunki panujące w żołądku najbardziej zredukowały komórki *L. paracasei* w lodach CLP (o 6,24 log jtk g<sup>-1</sup>), a najmniej szczep *Bifidobacterium* w próbie CBB12 (o 2,99 log jtk g<sup>-1</sup>) (wykres 37).



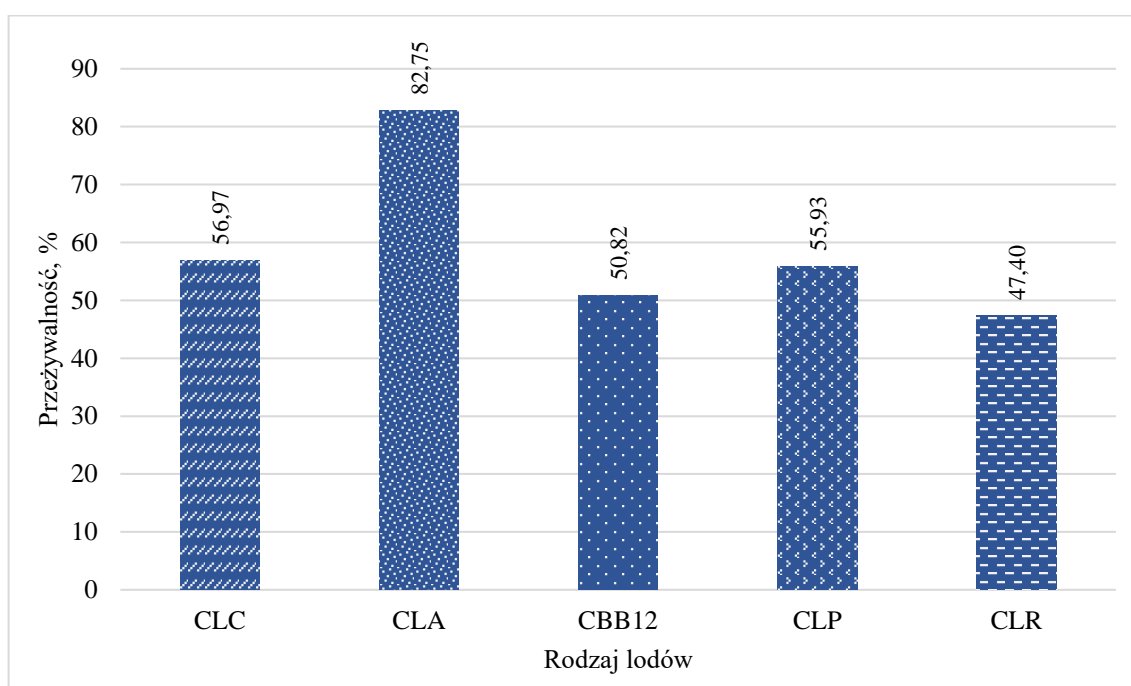
Wykres 37. Liczba komórek bakterii probiotycznych na każdym etapie symulowanego trawienia *in vitro*

Źródło: badania własne - publikacja 3

Największą redukcję liczby żywych komórek bakterii probiotycznych w etapie symulującym środowisko jelit oznaczono w próbie CLR (o 5,78 log jtk g<sup>-1</sup>), natomiast najmniejszą w próbie fermentowanej przez *L. acidophilus* CLA (o 1,85 log jtk g<sup>-1</sup>).

W związku z tym postanowiono zweryfikować hipotezę **H6**: przeżywalność bakterii w układzie pokarmowym zależy od zastosowanego szczepu probiotycznego.

Według badań Aboufazli i Baba (2015) i Mishra i Prasad (2005) przeżywalność szczepów probiotycznych stopniowo zredukowała się podczas pasażu *in vitro* przez żołądek i jelito cienkie. W badaniach własnych (**publikacja 3**) współczynnik przeżywalności i tolerancji na tranzyt szczepów oceniano za pomocą symulowanego trawienia *in vitro*. Porównując liczbę żywych komórek przed trawieniem z liczbą żywych komórek w jelitach, najwyższy wskaźnik przeżywalności (82,75%) stwierdzono dla szczepu *L. acidophilus* w lodach kontrolnych CLA (wykres 38).



Wykres 38. Przeżywalność żywych komórek bakterii w lodach kontrolnych po symulowanym trawieniu *in vitro*

Źródło: badania własne - publikacja 3

Można zatem przypuszczać, że białka serwatkowe zawarte w mleku owczym przyczyniły się do lepszej tolerancji *L. acidophilus* na symulowane warunki trawienia. Według Furtado i in. (2022), białka serwatkowe wykazują korzystny wpływ na warunki fizykochemiczne żołądka. Badanie to wykazało, że mimo wystąpienia agregacji kuleczek tłuszczu oraz częściowej hydrolizy białek, białka serwatkowe pozostają odporne na panujące w żołądku warunki. Istotnym aspektem jest fakt, iż wszystkie badane białka uległy intensywnej hydrolizie i zostały wchłonięte w jelitach. Natywne białka serwatkowe są generalnie słabo trawione w żołądku. U dorosłych  $\beta$ -laktoglobulina nie jest podatna na hydrolizę indukowaną pepsyną, jeśli białko pozostaje w stanie natywnym, lecz dopiero po denaturacji (Peram i in. 2013). Natomiast  $\alpha$ -laktoalbumina może ulegać hydrolizie indukowanej pepsyną w trakcie długotrwałego

trawienia w żołądku (Miranda i in., 1989). Dodatkowo, białka serwatkowe nie ulegają koagulacji w żołądku (Wang i in., 2018), dzięki czemu są stosunkowo szybko z niego uwalniane.

Z kolei frakcja kazeinowa w mleku, występująca głównie w postaci tzw. miceli kazeinowych, jest wysoce podatna na koagulację w żołądku (Ye i in. 2019, Mulet-Cabero Mackie i in. 2020, Huppertz i Chia 2021). Micele kazeinowe to kuliste cząstki, w których znajdują się tysiące cząsteczek kazeiny oraz około 6% fosforanu wapnia w przeliczeniu na suchą masę (Dalglish i Corredig 2012, Huppertz i in. 2017). Dzięki temu micele kazeinowe pełnią rolę nośnika wapnia i fosforanów, umożliwiając przekazywanie tych składników noworodkom w formie stabilnej i biodostępnej, przekraczającej granice rozpuszczalności (Holt i in. 2013).

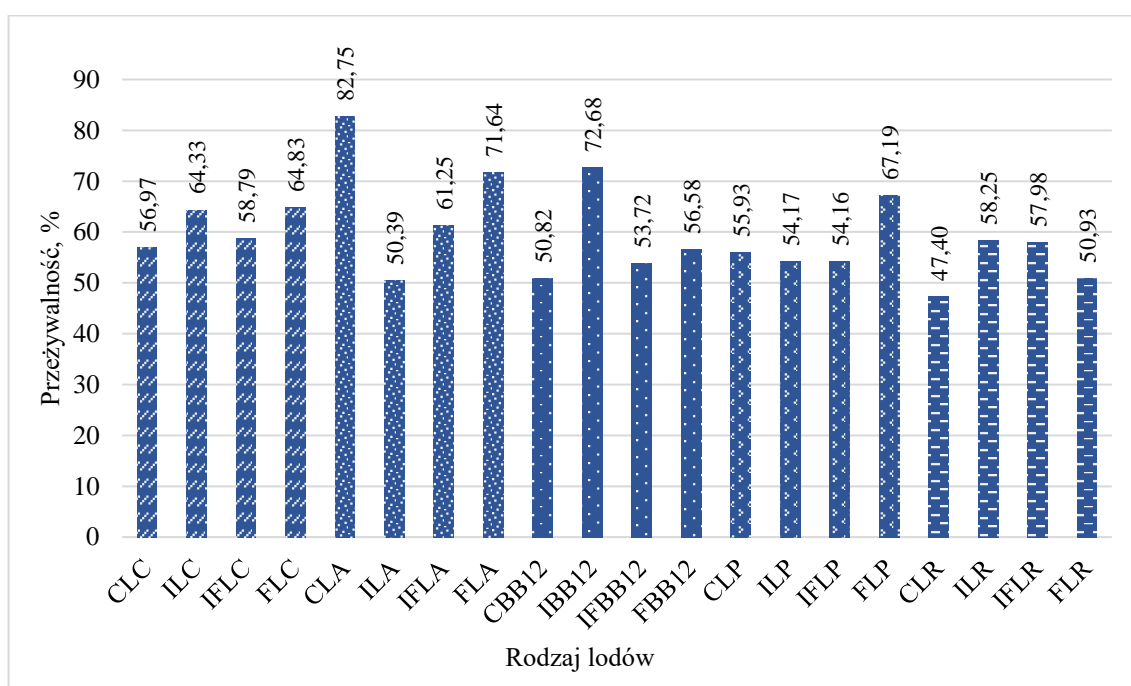
W badaniach własnych najmniejszą przeżywalność (47,40%) wykazano dla szczepu *L. rhamnosus* w lodach CLR. Przeżywalność szczepów w lodach CLC, CBB12 i CLP wynosiła odpowiednio: 56,97%, 50,82% i 55,93%. Przedstawiona weryfikacja postawionej hipotezy **H6** pozwala na jej przyjęcie, ponieważ wykazano różną przeżywalność szczepów probiotycznych w warunkach trawienia *in vitro*.

#### **4.8 Wpływ rodzaju zastosowanych błonników na przeżywalność bakterii probiotycznych w układzie pokarmowym**

Prebiotyki to substraty, które przechodzą przez przełyk i żołądek, docierając do jelit w niestrawionej formie i stanowiąc obfite źródło energii dla mikroflory jelitowej (Gibson i in. 2017, Qi i in. 2018, Zhang i in. 2021). Wyniki badań wskazują, że spożywanie błonnika pokarmowego, zwłaszcza inuliny i fruktooligosacharydów (FOS), może stymulować wzrost i zwiększać aktywność mikroflory jelitowej, prowadząc do poprawy zdrowia człowieka i kolonizacji jelit przez bakterie probiotyczne (Pabari i in. 2020). Potwierdzono również, że związki te kształtują wchłanianie minerałów i regulują metabolizm lipidów, a także zmniejszają ryzyko wystąpienia chorób, w tym chorób układu krążenia, cukrzycy, zaparc i raka jelita grubego (Rossi i in. 2005, Cai i in. 2020, Ahmad i in. 2021). Co więcej, udowodniono, że te naturalne polisacharydy pozytywnie wpływają na proces wytwarzania lodów, poprawiając żelowanie i kontrolując krystalizację. Do probiotyków zalicza się błonnik jabłkowy, który składa się z pektyny i nierozpuszczalnej celulozy (Tarifa i in. 2021). W błonniku jabłkowym rozpuszczalna pektyna stanowi 40% zawartości, a około połowa to nierozpuszczalna celuloza (Aprikian i in. 2001). Pektyna i celuloza wykazują mniejszą wrażliwość na czynniki chemiczne i większą odporność na środowisko żołądka niż alginian. Stwierdzono, że pektyna i celuloza są odpowiednimi materiałami mukoadhezyjnymi (Munarin i in. 2012), co może wydłużyć czas trawienia. Ponadto występują jako agregaty makrocząsteczek w środowisku kwaśnym i są odporne na proteazy i amylazy, które są aktywne w górnym odcinku przewodu pokarmowego, co może wyjaśniać lepszą przeżywalność niektórych szczepów bakterii (Shinohara i in. 2010). Wykorzystanie inuliny i błonnika jabłkowego w produkcji lodów może mieć wpływ na przeżywalność szczepów probiotycznych w przewodzie pokarmowym człowieka. Dlatego też kolejnym z podjętych działań była weryfikacja hipotezy **H7**: przeżywalność bakterii probiotycznych w układzie pokarmowym zależy od rodzaju zastosowanych błonników.

W tych badaniach dodatek inuliny zwiększył przeżywalność *L. rhamnosus* o 10,8%, w porównaniu z przeżywalnością szczepu w lodach kontrolnych CLR w warunkach trawienia *in vitro* (wykres 39). Jeszcze większą przeżywalność (o ok. 22%) stwierdzono dla *B. animalis* po dodaniu 4% inuliny, w porównaniu z przeżywalnością oznaczoną w lodach kontrolnych. Natomiast dodatek samego błonnika jabłkowego poprawił przeżywalność *B. animalis* w warunkach trawienia *in vitro* jedynie o około 6% w porównaniu z grupą kontrolną. Podobnie na przeżywalność *L. casei*, *L. paracasei* i *L. acidophilus* duży wpływ miał także 4% dodatek błonnika jabłkowego, ponieważ zwiększył on przeżywalność w warunkach przejścia przez przewód pokarmowy o 5,7–11,2% (FLC, FLP, FLA) w porównaniu z przeżywalnością szczepów w kontrolnych odpowiednikach.

W związku z tym nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy **H7** i dlatego musi ona zostać przyjęta.



Wykres 39. Przeżywalność bakterii probiotycznych po symulowanym trawieniu *in vitro*

Źródło: badania własne - publikacja 3

W badaniu Tarifa i in. (2021) w mikrokapsułkowanych i niekapsułkowanych żelach pektynowych i pektynowo-inulinowych z bakteriami *L. casei* i *L. rhamnosus*, przeżywalność obniżyła się z 60% do 90% w żelach bez inuliny. Po przejściu przez przewód pokarmowy nastąpiła 62,2% redukcja populacji *Lactobacillus*. Również Hu i in. (2021) wykazali 62,2% redukcję komórek *Lactobacillus* w mikrokapsułkach z alginianem sodu i pektyną.

## WNIOSKI

1. Zastąpienie części dodatku inuliny dodatkiem 1,5% błonnika jabłkowego obniżyło wartość pH mieszanek lodowych jeszcze przed fermentacją, w porównaniu z próbami z 4% dodatkiem inuliny. Również po fermentacji mieszanki lodowe z błonnikiem jabłkowym charakteryzowały się istotnie niższą wartością pH, pociemnieniem barwy, zwiększonym udziałem barwy czerwonej niż mieszanki sporządzone wyłącznie z inuliną.
2. Przeprowadzone badania wskazują, że istotnym problemem jest dobór bakterii probiotycznych do fermentacji mieszanek z mleka owczego, gdyż częściowe zastąpienie inuliny błonnikiem jabłkowym zmienia warunki fermentacji. W mieszance z dodatkiem 1,5% błonnika jabłkowego stwierdzono mniejszą liczbę komórek *Lactocaseibacillus casei* po fermentacji. Z kolei dodatek ten przyczynił się do istotnego wzrostu liczby komórek *Lactobacillus acidophilus* w mieszance po fermentacji. Natomiast dodatek 1,5% błonnika jabłkowego nie wpłynął istotnie na wzrost *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* oraz *Lactocaseibacillus paracasei* i *Lactocaseibacillus rhamnosus*.
3. Proces zamrażania zmniejszył populację żywych komórek bakterii probiotycznych we wszystkich grupach lodów. Jedynie w lodach z *Lactocaseibacillus rhamnosus* nie stwierdzono istotnej redukcji populacji bakterii bezpośrednio po zamrożeniu.
4. Szczep probiotyczny użyty do fermentacji kształtował w lodach: wartość pH, zawartość kwasu mlekowego, składowe barwy, puszystość oraz cechy organoleptyczne.
5. Nie wykazano istotnych różnic w zawartości kwasu mlekowego w lodach z inuliną oraz w lodach z błonnikiem jabłkowym, w zależności od czasu przechowywania. Wydłużenie czasu przechowywania z 7 do 21 dni przyczyniło się do zwiększenia jasności barwy we wszystkich grupach lodów. Dodatek błonnika zwiększył napowietrzenie lodów w porównaniu do ich odpowiedników z inuliną. W każdej grupie badawczej wydłużenie czasu przechowywania skutkowało istotnym skróceniem czasu spłynięcia pierwszej kropli. Również całkowity czas topnienia skracał się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania.
6. Po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego w temperaturze  $-22^{\circ}\text{C}$  liczba żywych komórek bakterii probiotycznych we wszystkich grupach lodów obniżyła się w porównaniu z liczbą komórek po zamrożeniu. Dalsze wydłużenie czasu przechowywania lodów z 7 do 21 dni nie wpłynęło istotnie na liczbę komórek probiotyku we wszystkich grupach lodów. Najkorzystniejszą przeżywalnością w czasie przechowywania charakteryzował się szczep *Lactocaseibacillus paracasei*, co predysponuje go do wykorzystania w produkcji probiotycznych lodów z mleka owczego.
7. Dodatek błonnika jabłkowego wpłynął na wygląd lodów z mleka owczego. Lody z mleka owczego z błonnikiem były ciemniejsze, bardziej czerwone i cechowały się mniejszą gładkością oraz większą piaszczystością niż lody zawierające wyłącznie inulinę. Wyniki oceny cech organoleptycznych wskazują brak istotnego wpływu czasu przechowywania na te parametry.
8. W badanych lodach z mleka owczego wykazano bardzo korzystną proporcję zawartości wapnia do fosforu, ponieważ wynosiła od 1,28:1 do 1,32:1 (zalecany korzystny stosunek wynosi 1:1 lub 1,5:1) co wskazuje, że lody te mogą być bardzo dobrym źródłem wapnia.
9. Największą biodostępność wapnia, w zależności od rodzaju zastosowanych szczepów bakterii probiotycznych, wykazano dla lodów fermentowanych przez *Lactocaseibacillus*

*paracasei*. Największą biodostępnością fosforu charakteryzowały się lody fermentowane przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. Z kolei biodostępność magnezu była najwyższa w lodach fermentowanych przez *Lacticaseibacillus casei*. Natomiast nie wykazano wpływu rodzaju szczepu bakterii zastosowanego do produkcji lodów na biodostępność potasu.

10. Biodostępność wapnia i magnezu z lodów z mleka owczego ograniczał dodatek błonnika. Obniżenie biodostępności tych makroelementów zależało od rodzaju błonnika, a najbardziej ograniczał biodostępność dodatek 4% błonnika jabłkowego, o 6–12%. Dodanie 4% inuliny zmniejszyło biodostępność wapnia o około 3–5%, a dodatek 2,5% inuliny z 1,5% błonnika jabłkowego zmniejszył biodostępność wapnia o 4–8%. Natomiast dodatek 4% błonnika jabłkowego nie wpłynął znacząco na biodostępność fosforu w lodach. Z kolei biodostępność potasu była wyższa w lodach bez dodatków niż w lodach z błonikiem.
11. Przeprowadzone badania dotyczące wpływu zastosowanego szczepu na przeżywalność probiotyków w warunkach trawienia *in vitro*, w porównaniu do liczby komórek przed trawieniem wskazują, że w lodach bez dodatku błonnika najwyższy wskaźnik przeżywalności uzyskał *Lactobacillus acidophilus* (>80%). Najmniejszą przeżywalność (<50%) wykazano dla szczepu *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Przeżywalność szczepów *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* przekraczała 50%, w porównaniu do liczby komórek bakterii w lodach przed trawieniem.
12. Zastosowanie inuliny i błonnika jabłkowego w produkcji lodów kształtowało przeżywalność szczepów probiotycznych w symulowanym przewodzie pokarmowym. Dodatek 4% inuliny zwiększył przeżywalność *Lacticaseibacillus rhamnosus* o ok. 10%, a szczepu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* o ok. 22% w porównaniu z przeżywalnością w lodach bez dodatku. Natomiast zastosowanie samego błonnika jabłkowego poprawiło przeżywalność *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* w warunkach trawienia *in vitro* jedynie o około 6%. W przypadku *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* i *Lactobacillus acidophilus* dodatek 4% błonnika jabłkowego zwiększył przeżywalność w warunkach przejścia przez przewód pokarmowy o 5,7–11,2%.
13. Wskazanie jednego szczepu, którego zastosowanie w produkcji lodów będzie najkorzystniejsze ze względów zarówno technologicznych jak i biodostępności makroelementów oraz przeżywalności w układzie pokarmowym jest dużym wyzwaniem. Biorąc pod uwagę proces technologiczny (fermentację, zamrażanie, przechowywanie zamrażalnicze) najbardziej preferowanym byłby szczep *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Natomiast przeprowadzone badania symulowanego trawienia wskazują szczep *Lactobacillus acidophilus*, ze względu na bardzo dobrą przeżywalność w układzie pokarmowym zapewniającą efekt terapeutyczny.
14. Otrzymane rezultaty badań mogą być wykorzystane do projektowania nowych funkcjonalnych produktów mlecznych, które łączą korzyści probiotyczne ze zwiększoną zawartością prebiotyków. Synbiotyczne lody z mleka owczego mogą stanowić dobre źródło uzupełnienia niedoborów makroelementów w codziennej diecie człowieka.

## SPIS LITERATURY

1. Rashid A.E.A., Hassan Z.M.R. 2005. Potential utilization and healthy effects of doum palm fruits in ice cream and sesame butter (tehena). *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 2, 29–39.
2. Aboufazli F., Baba A.S. 2015. Effect of Vegetable Milk on Survival of Probiotics in Fermented Ice Cream under Gastrointestinal Conditions. *Food Science and Technology Research*, 21, 391–397.
3. Acevedo-Martinez E., Gutiérrez-Cortés C., García-Mahecha M., Díaz-Moreno C. 2018. Evaluation of viability of probiotic bacteria in mango (*Mangifera indica* L. Cv. “Tommy Atkins”) beverage. *DYNA*, 85, 84–92.
4. Acu M., Kinik O., Yerlikaya O. 2021. Probiotic viability, viscosity, hardness properties and sensorial quality of synbiotic ice creams produced from goat’s milk. *Food Science and Technology*, 41(1), 167-173.
5. Adouni K., Júlio A., Santos-Buelga C., González-Paramás A.M., Filipe P., Rijo P., Fonte P. 2022. Roots and rhizomes of wild Asparagus: Nutritional composition, bioactivity and nanoencapsulation of the most potent extract. *Food Bioscience*, 45, 101334.
6. Afzaal M., Saeed F., Arshad M.U., Nadeem M.T., Saeed M., Tufail T. 2019. The Effect of Encapsulation on The Stability of Probiotic Bacteria in Ice Cream and Simulated Gastrointestinal Conditions. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 11(4), 1348–1354.
7. Ah-Leung S., Bernard H., Bidat E., Paty E., Rancé F., Scheinmann P., Wal J.M. 2006. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow’s milk. *Allergy*, 61(11), 1358–1365.
8. Ahmad A.M.R., Ahmed W., Iqbal S., Javed M., Rashid S., Haq U.L. 2021. Prebiotics and iron bioavailability? Unveiling the hidden association—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 584–590.
9. Ahmad I., Khaliq A., Junaid M., Shahid M.Q., Imran M., Rashid A.A. 2020. Effect of polyphenol from apple peel extract on the survival of probiotics in yoghurt ice cream. *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 2580–2588.
10. Akalin A.S., Erisir D. 2008. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *Journal of Food Science*, 73, 184–188.
11. Akalın A.S., Karagözlü C., Ünal G. 2008. Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. *European Food Research and Technology*, 227(3), 889-895.
12. Akalın A.S., Kesenkas H., Dinkci N., Unal G., Ozer E., Kımık O. 2018. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. *Journal of Dairy Science*, 101, 37–46.
13. Akbari M., Eskandari M.H., Niakosari M., Bedeltavana M. 2016. The effect of inulin on the physicochemical properties and sensory attributes of low-fat ice cream. *International Dairy Journal*, 57, 52–55.
14. Akca S., Akpinar A. 2021. The Effects of Grape, pomegranate, Sesame Seed Powder and Their Oils on Probiotic Ice Cream: Total phenolic contents, antioxidant activity and probiotic viability. *Food Bioscience*, 42, 101203.
15. Akin M.B., Akin M.S., Kirmaci Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chemistry*, 104, 93–99.
16. Alvarez V.B., Wolters C.L., Vodovotz Y., Ji T. 2005. Physical Properties of Ice Cream Containing Milk Protein Concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 862-871.

17. Aprikian O., Levrat-Verny M.A., Besson C., Busserolles J., Rémésy C., Demigné C. 2001. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chemistry*, 75, 445–452.
18. Arbuckle W.S. 1986. Minerals in ice cream. Arbuckle, W.S. (red.), *Ice Cream*, 4th ed., 13. Springer: New York, NY, USA.
19. Ariza M.T., Reboredo-Rodríguez P., Cervantes L., Soria C., Martínez-Ferri E., González-Barreiro C., Cancho-Grande B., Battino M., Simal-Gándara J. 2018. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chemistry*, 15(248), 155-165.
20. Arslaner A., Salik M.A. 2022. Probiotic ice cream with *Malus floribunda* fruit sauce: Quality properties, mineral, and volatile composition. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46, 5, e16566.
21. Ashokbhai J.K., Basaiawmoit B., Das S., Sakure A., Maurya R., Bishnoi M., Kondepudi K.K., Padhi S., Rai A.K., Liu Z., Hatia S. 2022. Antioxidative, antimicrobial and anti-inflammatory activities and release of ultra-filtered antioxidative and antimicrobial peptides during fermentation of sheep milk: *In-vitro*, *in-silico* and molecular interaction studies. *Food Bioscience*, 47, 101666.
22. Auclair J., Frappier M., Millette M. 2015. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+): Characterization, Manufacture, Mechanisms of Action, and Quality Control of a Specific Probiotic Combination for Primary Prevention of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 60, 135–143.
23. Ayar A., Siçramaz H., Öztürk S., Öztürk Y.S. 2017. Probiotic properties of ice creams produced with dietary fibres from by-products of the food industry. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 174-182.
24. 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.
25. Bali V., Panesar P.S., Bera M.B., Panesar R.J. 2015. Fructo-oligosaccharides: Production, purification and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1475–1490.
26. Balthazar C.F., Pimentel T.C., Ferrão L.L., Almada C.N., Santillo A., Albenzio M., Mollakhalili N., Mortazavian A.M., Nascimento J.S., Silva M.C., Freitas M.Q., Sant'Ana A.S., Granato D., Cruz A.G. 2017A. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 247-262.
27. Balthazar C.F., Silva H.L.A., Vieira A.H., Neto R.P.C., Cappato L.P., Coimbra P.T., Raices I.B., Silva R.S.L., Cruz A.G. 2017B. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Research International*, 91, 38–46.
28. Balthazar C. F., Silva H.L.A., Esmerino E.A., Rocha R.S., Moraes J., Carmo M.A.V., Azevedo L., Camps I., Abud K.D.Y., Sant'Anna C., Franco R.M., Freitas M.Q., Silva M.C., Raices R.S.L., Escher G.B., Granato D., Ranadheera S.C., Nazarro F., Cruz, A.G. 2018. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chemistry*, 246, 464–472.
29. Baye K., Guyot J.P., Mouquet-Rivier C. 2017. The unresolved role of dietary fibers on mineral absorption. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57, 949–957.
30. Bielik V., Kolisek M. 2021. Bioaccessibility and Bioavailability of Minerals in Relation to a Healthy Gut Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 6803.
31. Bijl E., van Valenberg H.J.F., Huppertz T., van Hooijdonk A.C.M. 2013. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. *Journal of Dairy Science*, 96, 5455–5464.

32. Bosscher D., Van Loo J., Franck A. 2006. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *International Dairy Journal*, 16(9), 1092–1097.
33. Bruno-Barcena J.M., Azcarate-Peril M.A. 2015. Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods*, 12, 92-108.
34. Buniowska M., Carbonell-Capella J.M., Frigola A., Esteve M.J. 2017. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. *Food Chemistry*, 221, 1834–1842.
35. Cai Y., Folkerts J., Folkerts G., Maurer M., Braber S. 2020. Microbiota-dependent and -independent effects of dietary fibre on human health. *British Journal of Pharmacology*, 177, 1363–1381.
36. 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.
37. Castro-Bravo N., Wells J.M., Margolles A., Ruas-Madiedo P. 2018. Interactions of Surface Exopolysaccharides From *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Within the Intestinal Environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426.
38. Chia J., Burrow K., Carne A., McConnell M., Samuelsson L., Day L., Young W., Bekhit A. El-Din A. 2017. Minerals in Sheep Milk. In: Ronald Ross Watson, Robert J. Collier, Victor R. Preedy (Eds.), *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*. Academic Press, 345-362.
39. Cichosz G., Czczot H., Giczewska M. 2004. Wartość biologiczna mleka – ocena poprzez pomiar całkowitego statusu antyoksydacyjnego. *Przegląd Mleczarski*, 2, 4-8.
40. Clark C. 2012. *The Science of Ice Cream*. 1st ed., Royal Society of Chemistry publishing, London.
41. Collins F.L., Rios-Arce N.D., Schepper J.D., Parameswaran N., McCabe L.R. 2018. The potential of probiotics as a therapy for osteoporosis. *Microbiology Spectrum*, 5, 4, 1-26.
42. Corvitto A. 2011. *The secrets of ice cream = los secretos del helado ice cream without secrets = El helado sin secretos*, 2 th ed., Sant Cugat del Valles, Vilbo. Spain.
43. Coudray C., Feillet-Coudray C., Tressol J.C., Gueux E., Thien S., Jaffrelo L., Mazur A., Rayssiguier Y. 2005. Stimulatory effect of inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium in rats is modulated by dietary calcium intakes—Short- and long-term balance studies. *European Journal of Nutrition*, 44, 293–302.
44. Crizel T.d.M., de Araujo R.R., Rios A.d.O., Rech R., Flores S.H. 2014. Orange fiber as a novel fat replacer in lemon ice cream. *Food Science of Technology*, 34, 332–340.
45. Cunningham M., Azcarate-Peril M.A., Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D., Holscher H.D, Hunter K., Manurung S., Obis D., Petrova M. I., Steinert R.E., Swanson K.S., Sinderen van D., Jelena Vulevic, Gibson G.R. 2021. Shaping the future of probiotics and prebiotics. *Trends in Microbiology*, 29(8), 667-685.
46. Da Silva P.D.L., De Fátima Bezerra M., Dos 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.
47. Dalen G.V. 2012. A study of bubbles in foods by X-ray microtomography and image analysis. *Microscopy and Analysis* 26(2), S8-S12.
48. De Farias P. D., de Araújo F.F., Neri-Numa I.A., Pastore G.M. 2019. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science and Technology*, 93, 23–35.
49. De Kruif C.G., Huppertz T., Urban V.S., Petukhov A.V. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171–172, 36–52.

50. Deng Z., Li J., Song R., Zhou B., Li B., Liang H. 2021. Carboxymethylpachymaran/alginate gel entrapping of natural pollen capsules for the encapsulation, protection and delivery of probiotics with enhanced viability. *Food Hydrocolloids*, 120, 106855.
51. Dervisoglu M., Yazici F.N. 2006. The effect of citrus fibre on the physical, chemical and sensory properties of ice cream. *Food Science and Technology International*, 12, 159–164.
52. Di Criscio T., Fratianni A., Mignogna R., Cinquanta L., Coppola R., Sorrentino E., Panfili G. 2010. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal Dairy Science*, 93, 4555–4564.
53. Donhowe D.P., Hartel R.W. 1996. Recrystallization of ice during bulk storage of ice cream. *International Dairy Journal*, 6(11–12), 1209–21.
54. Dunshea F.R., Walker G.P., Williams R., Doyle P.T. 2019. Mineral and Citrate Concentrations in Milk Are Affected by Seasons, Stage of Lactation and Management Practices. *Agriculture*, 9(2), 25.
55. El-Nagar G., Clowes G., Tudorică C.M., Kuri V., Brennan C.S. 2002. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 2, 89–93.
56. Etcheverry P., Grusak M.A., Fleige L.E. 2012. Application of *in vitro* bio-accessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3, 317.
57. Falah F., Zareie Z., Vasice A., Yazdi F.T., Mortazavi S.A., Behbahani B. A. 2021. Production of synbiotic ice-creams with *Lactobacillus brevis* PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. *Food Measure*, 15, 5537–5546.
58. FAO, WHO. 2001. Joint Expert Consultation Report: Evaluations of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina. Online: [http://www.fao.org/documents/pub\\_dett.asp?lang=en&pub\\_id=61756](http://www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=61756) (Dostęp: 22.10.2023).
59. FAO. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Dostęp: 13.10.2023).
60. Feizi R., Goh K.K.T., Mutukumira A.N. 2021. Effect of chia seed mucilage as stabiliser in ice cream. *International Dairy Journal*, 120, 105087.
61. Feng P., Ye Z., Kakade A., Virk A.K., Li X., Liu P. 2019. A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota. *Nutrients*, 11(1), 22.
62. Figuerola F., Hurtado MX., Estevez A.M., Chiffelle I., Asenjo F. 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395-401.
63. Florowska A., Wójcik E., Florowski T., Dłużewska E. 2013. Wpływ dodatku preparatów błonnikowychna wybrane wyróżniki jakości lodów. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 574, 11-18.
64. Franck A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 2, 287–291.
65. Freire D.O., Wu B., Hartel R.W. 2020. Effects of structural attributes on the rheological properties of ice cream and melted ice cream. *Journal of Food Science*, 85(11), 3885-3898.
66. Furlán L.T.R., Campderros M. 2017. The combined effects of Stevia and sucralose as sugar substitute and inulin as fat mimetic on the physicochemical properties of sugar-free reduced-fat dairy dessert. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 10, 16–23.

67. Furtado G.F., Almeida F.S., Sato A.C.K., Hubinger M.D. 2022. Model infant formulas: Influence of types of whey proteins and lipid composition on the *in vitro* static digestion behavior. *Food Research International*, 161, 111835.
68. Gabbi D.K., Bajwa U., Goraya R.K. 2018. Physicochemical, Melting and Sensory Properties of Ice Cream Incorporating Processed Ginger (*Zingiber officinale*). *International Journal of Dairy Technology*, 71, 190–197.
69. Gajewska J.; Błaszczuk, MK. 2012. Probiotyczne Bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Postępy Mikrobiologii*, 51, 55–65.
70. García R, Alegría A, Barberá R, Farre R, Lagarda MJ. 1998. Dialyzability of iron, zinc, and copper of different types of infant formulas marketed in Spain. *Biological Trace Element Research*, 65(1), 7-17.
71. Gassem M., Osman M., Mohamed Ahmed I., Abdel Rahman I., Fadol M., Al-Maiman S. 2016. Effect of fermentation by selected lactic acid bacteria on the chemical composition and fatty acids of camel milk. *Journal of Camel Practice and Research*, 23, 277.
72. Genovese A., Balivo A., Salvati A., Sacchi R. 2022. Functional ice cream health benefits and sensory implications. *Food Research International*, 161, 111858.
73. Gibson G.R. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2), 25-31.
74. Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D. 2017. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491–502.
75. Giryn H., Szteke B., Szymczyk K. 2004. Wpływ procesu technologicznego i przechowywania na zawartość kwasów organicznych w zagęszczonych sokach jabłkowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (39), 92-107.
76. Global Market Insights. 2023-2032. Probiotics market size by ingredients (lactobacilli, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*), by end-use (human, animal), by application (food and beverages {dairy products, non-dairy products, cereals, baked food, fermented meat products, dry food}, dietary supplements {food, nutritional, specialty nutrients, infant formula}, animal feed), COVID-19 impact analysis, regional outlook, growth potential. *Competitive Market Share & Forecast*. Online: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/probiotics-market> (Dostęp: 05.01.2024).
77. Godward G., Kailasapathy K. 2003. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. *Dairy Science International*, 58, 161–164.
78. Goff H.D. 1997. Review. Coloidal aspects of ice cream – a review. *International Dairy Journal*, 7, 363-373.
79. Goff H.D. 2002. Formation and stabilisation of structure in ice-cream and related products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5), 432-437.
80. Goff H.D. 2008. 65 Years of ice cream science. *International Dairy Journal*, 18 (7), 754-758.
81. Goff H.D., Hartel R.W. 2013. Ice cream. 7 th ed., Springer Science & Business Media, New York. NY, USA.
82. Goktas H. 2023. Enrichment of antioxidant activity of ice cream samples with addition of rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) pulp and production of functional probiotic ice cream with using. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(11), 5962-5971.
83. Góral M., Kozłowicz K., Pankiewicz U., Góral D. 2018. Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chemistry*, 15, 239, 1151–1159.

84. Górska A., Przystupski D., Niemczura M.J., Kulbacka J. 2019. Probiotic bacteria: a promising tool in cancer prevention and therapy. *Current Microbiology*, 1-11.
85. Gramza-Michałowska A., Górecka D. 2009. Wykorzystanie inuliny jako dodatku funkcjonalnego w technologii produkcji potraw. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLII(3), 324-328.
86. Grześkowiak Ł., Isolauri E., Salminen S., Gueimonde M. 2011. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition*, 105, 887–894.
87. Haenlein G.F.W., Wendorff W.L. 2006. Sheep milk—production and utilization of sheep milk. In: Park Y.W., Haenlein G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, and Ames, Iowa, USA, 137-194.
88. Haghani S., Hadidi M., Pouramin S., Adinepour F., Hasiri Z., Moreno A., Munekata P.E.S., Lorenzo J.M. 2021. Application of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Peel in Probiotic Ice Cream: Functionality and Viability during Storage. *Antioxidants*, 10, 1777.
89. Hamden K., Boujibiha M.A., Abdeljelil N.B., Njima M., Lotfi A. 2018. Inhibitory effect of fermented pectin on digestive enzymes related to obesity, hyperlipidemia and hyperglycaemia and liver-kidney tissues toxicities. *Bioactive Carbohydrates Dietary Fibre*, 16, 82-89.
90. Hao Y., Zhou M., Chen R., Mao X., Huang W.C. 2023. A bioinspired hydrogel carrier with pH/redox dual responsiveness for effective protection and intestinal targeted delivery of probiotics. *Journal of Food Engineering*, 359, 111695.
91. Harahap I.A., Suliburska J. 2023. Can probiotics decrease the risk of postmenopausal osteoporosis in women? *Pharma Nutrition*, 24, 100336.
92. Hartel R.W., Muse M., Sofjan R. 2004. Effects of Structural Attributes on Hardness and Melting Rate of Ice Cream. Ice Cream II: Proceedings of the Second IDF International Symposium on ice cream, Thessaloniki, ed. Greece, 14–16 May 2003. *International Dairy Federation*. Brussels, Belgium.
93. Hartel R.W., Rankin S.A., Bradley R.L. 2017. A 100-Year Review: Milestones in the development of frozen desserts. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10014-10025.
94. Hashemi M., Reza Gheisari H., Shekarforoush S. 2015. Preparation and evaluation of low-calorie functional ice cream containing inulin, lactulose and *Bifidobacterium lactis*. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 183–189.
95. Hashemi S.M.B., Khaneghah A.M., Barba F.J., Nemati Z., Shokofti S.S., Alizadeh F. 2017. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Functional Foods*, 38(A), 409–414.
96. Hekmat S., McMahon D. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75, 1415–1422.
97. Hernández-Parra O.D., Plana-Fattori A., Alvarez G., Ndoye F.T., Benkhelifa H., Flick D. Modeling flow and heat transfer in a scraped surface heat exchanger during the production of sorbet. *Journal of Food Engineering*, 2018, 221, 54–69.
98. Hibberd A.A., Lyra A., Ouwehand A., Rolny P., Lindegren H., Cedgård L., Wettergren Y. 2017. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. *BMJ Open Gastroenterology*, 4(1), e000145
99. Homayouni A., Azizi A., Ehsani M.R., Yarmand M.S., Razavi S.H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111, 50–55.
100. Hu J., Bi J., Li X., Wu X., Wang W., Yu Q. 2023. Understanding the impact of pectin on browning of polyphenol oxidation system in thermal and storage processing. *Carbohydrate Polymers*, 307, 120641.

101. Hu X., Liu C., Zhang H., Hossen Md A., Sameen D.E., Dai J., Qin W., Liu Y., Li S. 2021. *In vitro* digestion of sodium alginate/pectin co-encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and its application in yogurt bilayer beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193(Pt B), 1050–1058.
102. Igual M., Fernandes Â., Dias M.I., Pinela J., García-Segovia P., Martínez-Monzó J., Barros L. 2023. The *In Vitro* Simulated Gastrointestinal Digestion Affects the Bioaccessibility and Bioactivity of *Beta vulgaris* Constituents. *Foods*, 12, 338.
103. Indira M., Venkateswarulu T., Peele K.A., Bobby M.N., Krupanidhi S. 2019. Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. *3 Biotech*, 9 (8), 306.
104. Ismail H.A., Hameed A.M., Refaey M.M., Sayqal A., Aly A.A. 2020. Rheological, physio-chemical and organoleptic characteristics of ice cream enriched with Doum syrup and pomegranate peel. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 7346–735673.
105. Jemaa M.B., Falleh H., Neves M.A., Isoda H., Nakajima M., Ksouri R. 2017. Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. *Food Chemistry*, 217, 726–734.
106. Joy E.O., Opeyemi A., James M., Gloria E. 2019. In vivo safety and hypolipidemic effect of *Bifidobacterium adolenscentis* CH2 in female albino rats. *African Journal of Microbiology Research*, 13, 10, 195-205.
107. Kaczkan M., Bienias A., Małgorzewicz S. 2018. Realization of low phosphate diet and hidden sources of phosphorus. *Forum. Nefrologiczne*, 11, 15–23.
108. Kailasapathy K., Sultana K. 2003. Survival of  $\beta$ -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 223–227.
109. Karaca O.B., Güve M., Yasar K., Kaya S., Kahayoglu T. 2009. The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 93–99.
110. Karimi R., Azizib M. H., Ghasemlouc M., Vaziri, M. 2015. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85–100.
111. Kavitate D., Kandasamy S., Devi P.B., Shetty P.H. 2018. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods—a review. *Food Bioscience*, 21, 34-44.
112. Khaneghah A.M., Abhari K., Eş I., Soares M.B., Oliveira R.B., Hosseini H., Rezaei M., Balthazar C.F., Silva R., Cruz A.G. 2019. Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: a review. *Trends Food Science Technology*, 95, 205-218.
113. Khorasaniha R., Olof H., Voisin A., Armstrong K., Wine E., Vasanthan T., Armstrong H. 2023. Diversity of fibers in common foods: Key to advancing dietary research. *Food Hydrocolloids*, 139(5), 108495.
114. Khosravi A., Safari M., Khodaiyan F., Gharibzahedi S.M.T. 2015. Bioconversion enhancement of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* using the culture media manipulation and numerical optimization. *Journal of Food Science and Technology (Campinas)*, 14, 1699-1706.
115. König H., Berkelmann-Löhnertz B. 2017. Maintenance of wine-associated microorganisms. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*; König, H., Gottfried, U., Fröhlich, J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 549–572.
116. Kowalczyk M., Znamirowska A. Pawlos M., Buniowska M. 2022. The Use of Olkuska Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream. *Animals*, 12, 1, 70.

117. Krupa-Kozak U., Markiewicz L.H., Lamparski G., Juśkiewicz J. 2017. Administration of Inulin-Supplemented Gluten-Free Diet Modified Calcium Absorption and Caecal Microbiota in Rats in a Calcium-Dependent Manner. *Nutrients*, 9, 702.
118. Lawson M.A., O'Neill I.J., Kujawska M., Javvadi S.G., Wijeyesekera A., Flegg Z., Chalklen L., Hall L.J. 2020. Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote *Bifidobacterium* interactions within a single ecosystem. *The ISME Journal*, 14, 635-648.
119. Lee Y.K., Salminen S. 2009. Handbook of Probiotics and Prebiotics, 2nd ed., John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 535–581.
120. Levrat M. A., Remesy C., Demigne C. 1991. High propionic acid fermentation and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. *Journal of Nutrition*, 121(11), 1730–1737.
121. Lima C K.G., Kruger M.F., Behrens J., Destro M.T., Landgraf M., Franco B.D.G.M. 2009. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 491–495.
122. Liu S., Hao L., Rao Z., Zhang X. 2017. Experimental study on crystallization process and prediction for the latent heat of ice slurry generation based sodium chloride solution. *Applied Energy*, 185, 1948–1953.
123. Liu X., Sala G., Scholten E. 2023. Structural and functional differences between ice crystal-dominated and fat network-dominated ice cream. *Food Hydrocolloids*, 138, 108466.
124. Lu Z.X., He J.F., Zhang Y.C., Bing D.J. 2020. Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593-2605.
125. Lum A., Albrecht J., 2008. Sensory Evaluation of Ice Cream made with Prebiotic Ingredients. *Review of Undergraduate Research in Agricultural and Life Sciences*, 3(1), 1–9.
126. Maawia K. Iqbal S., Qamar T.R., Rafiq P., Ullah A., Ahmad M.D. 2016. Production of impure prebiotic galacto-oligosaccharides and their effect on calcium, magnesium, iron and zinc absorption in Sprague-Dawley rats. *PharmaNutrition*, 4, 4, 154-160.
127. Man S., Liu T., Yao Y.; Lu Y., Ma L., Lu F. 2021. Friend or foe? The roles of inulin-type fructans. *Carbohydrate Polymers*, 15, 117155.
128. Manning T. S., Gibson G. R. 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 287-298.
129. Marshall R.T., Arbuckle W.S. 1996. Ice cream. 5 th ed. International Thomson Publishing, New York, NY, USA.
130. Martel J., Chang S.H., Ko Y.F., Hwang T.L., Young J.D., Ojcius D.M. 2022. Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends in Endocrinology Metabolism*, 33, 4.
131. Martinez A.D.L.C., Portales R.E.D., Martínez J.D.P., Ramírez J.E.G., Lara A.D.V., Enríquez A.J.B., Moscota Santillán M. 2020. Estimation of Ice Cream Mixture Viscosity during Batch Crystallization in a Scraped Surface Heat Exchanger. *Processes*, 8, 167.
132. Masoodi T.A., Shafi G. 2010. Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. *Bioinformation*, 31, 4(9), 430-435.
133. Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mongesen G., Fondén R., Saarela M. 2002. Technological challenger for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 (2-3), 173-182.
134. Mayer H.K., Fiechter G. 2012. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. *International Dairy Journal*, 24(2), 57–63.
135. McFarland L.V. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2202–2222.

136. Mei L., He F., Zhou R.Q., Wu C.D., Liang R., Xie R., Ju X.J., Wang W., Chu L.Y. 2014. Novel intestinal-targeted ca-alginate-based carrier for pH-responsive protection and release of lactic acid bacteria. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(8), 5962-5970.
137. Miller D.D., Schrickler B.R., Rasmussen R.R., Van Campen D. 1981. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 10, 2248-2256.
138. Minervini F. 2011. Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus casei* Group. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 96–104.
139. Mishra V., Prasad D. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109–115.
140. Misra S., Pandey P., Panigrahi C., Mishra H.N. 2023. A comparative approach on the spray and freeze drying of probiotic and Gamma-aminobutyric acid as a single entity: Characterization and evaluation of stability in simulated gastrointestinal conditions. *Food Chemistry Advances*, 3, 100385.
141. Mituniewicz-Małek A., Ziarno M., Dmytrów I., Balejko J. 2017. Short Communication: Effect of the Addition of *Bifidobacterium* Monocultures on the Physical, Chemical, and Sensory Characteristics of Fermented Goat Milk. *Journal Dairy Science*, 100(9), 6972–6979.
142. Mohammadi R., Mortazavian A.M., Khosrokhavar R., Gomes da Cruz A. 2011. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*, 61, 411–424.
143. Molik E., Błasiak M., Nahajło K. 2018. Walory prozdrowotne mleka owczego i czynniki wpływające na zawartość w nim aktywnych związków. *Przegląd Hodowlany*, 2, 16-19.
144. Monteagudo S.M., Kamat S., Patel N., Konuklar G., Rangavajla N., Balasubramaniam V. 2017. Improvements in Emulsion Stability of Dairy Beverages Treated by High Pressure Homogenization: A Pilot-Scale Feasibility Study. *Journal of Food Engineering*, 193, 42–52.
145. Mousavi Z. E., Mousavi S. M., Razavi S. H., Emam-Djomeh Z., Kiani H. 2011. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 123–128.
146. Mulet-Cabero A.I., Mackie A.R., Brodkorb A., Wilde P.J. 2020. Dairy structures and physiological responses: A matter of gastric digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22), 3737-3752.
147. Munarin F., Tanzi M.C., Petrini P. 2012. Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 681–689.
148. Muninathan C., Guruchandran S., Viswanath Kalyan A.J., Ganesan N.D. 2021. Microbial exopolysaccharides: Role in functional food engineering and gut-health management. *International Journal of Food Science and Technology*, 57, 27–34.
149. Muse M.R., Hartel R.W. 2004. Ice cream structural elements that affect meltin rate and hardness. *Journal of Dairy Science*, 87, 1–10.
150. Naseem Z., Mir S.A., Wani S.M., Rouf M.A., Bashir I., Zehra A. 2023. Probiotic-fortified fruit juices: Health benefits, challenges, and future perspective. *Nutrition*, 115, 112154.
151. Nieto J.A., Soriano-Romani L., Cobos-Tomas L., Sharma L., Budde T. 2021. Improved *in vitro* bioavailability of a newly developed functionalized calcium carbonate salt as a food ingredient and its comparison with available commercial calcium salts. *Food Chemistry*, 348, 128740.
152. Nivoliez A., Camares O., Paquet-Gachinat M., Bornes S., Forestier C., Veisseire P. 2012. Influence of manufacturing processes on *in vitro* properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Journal of Biotechnology*, 160(3-4), 236–241.

153. Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., Doreau M. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 418–450.
154. Ohta A., Ohtsuki M., Takizawa T., Inaba H., Adachi T., Kimura S. 1994. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. *International Journal for Vitamin Nutrition Research*, 64, 316–323.
155. Oliveira R.P.S., Perego P., Converti A., Oliveira M.N. 2009. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. *LWT Food Science and Technology*, 42, 1015–1021.
156. Pabari K., Pithva S., Kothari C., Purama R.K., Kondepudi K.K., Vyas B.R.M., Kothari R., Ambalam P. 2020. Evaluation of Probiotic Properties and Prebiotic Utilization Potential of *Weissella paramesenteroides* Isolated From Fruits. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1126–1138.
157. Paliwoda A., Nowak A. 2017. Czynniki warunkujące zdolności adhezyjne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Postępy Mikrobiologii*, 56, 196–204.
158. Palka A. 2015. Zmiany w preferencjach konsumentów na rynku lodów. *Handel Wewnętrzny*, 2(355), 308-319.
159. Palka A., Palich P. 2008. Wpływ fluktualizacji temperatury przechowywania na wybrane cechy jakościowe lodów. *Acta Agrophysica*, 12(3), 755–765.
160. Pankiewicz U., Góral M., Kozłowicz K., Góral D. 2020. Application of pulsed electric field in production of ice cream enriched with probiotic bacteria (*L. rhamnosus* B 442) containing intracellular calcium ions. *Journal of Food Engineering*, 275, 109876.
161. Park S.H., Jo Y.-J., Chun J.-Y., Hong G.-P., Davaatseren M., Choi M.-J. 2015. Effect of Frozen Storage Temperature on the Quality of Premium Ice Cream. *Food Science of Animal Resources*, 35, 793–799.
162. Park Y.W. 2009. Bioactive components in goat milk. In: Park Y.W. (Ed.), *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwell, 43–81.
163. Park Y.W., Juárez M., Ramos M., Haenlein G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
164. Paszczyk B., Tońska E. 2022. Fatty Acid Content, Lipid Quality Indices, and Mineral Composition of Cow Milk and Yogurts Produced with Different Starter Cultures Enriched with *Bifidobacterium bifidum*. *Applied Sciences*, 12, 6558.
165. Patel M., Baer R., Acharya M. 2006. Increasing the Protein Content of Ice Cream. *Journal of Dairy Science*, 89, 1400–1406.
166. Patkowska-Sokoła B., Brodkowski R., Biernat, J. 2001. Interspecies comparison of profiles of fatty acids and conjugated diene of linoleic acids in ruminant colostrum. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 11, 225.
167. Peng W., Meng D., Yue T., Wang Z., Gao, Z. 2021. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum*. *Food Chemistry*, 340, 127922.
168. Perera C.O. 2005. Selected Quality Attributes of Dried Foods. *Drying Technology*, 23, 717–730.
169. Pintor A., Escalona H.B., Totosa A. 2017. Effect of inulin on melting and textural properties of low-fat and sugar reduced ice cream: Optimization via a response surface methodology. *International Food Research Journal*, 24, 1728–1734.
170. Qi X., Al-Ghazzewi F.H., Tester R.F. 2018. Dietary fiber, gastric emptying, and carbohydrate digestion: A mini-review. *Starch-Stärke*, 70, 1700346.

171. Rahim A.M.B.H., Chilloux J., Martinez-Gili L., Neves A.L., Myridakis A., Gooderham N., Dumas M.E. 2019. Diet-induced metabolic changes of the human gut microbiome: Importance of short-chain fatty acids, methylamines and indoles. *Acta Diabetologica*, 56(5), 493-500.
172. Rakhesh N., Fellows C. M., Sissons M. 2015. Evaluation of the technological and sensory properties of durum wheat spaghetti enriched with different dietary fibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2-11.
173. Ramos M., Juarez M. 2003. Sheep milk. In: Roginski H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 4, 2539-2545.
174. Ranadhera S., Evans C., Adams M.C., Baines K.S. 2012. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49, 619–625.
175. Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Ruminant Research*, 79(1), 57–72.
176. Razavi S., Janfaza S., Tasnim N., Gibson D.L., Hoorfar M. 2021. Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. *Food Hydrocolloids*, 120, 106882.
177. Rezaei R., Khomeiri M., Aalami M., Kashaninejad M. 2014. Effect of inulin on the physicochemical properties, flow behavior and probiotic survival of frozen yogurt. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2809–2814.
178. Roberfroid M. 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34(2), S105-S110.
179. Rolon M.L., Bakke A.J., Coupland J.N., Hayes J.E., Roberts R.F. 2017. Effect of Fat Content on the Physical Properties and Consumer Acceptability of Vanilla Ice Cream. *Journal of Dairy Science*, 100, 5217–5227.
180. Roos Y.H. 2001. Water Activity, Food Shelf Life Stability, Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes; Eskin, M., Ed.; CRC Press: London, UK, 3–36.
181. Rossa P.N., de Sá E.M.F., Burin V.M., Bordignon-Luiz M.T. 2011. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 29-34.
182. Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zano N.S., Matteuzzi D. 2005. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by *Bifidobacteria*: A Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 10.
183. Rząca M., Witrowa-Rajchert D. 2007. Wpływ parametrów suszenia konwekcyjnomikrofalowego na aktywność przeciwnokową jabłek. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 5, 54, 222–230.
184. Sabet-Sarvestani N., Eskandari M.H., Hosseini S.M.H., Niakousari M., Hashemi Gahruie H., Khalesi M. 2021. Production of synbiotic ice cream using *Lactobacillus casei* *Lactobacillus plantarum* and fructo oligosaccharides. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, 5, e15423.
185. Salem M.M.F., Fathi F.A., Awad R.A. 2005. Production of probiotic ice cream. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 55, 267–271.
186. Sangami R., Sri S.R. 2017. Emerging trends in improving viability, advanced stability techniques and health claims of healthy microbiome—The probiotics. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 194–200.
187. Saputro A.E, Yanti R, Rahayu E.S. 2023. Microbiological, Physicochemical, and Sensory Characters of Synbiotic Ice Cream from Fermented Milk Using *Lactiplantibacillus*

- plantarum* subsp. *plantarum* Dad-13 Combined with Inulin. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 11, 3.
188. Schieber A., Stintzing F.C., Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—Recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401–413.
  189. Serafeimidou A., Zlatanov S., Kritikos G., Tourianis A. 2013. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 24–30.
  190. Sharma H., Bajwa J. 2022. Approach of probiotics in mental health as a psychobiotics. *Archives of Microbiology*, 204(1), 1-7.
  191. Shen L., Luten J., Robberecht H., Bindels J., Deelstra H. 1994. Modification of an *in-vitro* method for estimating the bioavailability of zinc and calcium from foods. *Journal for Food Analysis and Research*, 199, 442-445.
  192. Shinohara K., Ohashi Y., Kawasumi K., Terada A., Fujisawa T. 2010. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*, 16, 510–515.
  193. Shkemi B., Huppertz T. 2022. Calcium Absorption from Food Products: Food Matrix Effects. *Nutrients*, 14, 180.
  194. Silva C.C., da Silva Barros E.L., Verruck S., Maran B.M., Canella M.H.M., Esmerino E.A., Ramon Silva R., Prudencio E.S. 2022. How ice cream manufactured with concentrated milk serves as a protective probiotic carrier? An *in vitro* gastrointestinal assay. *Journal of Food Science and Technology*, 42, 28621.
  195. Snigdha S., Ha K., Tsai P., Dinan T.G., Bartos J.D., Shahid M. 2021. Probiotics: Potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan. *Pharmacology & Therapeutics*, 231, 107978.
  196. Soukoulis C., Chandrinou I., Tzia C. 2008. Study of the functionality of selected hydrocolloids and their blends with  $\kappa$ -carrageenan on storage quality of vanilla ice cream. *LWT-Food Science Technology*, 41, 1816–1827.
  197. Soukoulis C., Rontogianni E., Tzia C. 2010. Contribution of thermal, rheological and physical measurements to the determination of sensorially perceived quality of ice cream containing bulk sweeteners. *Journal of Food Engineering*, 100, 634–641.
  198. Sun N.X., Tong L.T., Liang T.T., Wang L.L., Liu L.Y., Zhou X.R., Zhou S.M. 2019. Effect of oat and tartary buckwheat - based food on cholesterol - lowering and gut microbiota in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Oleo Science*, 68(3), 251-259.
  199. Syed Q.A., Anwar S., Shukat R., Zahoor T. 2018. Effects of different ingredients on texture of ice cream. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 8(6), 422-435.
  200. Śliwińska A., Lesiów T. 2013. Lody jako żywność funkcjonalna—badania konsumenckie. *Nauki Inżynierskie i Technologie*, 1(8), 65–76.
  201. Ślizewska K., Chlebicz-Wójcik A. 2020. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology*, 27, 9(12), 423.
  202. Takahashi N., Xiao J.Z., Miyaji K., Iwatsuki K. 2007. H<sup>+</sup>-ATPase in the acid tolerance of *Bifidobacterium longum*. *Milchwissenschaft*, 62, 13(2), 151–153.
  203. Tamime A.Y., Saarela M., Sondergaard A.K., Mistry V.V., Shah N.P. 2005. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In *Probiotic Dairy Products*; Tamime, A.Y., Ed.; Blackwell: Oxford, UK, 39–72.
  204. Tarifa M.C., Piqueras C.M., Genovese D.B., Brugnoli L.I. 2021. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in pectin and pectin-inulin microgel

- particles: Effect on bacterial survival under storage conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179(15), 457–465.
205. Teixeira N.S., Alcantara M., Martins I.B.A., Chávez D.W.H., Rosenthal A., Chaves A.C.S.D., Deliza R. 2023. Attitudes and conceptions of Brazilian consumers toward ice cream and protein addition. *Food Quality and Preference*, 108, 104881.
  206. Thakur N., Raigond P., Singh Y., Mishra T., Singh B., Kumar Lal M.S. Dutt. 2020. Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. *Trends in Food Science Technology*, 97, 366-380.
  207. Tiwari A., Sharma H.K., Kumar N., Kaur M. 2015. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of low-fat ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 374–380.
  208. Tsevdou M., Aprea E., Betta E., Khomenko I., Molitor D., Biasioli F., Gaiani C., Gasperi F., Taoukis P., Soukoulis C. 2019. Rheological, textural, physicochemical and sensory profiling of a novel functional ice cream enriched with Muscat de Hamburg (*Vitis vinifera* L.) grape pulp and skins. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 4, 665–680.
  209. Turgeon S.L., Brisson G. 2020. Symposium review: The dairy matrix—Bioaccessibility and bioavailability of nutrients and physiological effects. *Journal of Dairy Science*, 103, 7, 6727-6736.
  210. Turgut T., Cakmakci S. 2009. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 444–451.
  211. Umu Ö.C.O., Rudi K., Diep D.B. 2017. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), 1348886.
  212. United States Department of Agriculture (USDA). Online: <https://www.usda.gov/> (Dostęp: 03.11.2023).
  213. Van der Hee R.M., Miret S., Slettenaar M., Duchateau G.S., Rietveld A.G., Wilkinson J.E., Quail P.J., Berry M.J., Dainty J.R., Teucher B., Fairweather-Tait S. 2009. Calcium absorption from fortified ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *Journal of the American Dietetic Association*, 109, 5, 830–835.
  214. Vardar N.B., Öksüz O. 2007. Artisan strawberry ice cream made with supplementation of lactococci or *Lactobacillus acidophilus*. *Italian Journal of Food Science*, 19, 403–412.
  215. Varela P., Pintor A., Fiszman S. 2014. How hydrocolloids affect the temporal oral perception of ice cream. *Food Hydrocolloids*, 36, 220–228.
  216. Vitali D., Vedrına Dragojević I., Šebečić B. 2008. Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from Whole Grain Tea-Biscuits: Impact of Proteins, Phytic Acid and Polyphenols. *Food Chemistry*, 110, 62–68.
  217. Wang T., Lee H.G. 2015. Advances in research on cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a major functional conjugated linoleic acid isomer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 720-731.
  218. Warren M.M., Hartel R.W. 2018. Effects of emulsifier, overrun, and dasher speed on ice cream microstructure and melting properties. *Journal of Food Science*, 83(3), 639-647.
  219. Warren M.M., Hartel R.W. 2014. Structural, Compositional, and Sensorial Properties of United States Commercial Ice Cream Products. *Journal Food Science*, 79, 2005–2013.
  220. Williams B.A., Grant L.J., Gidley M.J., Mikkelsen D. 2017. Gut fermentation of dietary fibres: Physico-chemistry of plant cell walls and implications for health. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2203.
  221. Woźniak B. 2019. Dyrektor generalny PPL Koral: Konsumpcja lodów będzie mocno rosła w kolejnych latach. [portalspozywczy.pl](https://www.portalspozywczy.pl/). Online: <https://www.portalspozywczy.pl/slodycze-przekaski/wiadomosci/dyrektor-generalny-ppl->

- koral-konsumpcja-lodow-bedzie-mocno-rosla-w-kolejnych-latach,165140.html. (Dostęp: 19.11.2023).
222. Yang B., Chen H., Gu Z., Tian F., Ross, R.P., Stanton C., Chen Y.Q., Chen W., Zhang, H. 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 430-439.
223. Younes H., Coudray C., Bellanger J., Demigne C., Rayssiguier Y., Remesy C. 2001. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, 86, 479–485.
224. Zhang H., Chen J., Li J., Wei C., Ye X., Shi J., Chen S. 2018. Pectin from citrus canning wastewater as potential fat replacer in ice cream. *Molecules*, 23, 925.
225. Zhang H., Li Z., Zhang L., Lai P.F.H., Tian Y., Cui S.W., Ai L. 2021. Effects of soluble dietary fibers on the viscosity property and digestion kinetics of corn starch digesta. *Food Chemistry*, 338, 127825.
226. Zitvogel L., Ma Y., Raoult D., Kroemer G., Gajewski T.F. 2018. The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies. *Science*, 359(6382), 1366-1370.

## SPIS WYKRESÓW I SCHEMATÓW

Schemat 1. Technologia produkcji lodów .....	17
Wykres 1. Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na wartość pH mieszanek lodowych przed i po fermentacji .....	22
Wykres 2. Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na jasność L* mieszanek lodowych po fermentacji .....	24
Wykres 3. Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na liczbę bakterii probiotycznych w mieszkankach przed zamrożeniem i lodach.....	26
Wykres 4. Zawartość kwasu mlekowego w lodach z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego.....	28
Wykres 5. Jasność L* lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego.....	28
Wykres 6. Składowa barwy a* w lodach z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego.....	29
Wykres 7. Składowa barwy b* w lodach z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego.....	30
Wykres 8. Puszystość lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego .....	31
Wykres 9. Czas spłynięcia pierwszej kropli lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego.....	33
Wykres 10. Twardość i gładkość lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego.....	34
Wykres 11. Smak i zapach lodów z inuliną po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego ..	35
Wykres 12. Wpływ czasu przechowywania na wartość pH lodów z inuliną .....	36
Wykres 13. Wpływ czasu przechowywania na wartość pH lodów z błonnikami .....	37
Wykres 14. Wpływ czasu przechowywania na jasność L* lodów z błonnikami .....	38
Wykres 15. Wpływ czasu przechowywania na wartość parametru a* lodów z błonnikami ....	38
Wykres 16. Wpływ czasu przechowywania na wartość parametru b* lodów z błonnikami....	39
Wykres 17. Wpływ czasu przechowywania na wartość parametru C* lodów z błonnikami ...	39
Wykres 18. Wpływ czasu przechowywania na liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w lodach z błonnikami .....	40
Wykres 19. Wpływ dodatku błonnika na wartość pH lodów po 7 dniach przechowywania ...	43
Wykres 20. Wpływ dodatku błonnika na wartość pH lodów po 21 dniach przechowywania ..	44
Wykres 21. Wpływ dodatku błonnika na jasność L* lodów po 7 dniach przechowywania.....	44
Wykres 22. Wpływ dodatku błonnika na jasność L* lodów po 21 dniach przechowywania...	45
Wykres 23. Wpływ dodatku błonnika na składową barwy a* lodów po 7 dniach przechowywania .....	45
Wykres 24. Wpływ dodatku błonnika na składową barwy a* lodów po 21 dniach przechowywania .....	46

Wykres 25. Wpływ dodatku błonnika na liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w lodach po 7 dniach przechowywania .....	47
Wykres 26. Wpływ dodatku błonnika na liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych w lodach po 21 dniach przechowywania .....	48
Wykres 27. Czas spłynięcia pierwszej kropli oraz całkowity czas topnienia lodów w zależności od dodatku błonnika jabłkowego i inuliny po 7 dniach przechowywania .....	49
Wykres 28. Czas spłynięcia pierwszej kropli oraz całkowity czas topnienia lodów w zależności od dodatku błonnika jabłkowego i inuliny po 21 dniach przechowywania .....	50
Wykres 29. Zawartość wapnia w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych .....	51
Wykres 30. Biodostępność wapnia w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych .....	52
Wykres 31. Zawartość magnezu w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych .....	53
Wykres 32. Biodostępność magnezu w lodach kontrolnych w zależności od zastosowanych szczepów probiotycznych .....	53
Wykres 33. Biodostępność wapnia w lodach w zależności od zastosowanych błonników .....	55
Wykres 34. Biodostępność magnezu w lodach w zależności od zastosowanych błonników .....	56
Wykres 35. Biodostępność potasu w lodach w zależności od zastosowanych błonników .....	57
Wykres 36. Liczba żywych komórek bakterii na etapie jamy ustnej, żołądka i jelita cienkiego w czasie trawienia <i>in vitro</i> .....	58
Wykres 38. Przeżywalność żywych komórek bakterii w lodach kontrolnych .....	61
Wykres 39. Przeżywalność bakterii probiotycznych po symulowanym trawieniu <i>in vitro</i> .....	63

## Streszczenie

Produkty na bazie mleka owczego, ze względu na swoje właściwości odżywcze i antyalergiczne, stanowią czołową pozycję w żywności funkcjonalnej i mogą być dobrym nośnikiem bakterii probiotycznych i prebiotyków. W produkcji żywności najczęściej wykorzystywane są bakterie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Dodatek prebiotyków do produktów mlecznych, takich jak lody z mleka owczego, jest doskonałą alternatywą dla suplementacji błonnika w zalecanych dawkach, zwiększając ich wartość odżywczą, a także poprawiając parametry jakościowe produktu.

Celem pracy było określenie możliwości zastosowania 5 różnych szczepów probiotycznych (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* L-26, *Lacticaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5) w produkcji lodów z mleka owczego z dodatkiem inuliny i błonnika jabłkowego. Określono również właściwości fizykochemiczne mieszanek lodowych bezpośrednio po kondycjonowaniu oraz lodów po 7 i 21 dniach przechowywania zamrażalniczego. Postanowiono także określić biodostępność makroelementów (wapń, magnez, potas, fosfor) oraz przeżywalność szczepów probiotycznych w warunkach symulowanego trawienia *in vitro*.

Zastąpienie części dodatku inuliny dodatkiem 1,5% błonnika jabłkowego obniżyło wartość pH mieszanek lodowych jeszcze przed fermentacją, w porównaniu z próbami z 4% dodatkiem inuliny. Również po fermentacji mieszanki lodowe z błonnikiem jabłkowym charakteryzowały się istotnie niższą wartością pH, pociemnieniem barwy, zwiększonym udziałem barwy czerwonej niż mieszanki sporządzone wyłącznie z inuliną. Przeprowadzone badania wskazują, że istotnym problemem jest dobór bakterii probiotycznych do fermentacji mieszanek z mleka owczego, gdyż częściowe zastąpienie inuliny błonnikiem jabłkowym zmienia warunki fermentacji. W mieszance z dodatkiem 1,5% błonnika jabłkowego stwierdzono niższą liczbę komórek *L. casei* po fermentacji. Z kolei dodatek ten przyczynił się do istotnego wzrostu liczby komórek *L. acidophilus* w mieszance po fermentacji. Natomiast dodatek 1,5% błonnika jabłkowego nie wpłynął istotnie na wzrost *B. animalis*, *L. paracasei* i *L. rhamnosus*. Proces zamrażania zmniejszył populację żywych komórek bakterii probiotycznych we wszystkich grupach lodów, tylko w lodach z *L. rhamnosus* nie stwierdzono istotnej redukcji populacji bakterii bezpośrednio po zamrożeniu. Szczep probiotyczny użyty do fermentacji kształtował w lodach: wartość pH, zawartość kwasu mlekowego, składowe barwy, puszystość i cechy organoleptyczne lodów. Nie wykazano istotnych różnic w zawartości kwasu mlekowego w lodach z inuliną oraz w lodach z błonnikiem jabłkowym w zależności od czasu przechowywania. Wydłużenie czasu przechowywania z 7 do 21 dni przyczyniło się do zwiększenia jasności barwy L\* we wszystkich grupach lodów. Dodatek błonnika zwiększył napowietrzenie lodów w porównaniu do ich odpowiedników z inuliną. W każdej grupie lodów wydłużenie czasu przechowywania skutkowało istotnym skróceniem czasu spłynięcia pierwszej kropli. Również całkowity czas topnienia skracał się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania. Po 7 dniach przechowywania zamrażalniczego w temperaturze -22°C liczba żywych komórek bakterii probiotycznych we wszystkich grupach lodów obniżyła się w porównaniu z liczbą komórek po zamrożeniu. Dalsze wydłużenie czasu przechowywania lodów z 7 do 21 dni nie wpłynęło istotnie na liczbę komórek probiotyku we wszystkich grupach lodów. Najkorzystniejszą przeżywalnością w czasie przechowywania charakteryzował się

szcep *Lacticaseibacillus paracasei*, co predysponuje je do wykorzystania w produkcji probiotycznych lodów z mleka owczego. Dodatek błonnika jabłkowego wpłynął na wygląd lodów z mleka owczego. Lody z mleka owczego z błonnikiem były ciemniejsze, bardziej czerwone i cechowały się mniejszą gładkością i większą piaszczystością niż lody zawierające wyłącznie inulinę. Wyniki oceny cech organoleptycznych wskazują brak istotnego wpływu czasu przechowywania na te parametry. W badanych lodach z mleka owczego wykazano bardzo korzystną proporcję zawartości wapnia do fosforu ponieważ wynosiła od 1,28:1 do 1,32:1 (zalecany korzystny stosunek wynosi 1:1 lub 1,5:1) co wskazuje, że lody te mogą być bardzo dobrym źródłem wapnia. Największą biodostępność wapnia, w zależności od rodzaju zastosowanych szczepów bakterii probiotycznych, wykazano dla lodów fermentowanych przez *Lacticaseibacillus paracasei*. A największą biodostępnością fosforu charakteryzowały się lody fermentowane przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. Z kolei biodostępność magnezu najwyższa była w lodach fermentowanych przez *Lacticaseibacillus casei*. Natomiast nie wykazano wpływu szczepu bakterii zastosowanego do produkcji lodów na biodostępność potasu. Biodostępność wapnia i magnezu z lodów z mleka owczego ograniczał dodatek błonnika. Obniżenie biodostępności tych makroelementów zależało od rodzaju błonnika, a najbardziej ograniczał biodostępność dodatek 4% błonnika jabłkowego, o 6–12%. Dodanie 4% inuliny zmniejszyło biodostępność wapnia o około 3–5%, a dodatek 2,5% inuliny z 1,5% błonnika jabłkowego zmniejszył biodostępność wapnia o 4–8%. Natomiast dodatek 4% błonnika jabłkowego nie wpłynął znacząco na biodostępność fosforu w lodach. Z kolei biodostępność potasu była wyższa w lodach bez dodatków niż w lodach z błonnikiem. Przeprowadzone badania dotyczące wpływu zastosowanego szczepu na przeżywalność probiotyków w warunkach trawienia *in vitro* w porównaniu do liczby komórek przed trawieniem wskazują, że w lodach bez dodatku błonnika najwyższy wskaźnik przeżywalności uzyskał *Lactobacillus acidophilus* (>80%). Najmniejszą przeżywalność (<50%) wykazano dla szczepu *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Przeżywalność szczepów *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* przekraczała 50%, w porównaniu do liczby komórek bakterii w lodach przed trawieniem. Zastosowanie inuliny i błonnika jabłkowego w produkcji lodów kształtowało przeżywalność szczepów probiotycznych w symulowanym przewodzie pokarmowym. Dodatek 4% inuliny zwiększył przeżywalność *Lacticaseibacillus rhamnosus* o ok. 10%, a szczepu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* o ok. 22% w porównaniu z przeżywalnością w lodach bez dodatku. Natomiast dodatek samego błonnika jabłkowego poprawił przeżywalność *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* w warunkach trawienia *in vitro* jedynie o około 6%. W przypadku *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* i *Lactobacillus acidophilus* dodatek 4% błonnika jabłkowego zwiększył przeżywalność w warunkach przejścia przez przewód pokarmowy o 5,7–11,2%.

Wskazanie jednego szczepu, którego zastosowanie w produkcji lodów będzie najkorzystniejsze ze względów zarówno technologicznych jak i biodostępności makroelementów oraz przeżywalności w układzie pokarmowym jest dużym wyzwaniem. Biorąc pod uwagę proces technologiczny (fermentację, zamrażanie, przechowywanie zamrażalnicze) najbardziej preferowanym byłby szczep *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Natomiast przeprowadzone badania symulowanego trawienia wskazują szczep *Lacticaseibacillus acidophilus*, ze względu na bardzo dobrą przeżywalność w układzie pokarmowym zapewniającą efekt terapeutyczny. Otrzymane rezultaty badań mogą być

wykorzystane do projektowania nowych funkcjonalnych produktów mlecznych, które łączą korzyści probiotyczne ze zwiększoną zawartością prebiotyków. Badane synbiotyczne lody z mleka owczego mogą stanowić dobre źródło uzupełnienia niedoborów makroelementów w codziennej diecie człowieka.

## Summary

Sheep milk-based products are at the forefront of functional foods due to their nutritional and anti-allergenic properties and could be a suitable carrier of probiotic bacteria and prebiotics. Probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are most commonly used in food production. Adding prebiotics to dairy products, such as ice cream made from sheep's milk, is an excellent alternative to fiber supplementation in recommended doses, increasing their nutritional value and improving product quality parameters.

The purpose of this study was to determine the possibility of using five various probiotic strains (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* L-26, *Lacticaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5) in the production of ice cream from sheep's milk with the addition of inulin and apple fiber. The physicochemical properties of ice cream mixtures directly after conditioning and ice cream after 7 and 21 days of frozen storage were also determined. Additionally, the research aimed to assess the bioavailability of macroelements (calcium, magnesium, potassium, and phosphorus) and the survival rate of probiotic strains under simulated *in vitro* digestion conditions.

Replacing 1.5% apple fiber with inulin reduced the pH value of the ice cream mixtures even prior to fermentation, compared to samples containing 4% inulin. Following fermentation, the ice cream mixtures with apple fiber exhibited a significantly lower pH value, increased darkening, and a higher proportion of red color compared to mixtures containing only inulin. This study highlights a crucial issue in selecting probiotic bacteria for fermenting sheep's milk mixtures, as the partial replacement of inulin with apple fiber alters the fermentation conditions. Furthermore, the mixture with the addition of 1.5% apple fiber demonstrated a lower count of *L. casei* cells after fermentation. Conversely, adding apple fiber significantly increased the number of *L. acidophilus* cells in the mixture after fermentation. However, adding 1.5% apple fiber did not significantly affect the growth of *B. animalis*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus*. The freezing process reduced the live cell population of probiotic bacteria in all ice cream groups, except in the ice cream containing *L. rhamnosus*, where no significant reduction in bacterial population was observed immediately after freezing. The probiotic strain used for fermentation affected the ice cream's pH value, lactic acid content, color components, overrun, and organoleptic characteristics. There were no significant differences in the lactic acid content between ice cream with inulin and ice cream with apple fiber, regardless of storage duration. Extending the storage time from 7 to 21 days increased the brightness ( $L^*$  value) across all ice cream groups. Adding fiber enhanced the ice cream's overrun compared to those made with inulin. In all groups of ice cream, an increase in storage time led to a significant reduction in the first drop melting time. The total melting time also decreased with more extended storage periods. After 7 days of frozen storage at  $-22^{\circ}\text{C}$ , the number of viable probiotic bacterial cells in all ice cream groups decreased compared to the cell count immediately after freezing. Extending the storage time from 7 to 21 days did not significantly impact the number of probiotic cells in any ice cream group. The *Lacticaseibacillus paracasei* strain exhibited the highest survival rate during storage, suggesting its suitability to produce probiotic ice cream from sheep's milk. The addition of apple fiber had noticeable effects on the visual characteristics of sheep's milk ice cream. Ice cream containing fiber exhibited a darker hue, a more apparent red coloration, and a less smooth texture with increased sandiness compared to ice cream solely

containing inulin. Evaluation of organoleptic attributes revealed no significant influence of storage duration on these parameters. Analysis of the sheep's milk ice cream indicated a highly favorable calcium-to-phosphorus ratio ranging from 1.28:1 to 1.32:1, surpassing the recommended ratio of 1:1 or 1.5:1, suggesting its potential as an excellent calcium source. The highest calcium bioavailability, contingent on the strains of probiotic bacteria utilized, was observed in ice cream fermented by *Lacticaseibacillus paracasei*. Conversely, ice cream fermented with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* exhibited the highest phosphorus bioavailability. Additionally, ice cream fermented with *Lacticaseibacillus casei* demonstrated the highest magnesium bioavailability. However, the bacterial strain used in ice cream production did not influence the bioavailability of potassium. The addition of fiber limited the bioavailability of calcium and magnesium in sheep's milk ice cream. The reduction in the bioavailability of these macronutrients depended on the type of fiber, with the addition of 4% apple fiber reducing bioavailability the most by 6-12%. Adding 4% inulin reduced the bioavailability of calcium by about 3-5%, and adding 2.5% inulin with 1.5% apple fiber reduced the bioavailability of calcium by 4-8%. In contrast, the addition of 4% apple fiber did not significantly affect the bioavailability of phosphorus in ice cream. In contrast, the bioavailability of potassium was higher in ice cream without additives than in ice cream with fiber. A study of the effect of the strain used on the survival rate of probiotics under *in vitro* digestion conditions compared to the number of cells before digestion indicated that *Lactobacillus acidophilus* had the highest survival rate (>80%) in ice cream without added fiber. The lowest survival rate (<50%) was shown for the *Lacticaseibacillus rhamnosus* strain. The survival rate of *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* strains exceeded 50%, compared to the number of bacterial cells in the ice cream before digestion. Using inulin and apple fiber in ice cream production influenced the survival rate of probiotic strains in the simulated gastrointestinal tract. The addition of 4% inulin increased the survival rate of *Lacticaseibacillus rhamnosus* by about 10% and the *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* strain by about 22% compared to the survival rate in ice cream without the additive. In contrast, adding only apple fiber improved the survival of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* under *in vitro* digestion conditions by about 6%. In the case of *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*, adding 4% apple fiber increased survival under gastrointestinal passage conditions by 5.7-11.2%.

It is challenging to identify a single strain whose use in ice cream production would be most beneficial for reasons of both technological and macronutrient bioavailability and survival in the gastrointestinal tract. Considering the technological process (fermentation, freezing, frozen storage), the most preferred strain would be *Lacticaseibacillus rhamnosus*. However, the simulated digestion studies indicate that the *Lacticaseibacillus acidophilus* strain provides a therapeutic effect due to its very good survival rate in the gastrointestinal tract. The research results can be used to design new functional dairy products that combine probiotic benefits with increased prebiotic content. Studies of synbiotic ice cream from sheep's milk can be a good source for supplementing macronutrient deficiencies in the daily human diet.

## Pozostałe osiągnięcia naukowe

### Publikacje:

1. Znamiorska A., Szajnar K., **Kowalczyk M.**, Kluz M., Buniowska M. Effect of addition of spelt and buckwheat hull on selected properties of yoghurt. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2020, 10, 2, 396-300 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.2.296-300>
2. **Kowalczyk M.**, Znamiorska A. Próba zastosowania  $\beta$ -d-galaktozydazy w produkcji probiotycznych lodów mlecznych. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2020, 27, 1(122), 50 – 61. <https://doi.org/10.15193/zntj/2020/123/334>
3. Pawlos M., Znamiorska A., Kluz M., Szajnar K., **Kowalczyk M.** Low-lactose fermented goat milks with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2020, 9(4), 751-755. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.751-755>
4. Pawlos M., Znamiorska-Piotrowska A., **Kowalczyk M.**, Zaguła G. Application of calcium citrate in the manufacture of acid rennet cheese produced from high-heat-treated goat's milk from spring and autumn season. *Molecules*, 2022, 27, 5523. <https://doi.org/10.3390/molecules27175523>
5. Pawlos M., Znamiorska-Piotrowska A., **Kowalczyk M.**, Zaguła G. Szajnar K. Possibility of using different calcium compounds for the manufacture of fresh acid rennet cheese from goat's milk. *Foods*, 2023, 12(19), 3703. <https://doi.org/10.3390/foods12193703>
6. Znamiorska-Piotrowska A., Petrusza O., Buniowska-Olejnik M., Pawlos M., **Kowalczyk M.**, Szajnar K. Effect of psyllium and chokeberry fiber addition on the quality of probiotic fermented milk. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 2023, 30, 3(136), 101-120. <https://doi.org/10.15193/zntj/2023/136/457>
7. Pawlos M., Szajnar K., **Kowalczyk M.**, Znamiorska-Piotrowska A., Probiotic Milk Enriched with Protein Isolates: Physicochemical, Organoleptic, and Microbiological Properties. *Foods* 2024, 13, 3160. <https://doi.org/10.3390/foods13193160>

### Rozdziały w monografiach:

1. Pawlos M., Znamiorska A., Kalicka D., Szajnar K., Buniowska M., **Kowalczyk M.** Właściwości ekologicznych twarożków kozich z przyprawami ziołowymi. Żywność i jej bezpieczeństwo. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C., Jaworska G. Wyd. UR, Rzeszów 2020, s. 28-37, ISBN 978-83-7996-804-6.
2. Pawlos M., Znamiorska A., Kalicka D., Szajnar K., Buniowska M., **Kowalczyk M.** Niskolaktazowe mleko kozie fermentowane przez mikroflorę mezofilną. Jakość i bezpieczeństwo żywności. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C. Wyd. UR, Rzeszów 2020, s. 17-29, ISBN 978-83-7996-815-2.
3. Kalicka D., Znamiorska A., Pawlos M., Szajnar K., **Kowalczyk M.**, Buniowska M. Analiza wybranych parametrów jakościowych jogurtów i kefirów naturalnych

- dostępnych na rynku rzeszowskim. Jakość i bezpieczeństwo żywności. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C. Wyd. UR, Rzeszów 2020, s. 40-55, ISBN 978-83-7996-815-2.
4. Znamiorska A., Szajnar K., Buniowska M., Pawlos M., Kalicka D., Kuźniar P., **Kowalczyk M.** Wpływ dodatku różnych związków wapnia i witaminy D3 na jakość lodów mlecznych. Jakość i bezpieczeństwo żywności. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C. Wyd. UR, Rzeszów 2020, s. 56-67, ISBN 978-83-7996-815-2.
  5. Znamiorska A., Szajnar K., Buniowska M., Pawlos M., **Kowalczyk M.**, Kluz M. Zastosowanie chelatu aminokwasowego żelaza i witaminy C do produkcji koziego mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12. Monografia: Potencjał biologiczny żywności. Cz.1. Red. Gajdek G., Puchalski C. Wyd. UR, Rzeszów 2021, s. 84-93, ISBN 978-83-7996-927-2.
  6. Znamiorska A., Szajnar K., Pawlos M., Buniowska M., **Kowalczyk M.** Normalizacja w produkcji żywności. Monografia: Uwarunkowania produkcji żywności. Cz.1., Red. Gajdek G., Puchalski C., ISBN 978-83-7996-929-6, Wyd. UR, Rzeszów 2021, s.106-117.
  7. **Kowalczyk M.**, Znamiorska-Piotrowska A, Pawlos M., Szajnar K., Kalicka D. Prozdrowotne właściwości jogurtów z koziego mleka z dodatkiem inuliny. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C., ISBN 978-83-8277-183-1, Wyd. UR, Rzeszów 2024.
  8. Pawlos M., Znamiorska-Piotrowska A., **Kowalczyk M.**, Szajnar S., Szopa K. Ocena wartości mikrobiologicznej koziego mleka z dodatkiem owocu pitai. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C., ISBN 978-83-8277-183-1, Wyd. UR, Rzeszów 2024.
  9. Szajnar K., Znamiorska-Piotrowska A., Pawlos M., **Kowalczyk M.** Zagrożenia mikrobiologiczne i kryteria bezpieczeństwa żywności. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C., ISBN 978-83-8277-183-1, Wyd. UR, Rzeszów 2024.
  10. Znamiorska-Piotrowska A., Petrusza O., **Kowalczyk M.**, Pawlos M., Szajnar K. Ocena właściwości lodów mlecznych z dodatkiem błonników owocowych. Monografia, Red. Gajdek G., Puchalski C., ISBN 978-83-8277-183-1, Wyd. UR, Rzeszów 2024.

#### **Udział w konferencjach:**

1. Pawlos M., Znamiorska A., Kalicka D., Szajnar K., Buniowska M., **Bąk M.** Sensory quality of flavoured cheese from organic milk 7th International Young Scientists Conference "Human – Nutrition – Environment", Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow, 4-5 June 2018.
2. Znamiorska A., **Bąk M.**, Buniowska M., Pawlos M., Kalicka D. Consumers preferences related to the different fat content in kefir 7th International Young Scientists Conference "Human – Nutrition – Environment", Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow, 4-5 June 2018.
3. Buniowska M., Znamiorska A., **Bąk M.**, Pawlos M., Kalicka D. Physicochemical and sensory characteristics of kefirs available in Rzeszów's market 7th International Young Scientists Conference "Human – Nutrition – Environment", Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow, 4-5 June 2018.

4. Pawlos M., Znamirowska A., Kalicka D., Szajnar K., Buniowska M., **Bąk M.** Organic milk cheese with herbs and spices. **3rd Meeting of Young Researches from V4 Countries** "Scientific researches in food production", 7 September 2018, Debrecen.
5. Szajnar K., Znamirowska A., Kalicka D., Buniowska M., Pawlos M., **Kowalczyk M.** Wpływ rodzaju związków wapnia na wybrane właściwości lodów z witaminą D. XXIV sesja naukowa sekcji młodej kadry naukowej PTTŻ „Żywność – wczoraj, dziś i na zdrowe jutro” VII International Session of Young Scientific Staff, Olsztyn 23-24 maja 2019.
6. **Kowalczyk M.**, Znamirowska A., Pawlos M., Szajnar K., Buniowska M. Effect of cocoa fiber addition on the physicochemical and organoleptic properties of kefir. **8th International Conference "Human - Nutrition - Environment"**, University of Rzeszow, 13-14 October 2021.
7. **Kowalczyk M.**, Znamirowska A., Pawlos M., Szajnar K., Buniowska M. Zastosowanie błonnika kokosowego do produkcji kefirów. Ogólnopolska konferencja naukowa „Człowiek – Żywność – Środowisko”, Uniwersytet Rzeszowski, 15 października 2021.
8. Znamirowska-Piotrowska A., **Kowalczyk M.** Wpływ dodatku inuliny i błonnika jabłkowego na jakość probiotycznych lodów z mleka owczego – przeżywalność komórek bakterii probiotycznych. Referat. XIII Sympozjum Naukowe „Probiotyki i Prebiotyki w Żywności“ Kiry, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 19-21 kwietnia 2023.
9. **Kowalczyk M.**, Znamirowska-Piotrowska A., Pawlos M., Szajnar K., Buniowska-Olejnik M., Petrusza O., Szopa K. Probiotic. Low-lactose fermented goat's milk with added inulin. 9th International Scientists Conference "Human - Nutrition- Environment", University of Rzeszow, 8–9 November 2023.
10. Szajnar K., Znamirowska-Piotrowska A., Szopa K., Pawlos M., **Kowalczyk M.** Właściwości probiotycznego mleka owczego fermentowanego przez *Lactocaseibacillus casei* z dodatkiem przecieru z malin. Krajowa Konferencja Naukowa "Jakość Życia w Bio-, Tech- i Ekosystemach", Uniwersytet Rzeszowski, 9-10 listopada 2023.
11. Pawlos M., Znamirowska-Piotrowska A., Petrusza O., Szajnar K., **Kowalczyk M.**, Szopa K.. Probiotic lactose-reduced fermented goat's milk with lyophilised pitaya fruit. 9th International Scientists Conference "Human - Nutrition- Environment", University of Rzeszow, 8–9 November 2023.
12. Kalicka D., Pawlos M., Szajnar K., **Kowalczyk M.**, Znamirowska-Piotrowska A. Wpływ dodatku mleka i serwatki od różnych zwierząt na właściwości użytkowe mydła twardego. Krajowa Konferencja Naukowa "Jakość Życia w Bio-, Tech- i Ekosystemach", Uniwersytet Rzeszowski, 9-10 listopada 2023.
13. Pawlos M., Znamirowska-Piotrowska A., Petrusza O., Szajnar K., **Kowalczyk M.**, Szopa K.. Possibility of Using  $\beta$ -Galactosidase and Lyophilisate of Dragon Fruit For The Manufacture Of Low-Lactose Probiotic Goat's Milk Fermented By *Lactocaseibacillus rhamnosus*. VI Міжнародної науково-практичної конференції «Якість та безпека харчових продуктів» Збірник тез VІ Міжнародної науково-практичної конференції, 9-10 листопада 2023, НУХТ (National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine), Київ, Україна, ISBN 978-966-612-304-9, p.131-133.

14. **M. Kowalczyk** A. Znamirowska –Piotrowska M. Pawlos K. Szajnar, M. Buniowska – Olejnik, O. Petrusha. Low-Lactose Goat's Milk with Inulin Fermented by *Lacticaseibacillus rhamnosus* VI Міжнародної науково-практичної конференції «Якість та безпека харчових продуктів» Збірниктез VІМіжнародноїнауково-практичноїконференції, НУХТ(National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine), Київ, Україна, ISBN 978-966-612-304-9, p.136-139, 9-10 листопада 2023.
15. Szajnar K., Znamirowska-Piotrowska A., Szopa K., Pawlos M., **Kowalczyk M.** Probiotic Sheep's Milk Fermented by *Lactobacillus acidophilus* with Raspberry Additive. VI Міжнародної науково-практичної конференції «Якість та безпека харчових продуктів» Збірниктез VІ Міжнародноїнауково-практичноїконференції, НУХТ (National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine), Київ, Україна, ISBN978-966-612-304-9, p.143-145, 9-10 листопада 2023.
16. Kalicka D., Pawlos M., Szajnar K., **Kowalczyk M.**,. Znamirowska-Piotrowska A. Influence of Nutritive Sweeteners on the Growth and Viability of Yoghurt Bacteria. VI міжнародної науково-практичної конференції «Якість та безпека харчових продуктів» Збірниктез VІМіжнародноїнауково-практичноїконференції, НУХТ (National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine), Київ, Україна, ISBN978-966-612-304-9, p.148-150, 9-10 листопада 2023.

## ANEKS

**Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów**

## Article

# Probiotic Sheep Milk Ice Cream with Inulin and Apple Fiber

Magdalena Kowalczyk <sup>\*</sup>, Agata Znamirska  and Magdalena Buniowska 

Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszów, Œwiklińskiej 2D, 35601 Rzeszów, Poland; aznam@univ.rzeszow.pl (A.Z.); mbuniowska@ur.edu.pl (M.B.)

\* Correspondence: magdalenakowalczyk@poczta.fm; Tel.: +48-17-785-4903

**Abstract:** The aim of the study was to assess the effect of the addition of inulin and the replacement of part of the inulin with apple fiber on the physicochemical and organoleptic properties of ice cream. Moreover, the survival of *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* Bb-12 and *Lactobacillus rhamnosus* was studied in sheep milk ice cream. There was no effect of the apple fiber and the type of bacteria on the number of bacteria in the probiotics after fermentation. As a result of freezing, in the mixture containing *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* Bb-12, there was a significant reduction in the bacteria from 0.39 log cfu g<sup>-1</sup> to 0.46 log cfu g<sup>-1</sup>. In all of the ice cream on the 21st day of storage, it exceeded 10 log cfu g<sup>-1</sup>, which means that the ice cream retained the status of a probiotic product. The *Lactobacillus rhamnosus* ice cream showed a lower yellow color compared to the *Bifidobacterium* Bb-12 ice cream. The overrun of the sheep's milk ice cream was within the range of 78.50% to 80.41%. The appearance of the sheep's milk ice cream is influenced significantly by the addition of fiber and the type of bacteria and the interaction between the type of bacteria and the addition of fiber, and storage time and fiber.

**Keywords:** ice cream; sheep's milk; probiotics; apple fiber; inulin; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*



**Citation:** Kowalczyk, M.; Znamirska, A.; Buniowska, M. Probiotic Sheep Milk Ice Cream with Inulin and Apple Fiber. *Foods* **2021**, *10*, 678. <https://doi.org/10.3390/foods10030678>

Academic Editor: Juana Fernández-López

Received: 16 February 2021  
Accepted: 20 March 2021  
Published: 22 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The growing awareness of consumers and their expectations regarding healthy and good quality food has contributed to increased demand for functional food production. Bioactive ingredients added to food positively affect the product's characteristics and quality, and positively affects human health [1]. The trend of using sheep's milk for ice cream production has recently emerged. Compared to other mammals' milk, sheep's milk has a higher nutritional value, with much more dry matter. Sheep's milk is a source of essential minerals and vitamins for the body [2].

The popularity of ice cream consumption and its availability contributed to developing functional ice cream recipes with increased nutritional value, enriched with probiotic bacteria and prebiotics [3]. According to FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organisation) probiotic bacteria are live microorganisms that provide health benefits to the host [4]. However, to maintain the probiotic effect, a minimum number of viable probiotic cells of 10<sup>6</sup>–10<sup>9</sup> CFU (colon forming unit) is required [5].

*Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* Bb-12 (*Bifidobacterium* Bb-12) and *Lactobacillus rhamnosus* (*Lb. rhamnosus*) are among the most commonly used probiotics from the group of lactic acid bacteria. Probiotics have antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and antiviral effects [6]. Moreover, probiotics have beneficial effects on different immune disorders, encompassing rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease (IBD) [7,8]. However, dietary fiber intake is still low [9,10]. In such a case, synbiotic ice cream can be a proposition for supplementing fiber in the diet. Numerous studies show that prebiotics support beneficial health effects, including stimulating the absorption of minerals (especially iron and calcium [11]), accelerating fat metabolism, facilitating the treatment of obesity, and preventing constipation [12]. Clinical studies show that natural polysaccharides [13–15]

affect mainly the growth and survival of the bacteria *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* among others including inulin, pectin, galactooligosaccharides (GOS), fructooligosaccharides (FOS) [16]. Inulin can be used in ice cream as a replacer for fat or sugar. Inulin plays a technological role by limiting ice crystal growth during freezing and storage, changing the mixture's freezing point, and influencing ice cream's melting. Apple fiber [17], obtained from the cleaning, micronization, and sterilization of dry apple pomace, also has a prebiotic potential. Apple fiber is a source of water-soluble pectin that is not digested by enzymes in the human digestive system [18]. After consumption, apple fiber reaches the small and large intestines relatively unchanged, nourishing the colonizing probiotics. Therefore, the study aimed to evaluate the effects of inulin addition and replacement of inulin with apple fiber on the physicochemical and organoleptic properties and the survival of *Bifidobacterium* Bb 12 and *Lb. rhamnosus* in sheep milk ice cream.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

The material for the production of the ice cream was raw sheep's milk (Farm "Owczka Zagroda," Wyzne, Poland), with the following chemical composition:  $5.34 \pm 0.2\%$  protein,  $6.20 \pm 0.3\%$  fat,  $5.01 \pm 0.12\%$  lactose determined on a Bentley milk and milk product analyzer (Bentley, Minneapolis, MN, USA) and pH  $6.8 \pm 0.12$  (FiveEasy pH-meter, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

For the production of the ice cream, the following were used: white sugar (Polish sugar, Rzeszów, Poland), mango-passion fruit flavor essence (Brown, Poland) with the following composition: natural and identical to raw mango and mango-passion essence, citric acid E330 and mango juice, inulin (Orafti HP, Oreye, Belgium), apple fiber (Aura Herbals Jarosław Paul, Sopot, Poland) composed of 100% micronized apple fiber. To inoculate the sample, probiotic bacteria (Chr. Hansen, Hoersholm Denmark) were used: *Bifidobacterium* Bb-12 and *Lb. rhamnosus* (Pen, Oxy).

### 2.2. Manufacture of Ice Cream Mixtures

Sheep's milk (85%), sugar (11%), and mango-passion essence (0.1%) were mixed and divided into two batches. Inulin (4%) was added to the first batch and divided into a sample containing *Bifidobacterium* Bb-12 (Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12) and *Lb. rhamnosus* (BLr—sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*). Inulin (2.5%) and apple fiber (15%) were added to the second batch, and they were also divided into two groups, AFbb12 (sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12) and BFLr (sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*). The milk with the additives was mixed and homogenized using a homogenizer (Nuoni GJJ-0.06/40, Zhejiang, China) with a pressure of 20 MPa at 60 °C. After, the milk was pasteurized at 85 °C for 30 min and cooled to 37 °C. The groups Abb12 and AFbb12 were inoculated with a monoculture of *Bifidobacterium* Bb-12, while the groups BLr and BFLr were inoculated with *Lb. rhamnosus*. Each prepared milk sample was inoculated with a previously activated starter culture according to the method of Mituniewicz-Małek et al. [19] with some modification. After 5 h, the inoculum consisted of  $\log 9 \text{ cfu g}^{-1}$  of bacteria, which was added to the milk in the amount of 5%. Prepared mixtures were fermented in an incubator (Cooled Incubator ILW 115, POL-EKO-Aparatura, Wodzisław Śląski, Poland) at 37 °C for 10 h, then cooled to 5 °C and conditioned at this temperature for 12 h. Prepared ice cream mixes were frozen in a freezer (UNOLD AG, Hockenheim Germany) for 40–50 min. The produced ice cream was packed in 100 mL plastic containers and stored at  $-22 \text{ °C}$  for twenty-one days.

### 2.3. Physicochemical Analysis

The chemical composition of ice cream and ice cream mixes were determined using a Bentley B-150 milk and dairy analyzer (Bentley, Minneapolis, MN, USA). Measurement of the pH value of the milk, ice cream mixes, and ice cream was performed with a FiveEasy pH meter (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Lactic acid content was determined

by titration of the samples with 0.1M NaOH using phenolphthalein as an indicator. The results are expressed in  $\text{g L}^{-1}$  [20]. Ice cream overrun was estimated as the air volume ratio in the ice cream to the melted ice cream volume [21]. The melting and the first dropping time were assessed at an ambient temperature of 23 °C by placing a defined ice cream sample on stainless steel grids.

#### 2.4. Microbiological Analysis

The number of probiotic bacteria *Bifidobacterium* Bb-12 and *Lb. rhamosus* were determined according to the method of Lima et al. [22]. The inoculation was done by the plate method using MRS agar (Biocorp, Warszawa, Poland) and then incubated anaerobically with GENbox anaer (Biomérieux, Warszawa, Poland) in a vacuum desiccator at 37 °C for 72 h [23]. The colonies were counted using a colony counter (TYPE J-3, Chemland, Stagard Szczeciński, Poland). The number of viable bacterial cells was expressed as  $\log \text{cfu g}^{-1}$ .

#### 2.5. Color of Ice Cream

The color of the ice cream was determined by the instrumental method using a colorimeter (model NR 145, Shenzhen, China) using the CIE LAB system [24]. The following values were analyzed: L\* as brightness, and as a\* color from red (+) to green (−), b\* as the colors from yellow (+) to blue (−), C\* as the purity and intensity of the color, and h\* as the shade of the color.

#### 2.6. Organoleptic Analysis

The organoleptic evaluation was carried out by 20-person panel experts. The parameters were assessed on a 9-degree scale with structures and definitions.

#### 2.7. Statistical Analysis

The results from two independent studies were expressed as the mean and standard deviation in Statistica v. 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). One, two, and three-way ANOVA was performed, and the differences between the mean values were verified with the Turkey test, with  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical and Organoleptic Properties of Ice Creams Mixtures and Ice Creams

The chemical composition of ice cream mixes based on sheep's milk before and after fermentation is presented in Table 1. There was no significant effect of fermentation and of the apple fiber on the protein and fat concentration in the ice cream mixes. The protein content of all ice cream mixes was around 5%, while the fat content ranged from 5.9% to 6.1%. In the studies by Góral et al. [25], probiotic milk ice cream contained 6.9% to 7.5% protein and 5.1% to 5.6% fat. A similar fat content (5.77–5.90%) in milk ice cream with strawberries and probiotic bacteria was shown by Vardar and Öksüz [26]. Akalin and Erişir [27] prepared a probiotic milk ice cream with a fiber content of 4%, and total solids at 33%. Homayouni et al. [28] showed a higher content of dry matter at 38.5% and fat at 8.1% in synbiotic ice cream. On the other hand, Balthazar et al. [2] prepared ice cream made of sheep's milk with a higher fat content (10.03%) and lower protein (3.2%).

The carbohydrate content of ice cream blends before fermentation ranged from 19.45% in AFbb12 to 19.50% in Abb12 and was not significant. As expected, the carbohydrate content after fermentation decreased by 1.3–1.4%. There was no significant effect of the apple fiber and the type of bacteria used for fermentation on the carbohydrate content in sheep's milk ice cream mixes. Also, in the study by Góral et al. [25], no significant effect of additives on the carbohydrate content (26.52–27.48%) in the ice cream was found. In sheep's milk ice cream, in a study by Balthazar et al. [2], the carbohydrate content was determined in the range from 18.1 to 18.6%, i.e., similar to the results presented in Table 1 with the chemical composition of ice cream such as protein, fat and carbohydrates. The effect of storage time, the addition of apple fiber, and the type of fermenting bacteria on

the pH value and the concentration of lactic acid in sheep's milk ice cream are presented in Table 2.

**Table 1.** Chemical composition of ice cream mixture samples.

Chemical Composition	Storage Time (Days)	Abb12	AFbb12	BLr	BFLr
Protein [%]	0	4.97 <sup>Aa</sup> ± 0.04	4.98 <sup>Aa</sup> ± 0.10	4.91 <sup>Aa</sup> ± 0.02	4.95 <sup>Aa</sup> 5 ± 0.04
	1	4.98 <sup>Aa</sup> ± 0.11	5.0 <sup>Aa</sup> ± 0.05	4.90 <sup>Aa</sup> ± 0.17	4.92 <sup>Aa</sup> ± 0.05
Fat [%]	0	6.08 <sup>Aa</sup> ± 0.23	6.00 <sup>A</sup> ± 0.04	6.07 <sup>Aa</sup> ± 0.02	6.04 <sup>Aa</sup> ± 0.03
	1	6.10 <sup>Aa</sup> ± 0.22	5.97 <sup>Aa</sup> ± 0.03	6.05 <sup>Aa</sup> ± 0.20	6.03 <sup>Aa</sup> ± 0.02
Carbohydrates [%]	0	19.50 <sup>Ba</sup> ± 0.14	19.45 <sup>Ba</sup> ± 0.02	19.49 <sup>Ba</sup> ± 0.04	19.46 <sup>Ba</sup> ± 0.02
	1	18.04 <sup>Aa</sup> ± 0.06	18.07 <sup>Aa</sup> ± 0.09	18.10 <sup>Aa</sup> ± 0.03	18.14 <sup>Aa</sup> ± 0.07

Mean ± standard deviation.  $n = 20$ ; <sup>a-d</sup>—Mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—Mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12, AFbb12: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12, BLr: sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*, BFLr: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*. Time: 0 before fermentation, 1 after fermentation.

**Table 2.** Lactic acid content and pH value of ice creams during storage.

Properties	Storage Time (Days)	Abb12	AFbb12	BLr	BFLr
pH	0	6.60 <sup>Bb</sup> ± 0.03	6.24 <sup>Ba</sup> ± 0.01	6.61 <sup>Bb</sup> ± 0.01	6.24 <sup>Ba</sup> ± 0.01
	1	5.19 <sup>Ab</sup> ± 0.08	4.93 <sup>Aa</sup> ± 0.03	5.97 <sup>Ad</sup> ± 0.04	5.75 <sup>Ac</sup> ± 0.03
	7	5.16 <sup>Ab</sup> ± 0.05	4.90 <sup>Aa</sup> ± 0.03	5.94 <sup>Ad</sup> ± 0.02	5.72 <sup>Ac</sup> ± 0.02
	21	5.20 <sup>Ab</sup> ± 0.08	4.90 <sup>Aa</sup> ± 0.03	5.91 <sup>Ad</sup> ± 0.04	5.71 <sup>Ac</sup> ± 0.02
Lactic acid [g/L]	1	0.61 <sup>Ac</sup> ± 0.04	0.71 <sup>Ad</sup> ± 0.04	0.38 <sup>Aa</sup> ± 0.01	0.42 <sup>Ab</sup> ± 0.01
	7	0.62 <sup>Ab</sup> ± 0.08	0.74 <sup>Ac</sup> ± 0.06	0.39 <sup>Aa</sup> ± 0.05	0.41 <sup>Aa</sup> ± 0.02
	21	0.62 <sup>Ab</sup> ± 0.01	0.75 <sup>Ac</sup> ± 0.03	0.38 <sup>Aa</sup> ± 0.01	0.40 <sup>Aa</sup> ± 0.02

Mean ± standard deviation.  $n = 20$ ; <sup>a-d</sup>—Mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—Mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12, AFbb12: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12, BLr: sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*, BFLr: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*. Storage time: 0 before fermentation, 1 after fermentation, 7 after 7 days, 21 after 21 days.

Ice cream mixes with apple fiber (AFbb12 and BFLr) were characterized by a significantly lower pH value than the mixes made only with inulin ( $p \leq 0.05$ ).

In mixtures containing *Bifidobacterium* Bb-12, a lower pH value was significant in the mixtures with *Lb. rhamnosus*. Ice cream mixtures also showed a lower lactic acid content of 0.23 g L<sup>-1</sup> and 0.29 g L<sup>-1</sup> compared to Abb12 and AFbb12 blends. The conducted three-factor ANOVA (Table 3) shows that the pH value is significantly influenced by the three analyzed research factors (type of bacteria, storage time, apple fiber) and the interactions of these factors. The effect of storage time on the pH value of the ice cream mixes and ice cream is mainly due to the inclusion of the pH value before fermentation in this comparison. There was no significant effect of the storage time on the mixtures' pH values after fermentation and on the ice cream after 7 and 21 days of storage. The addition of 1.5% apple fiber resulted in maintaining lower pH values in the mixes and ice cream throughout the entire study period. In the study carried out by Akalin and Erisir [27], the pH value in the range of 5.35 to 5.45 was determined in probiotic ice cream with the addition of oligofructose and inulin. In milk ice cream containing *Lb. rhamnosus*, Pankiewicz et al. [29] determined the pH value as 5.73 to 5.83.

**Table 3.** Analysis of variance (ANOVA) *p*-values on the effects of storage time and type of bacteria and fiber on color, pH, lactic acid, overrun, bacteria appearance, hardness, smoothness, sweet taste, additives taste, off taste, odor additives, and off odor of ice cream.

Properties	Type of Bacteria <i>p</i> -Values	Storage Time (Days) <i>p</i> -Values	Fiber <i>p</i> -Values	Type of Bacteria * Storage Time <i>p</i> -Values	Type of Bacteria * Fiber <i>p</i> -Values	Storage Time * Fiber <i>p</i> -Values	Type of Bacteria * Storage Time * Fiber <i>p</i> -Values
L*	n.s. 0.1813	↑ 0.0007	↑ 0.0000	n.s. 0.4748	n.s. 0.9892	↑ 0.0012	n.s. 0.2122
a*	↑ 0.0037	↑ 0.0073	↑ 0.0000	n.s. 0.8549	n.s. 0.1225	↑ 0.0072	n.s. 0.6325
b*	↑ 0.0000	n.s. 0.2994	↑ 0.0496	↑ 0.0213	↑ 0.0004	n.s. 0.1295	n.s. 0.5593
C*	↑ 0.0000	↑ 0.0228	↑ 0.0128	↑ 0.0000	↑ 0.0000	↑ 0.0048	↑ 0.0145
h*	↑ 0.0000	↑ 0.0083	↑ 0.0000	↑ 0.0421	↑ 0.0000	↑ 0.0000	↑ 0.0279
pH	↑ 0.0000	↑ 0.0482	↑ 0.0000	↑ 0.0258	↑ 0.0350	↑ 0.0426	↑ 0.0498
Lactic acid [g L <sup>-1</sup> ]	↑ 0.0000	n.s. 0.3087	↑ 0.0000	↑ 0.0418	↑ 0.0323	n.s. 0.3110	n.s. 0.2388
Overrun [%]	n.s. 0.4132	n.s. 0.0786	n.s. 0.0786	n.s. 0.3532	n.s. 0.1096	n.s. 0.0701	n.s. 0.6300
First drop [s]	↑ 0.0012	↑ 0.0000	n.s. 0.0541	↑ 0.0001	n.s. 0.0531	n.s. 0.0620	n.s. 0.0714
Complete melting times [s]	↑ 0.0011	↑ 0.0000	↑ 0.0004	n.s. 0.0678	n.s. 0.0882	↑ 0.0000	↑ 0.0412
Bacteria	↑ 0.0096	↑ 0.0264	↑ 0.0390	↑ 0.0499	↑ 0.0402	n.s. 0.2160	n.s. 0.1183
Appearance	↑ 0.0088	n.s. 0.3556	↑ 0.0158	n.s. 0.8324	↑ 0.0426	↑ 0.01808	n.s. 0.2138
Hardness	n.s. 0.7617	n.s. 0.0870	n.s. 0.4301	n.s. 0.6735	n.s. 0.9116	n.s. 0.7844	n.s. 0.9940
Smoothness	n.s. 0.1067	n.s. 0.1559	↑ 0.0000	n.s. 0.1975	n.s. 0.1254	↑ 0.1860	n.s. 0.1103
Sweet taste	n.s. 0.4752	n.s. 0.3115	n.s. 0.5721	n.s. 0.8505	n.s. 0.9699	n.s. 0.3590	n.s. 0.5724
Additives taste	n.s. 0.5351	n.s. 0.6157	↑ 0.0017	n.s. 0.7724	n.s. 0.1524	n.s. 0.9151	n.s. 0.6372
Off taste	n.s. 0.1321	n.s. 0.9190	n.s. 0.9190	n.s. 0.9190	n.s. 0.9190	n.s. 0.1321	n.s. 0.1321
Odor additives	n.s. 0.2274	n.s. 0.3272	↑ 0.0022	n.s. 0.7721	n.s. 0.0916	n.s. 0.9274	n.s. 0.7976
Off odor	n.s. 0.8243	n.s. 0.1248	n.s. 0.8243	n.s. 0.8243	n.s. 0.8243	n.s. 0.8243	n.s. 0.8243

\* Storage time (days) = interaction ↑; Type of bacteria \* Fiber = interaction ↑; Storage time \* Fiber = interaction ↑; Type of bacteria \* Storage time \* fiber = interaction ↑; indicates significant effect  $p < 0.05$ ; n.s. no significant effect.

### 3.2. Microbiological Analysis of Ice Cream Mixtures and Ice Creams

The presented pH values of the product help to maintain the high survival rate of probiotic bacteria (Tables 2 and 4). In addition, some studies confirmed a higher pH in fermented ice cream than in fermented milk or in fermented frozen desserts [30].

**Table 4.** Viable counts of probiotic bacteria in ice creams and ice creams mixture ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ).

Storage Time (Days)	Abb12	AFbb12	BLr	BFLr
1	11.41 <sup>Ba</sup> ± 0.79	11.11 <sup>Ba</sup> ± 0.70	11.58 <sup>Aa</sup> ± 0.78	11.73 <sup>Aa</sup> ± 0.72
2	10.95 <sup>ABa</sup> ± 0.73	10.72 <sup>ABa</sup> ± 0.72	11.46 <sup>Ab</sup> ± 0.78	11.65 <sup>Ab</sup> ± 0.80
7	10.77 <sup>ABa</sup> ± 0.83	10.48 <sup>ABa</sup> ± 0.74	11.34 <sup>Ab</sup> ± 0.87	11.59 <sup>Ab</sup> ± 0.79
21	10.68 <sup>Aa</sup> ± 0.76	10.28 <sup>Aa</sup> ± 0.73	11.22 <sup>Ab</sup> ± 0.79	11.50 <sup>Ab</sup> ± 0.77

Mean ± standard deviation.  $n = 20$ ; <sup>a,b</sup>—Mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—Mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12, AFbb12: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12, BLr: sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*, BFLr: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*. Storage time: 1 after fermentation, 2 directly after freezing, 7 after 7 days, 21 after 21 days.

Mohammadi et al. [31] and Da Silva et al. [32] reported the pH value of 6.45 in unfermented ice cream with the addition of *Bifidobacterium* Bb-12. In addition, some studies have found a higher pH in fermented ice cream than in fermented milk or in fermented frozen desserts. Ozturk et al. [33] determined the pH value in fermented ice cream from 5.28 to 5.89, depending on the additives used. These low pH values determined by Dos Santos et al. [34] and Ozturk et al. [33] were associated with the addition of fruits, which lower the pH value.

The ice cream with the addition of AFbb12 and BFLr apple fiber also showed a higher content of lactic acid after 7 and 21 days than ice creams with inulin addition. The ANOVA analysis of variance indicates that the concentration of lactic acid was significantly influenced by the type of bacteria, the addition of fiber, and the interaction between the type of bacteria and fiber. Akalin et al. [35] reported that the presence of various dietary fibers influences the lactic acid content, especially in ice cream with orange, apple, and bamboo fiber. Those authors, in probiotic ice cream with 2% apple fiber, added as much as 3.65 g/100 g of lactic acid.

As a result of the ten-hour fermentation of the ice cream mixes from sheep's milk by *Lb. rhamnosus* and *Bifidobacterium* Bb-12, the number of bacterial cells exceeded  $11 \log \text{cfu g}^{-1}$  (Table 4).

In the process of ice cream manufacturing, the ingredients used in the recipe may adversely affect the probiotic by changing the pH (e.g., pH 5.5–6.0 is optimal for the growth of *Lactobacillus acidophilus* and pH 6.0–7.0 is favorable for *Bifidobacterium*), titratable acidity or sugar content [31,36]. In this case, there was no effect from the addition of apple fiber and the type of bacteria on the number of viable cells after fermentation.

When the temperature is decreasing during the freezing of the ice mixtures, changes in the osmotic pressure in the cells result in changes in the microorganisms, causing the loss of their metabolic properties. During the freezing process, the formed ice crystals can mechanically damage cell walls, and the condensation of harmful solutes or dehydration of cells additionally intensify the adverse changes [37,38]. The adverse effect of oxygen due to the aeration process during freezing and high redox potential values on anaerobic bacteria, especially *Bifidobacterium* [31,36], should also be mentioned. The survival rate of probiotic bacteria depends on the bacteria, production technology, temperature, storage time, and ice cream chemical composition. The results presented in Table 4 indicate that as a result of freezing ice mixes fermented by *Bifidobacterium* Bb-12, there was a significant reduction in the bacterial number from  $0.39 \log \text{cfu g}^{-1}$  to  $0.46 \log \text{cfu g}^{-1}$  compared to the number of cells of these bacteria in the mixtures after fermentation ( $p \leq 0.05$ ). The low pH of the mixtures and the high content of lactic acid contributed to reducing the *Bifidobacterium* Bb-12. The decrease in bacterial cell counts resulting from freezing was

likely due to damage to the bacterial cell walls that led to the bacterial cells' death [39]. In the studies of Akalin and Erisir [27], during the freezing of mixtures with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* Bb-12, the number of bacterial cells decreased by 1.5- to 2 log CFU. Table 4 shows no significant effect of the freezing process on the number of *Lb. rhamnosus* cells in BLr and BFLr ice cream. The lack of this effect on the number of *Lb. rhamnosus* cells can be explained by significantly higher pH values and lower lactic acid content. According to Godward et al. [40] and Tamime et al. [41], probiotic bacteria's resistance to pH and acidity is bacteria dependent. It was found that *Lactobacillus* has a broad cytoplasmic buffering capacity and resistance to pH (3.72–7.74), which enables its stability and resistance to changes in cytoplasmic pH in an acidic environment.

Also, the 1.5% addition of apple fiber did not significantly affect the number of viable bacterial cells immediately after freezing (Table 4). Mohammadi et al. [31] obtained 8 log CFU mL<sup>-1</sup> of *Lactobacillus acidophilus* and 8 log CFU mL<sup>-1</sup> of *Bifidobacterium bifidum* immediately after freezing the ice cream. Akbari et al. [42] reported that after freezing, the viability of bacteria decreased by 0.28 (*Lactobacillus acidophilus*) and by 0.33 (*Lb. rhamnosus*) log CFU.

In these studies, ice cream storage at −22 °C for 7 and 21 days resulted in insignificant reduction of both *Bifidobacterium* Bb-12 and *Lb. rhamnosus* (Table 4). However, after 7 and 21 days of storage, many bacterial cells were determined in ice cream with *Lb. rhamnosus* BLr and BFLr. The number of viable *Lb. rhamnosus* and *Bifidobacterium* Bb-12 cells in all of the ice cream on day 21 of storage exceeded 10 log cfu g<sup>-1</sup>, which means that the ice cream maintained its probiotic status (Table 4). The probiotic ice cream tested by Góral et al. [25] also showed a high number of bacterial cells in the range from 9 log CFU mL<sup>-1</sup> to 11 log CFU mL<sup>-1</sup>. On the other hand, in the studies by Akalin and Erisir [27], a decrease in the bacterial number (from 0.3 to 0.9 log cfu g<sup>-1</sup>) was found during ice cream storage. According to the International Dairy Federation's recommendations, products defined as probiotic should contain at least 7 log cfu g<sup>-1</sup> *lactobacillus* or 6 log cfu g<sup>-1</sup> *Bifidobacterium* [43]. The studies of Balthazar [44] showed the number of *Lactobacillus acidophilus* cells exceeding 6 log cfu g<sup>-1</sup> in probiotic ice cream. Similarly, Akalin and Erisir [27] reported that probiotic cultures had an excellent ability to survive and maintain high cell counts in frozen foods.

The excellent survival rate of probiotic bacteria cells obtained in these studies ensures that the therapeutic level of synbiotic sheep's milk ice cream is maintained for at least 21 days. According to Jayamann and Adams [45], a bacterial level of 7 log cfu g<sup>-1</sup> is required to obtain a therapeutic (anti-diarrheal) effect.

### 3.3. Color of Ice Cream

The results of the color of the ice cream mixes and ice cream during storage are presented in Table 5.

The L\* parameter's highest values were recorded in the ice cream mix with inulin and *Lb. rhamnosus*, and then in the mix with inulin and *Bifidobacterium* Bb-12. The lighter color of the Abb12 and BLr ice cream was maintained throughout the storage period. The 1.5% addition of apple fiber decreased the color brightness by about 9 units in the AFbb12 and BFLr blends. After 7 and 21 days of storage, an increase in L\* brightness was found in all ice cream samples. Extending the storage time from 7 to 21 days resulted in a further increase in L\* brightness, but the differences were not significant. A significant effect of the storage time, the addition of apple fiber and the interaction of these two factors on the brightness of the color of the ice cream was demonstrated (Table 3).

Ice cream mixes and ice cream with the addition of apple fiber (AFbb12 and BFLr) were characterized by a higher red color (+a\*), which comes from the phenolic compounds and pectin contained in the fiber [45,46]. On the other hand, only ice cream with inulin addition had a higher green color parameter (a\*). The ANOVA analysis of variance shows that a\* parameter was influenced by the type of bacteria, storage time, the addition of apple fiber, and interactions between the storage time and the addition of apple fiber.

**Table 5.** Color parameters of ice cream sample in the ice cream mixture during storage.

	Storage Time (Days)	Abb12	AFbb12	BLr	BFLr
L*	1	70.58 <sup>Ab</sup> ± 0.35	61.52 <sup>Aa</sup> ± 0.49	71.60 <sup>Ab</sup> ± 0.32	61.89 <sup>Aa</sup> ± 0.55
	7	85.14 <sup>Bb</sup> ± 2.35	74.22 <sup>Ba</sup> ± 1.86	88.30 <sup>Bb</sup> ± 2.46	75.97 <sup>Ba</sup> ± 0.43
	21	86.78 <sup>Bb</sup> ± 1.28	74.93 <sup>Ba</sup> ± 2.86	88.70 <sup>Bb</sup> ± 0.94	77.29 <sup>Ba</sup> ± 1.05
a*	1	−0.04 <sup>Bb</sup> ± 0.09	4.29 <sup>Ad</sup> ± 0.15	−0.75 <sup>Aa</sup> ± 0.04	3.27 <sup>Ac</sup> ± 0.16
	7	−0.37 <sup>Aa</sup> ± 0.18	5.23 <sup>Bb</sup> ± 0.67	−0.26 <sup>Ba</sup> ± 0.15	5.65 <sup>Bb</sup> ± 0.11
	21	−0.47 <sup>Aa</sup> ± 0.28	4.81 <sup>Bb</sup> ± 0.48	−0.39 <sup>Ba</sup> ± 0.10	5.30 <sup>Bb</sup> ± 0.29
b*	1	17.43 <sup>Ad</sup> ± 0.31	15.79 <sup>Ac</sup> ± 0.55	9.49 <sup>Aa</sup> ± 0.07	10.15 <sup>Ab</sup> ± 0.12
	7	20.07 <sup>Bc</sup> ± 3.11	17.63 <sup>Bc</sup> ± 2.85	10.46 <sup>Aa</sup> ± 0.73	12.64 <sup>Bb</sup> ± 1.03
	21	19.13 <sup>Bd</sup> ± 1.80	14.62 <sup>Ac</sup> ± 0.55	12.11 <sup>Ba</sup> ± 0.45	12.91 <sup>Bb</sup> ± 0.23
C*	1	17.43 <sup>Ad</sup> ± 0.31	16.16 <sup>Ac</sup> ± 0.45	9.52 <sup>Aa</sup> ± 0.08	10.66 <sup>Ab</sup> ± 0.14
	7	20.07 <sup>Bb</sup> ± 3.11	18.21 <sup>Bb</sup> ± 3.04	10.46 <sup>Aa</sup> ± 0.73	16.28 <sup>Cb</sup> ± 0.29
	21	19.14 <sup>Bc</sup> ± 1.81	15.46 <sup>Ab</sup> ± 0.54	12.12 <sup>Ba</sup> ± 0.46	13.77 <sup>Bab</sup> ± 0.59
h*	1	90.14 <sup>Ac</sup> ± 0.28	74.63 <sup>Bb</sup> ± 0.22	94.49 <sup>Bd</sup> ± 0.26	71.9 <sup>Ca</sup> ± 0.83
	7	90.74 <sup>Ac</sup> ± 0.92	73.41 <sup>ABb</sup> ± 1.36	90.82 <sup>Ac</sup> ± 0.71	69.52 <sup>Ba</sup> ± 0.57
	21	91.34 <sup>Ac</sup> ± 0.76	70.55 <sup>Ab</sup> ± 1.96	91.83 <sup>Ac</sup> ± 0.42	67.39 <sup>Aa</sup> ± 0.75

Mean ± standard deviation.  $n = 20$ ; <sup>a-d</sup>—Mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A-C</sup>—Mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12, AFbb12: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12, BLr: sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*, BFLr: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*. Storage time: 1 after fermentation, 7 after 7 days, 21 after 21 days.

The analyzed ice cream and ice cream mixture were characterized by a high value of yellow (+b\*) due to the mango–passion fruit essence used in their production. A significantly lower value of yellow color was found in the ice cream fermented with *Lb. rhamnosus* throughout the storage period ( $p \leq 0.05$ ). These results were confirmed by the analysis of variance, which showed that the type of bacteria, the addition of fiber, and the interaction of these two factors significantly influenced the yellow color intensity. The results for the intensity (C\*) and hue (h\*) of the color indicate that these color coordinates are dependent on all of the factors tested (type of bacteria, storage time, and fiber addition) and their interactions. The addition of apple fiber decreased the h\* color saturation parameter in AFbb12 and BFLr ice cream. The studies of Akalin et al. [35] also found that the addition of orange and apple fiber reduces the L\* brightness of ice cream and intensifies the red and yellow color. Also, in the studies of Crizel et al. [47], Dervisoglu and Yazici [48], ice cream with citrus fiber added lower L\* values and higher a\* and b\* values, which indicates that the addition of fiber causes a reduction in brightness and gives a red and yellow color. Ice cream made by Calligaris et al. [49] determined the following values of the color parameters: L\* 87.93, a\* 2.41, and b\* 6.91. In the studies carried out of Pankiewicz et al. [29], L\* brightness in the range from 71.15 to 71.31 and the a\* 0.15 and b\* 13.29–13.64 color coordinates were determined in milk ice cream fermented by *Lb. rhamnosus*. Table 6 shows the analysis of sheep’s milk ice cream’s physical properties for such features as overrun, first dropping time, and melting time. One of the most important parameters in assessing the quality of ice cream is the degree of air entrainment in the ice cream mixture, i.e., overrun. The ice cream mixture ingredients have the most significant impact on overrun, especially the content and protein proportion to fat [50].

The results in Table 6 show that the ice cream’s overrun was not affected by the storage time, the addition of apple fiber, and the type of bacteria used to ferment the mixture. The sheep’s milk ice cream overrun was from 78.50% to 80.41% (Table 6). The studies of Akalin et al. [35] showed a lower overrun of ice cream from 25.55% to 30.60%; the 2% proved that the addition of apple fiber increased the overrun of ice cream compared to ice cream without this addition. On the other hand, Akin et al. [38] indicated that the ice cream’s overrun depended on the content of sugar and inulin. Increasing the sugar content from 15% to 21% resulted in an increased overrun from 27.8% to 32.3%. However, Crizel et al. [47] proved that the addition of orange fiber as a fat replacement resulted in a significant reduction in the ice cream’s overrun compared to the control sample, probably due to the lower fat content. In the conducted research, all ice cream groups contained

about 6% fat; hence their overruns did not differ. Our study also proves that replacing inulin with apple fiber does not change the overrun of ice cream.

**Table 6.** Overrun, first dropping time, and total melting rate in 7 and 21 days of storage.

Properties	Storage Time (Days)	Abb12	AFbb12	BLr	BFLr
Overrun [%]	7	79.15 <sup>Aa</sup> ± 0.20	80.41 <sup>Aa</sup> ± 0.22	80.50 <sup>Aa</sup> ± 0.95	78.50 <sup>Aa</sup> ± 0.12
	21	80.30 <sup>Aa</sup> ± 0.47	80.41 <sup>Aa</sup> ± 1.22	80.61 <sup>Aa</sup> ± 0.40	79.1 <sup>Aa</sup> ± 0.95
First drop [s]	7	972 <sup>Ba</sup> ± 12.21	960 <sup>Ba</sup> ± 10.26	991 <sup>Bb</sup> ± 8.71	982 <sup>Bb</sup> ± 10.12
	21	940 <sup>Ab</sup> ± 14.40	906 <sup>Aa</sup> ± 10.15	972 <sup>Ac</sup> ± 7.91	911 <sup>Aa</sup> ± 8.32
Complete melting times [s]	7	5469 <sup>Bb</sup> ± 35.20	5230 <sup>Ba</sup> ± 20.13	5913 <sup>Bd</sup> ± 38.12	5692 <sup>Bc</sup> ± 35.11
	21	4804 <sup>Ac</sup> ± 33.85	4007 <sup>Aa</sup> ± 25.42	5187 <sup>Ad</sup> ± 40.00	4201 <sup>Ab</sup> ± 15.32

Mean ± standard deviation.  $n = 20$ ; <sup>a-d</sup>—Mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—Mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12, AFbb12: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12, BLr: sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*, BFLr: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*. Storage time: 7 after 7 days, 21 after 21 days.

The melting rate of ice cream is influenced by many factors, including the total dry matter content, ice crystals, size, and the number of fat globules [25]. The first dropping time of ice cream drip time after 7 days of freezer storage differed significantly depending on the type of bacteria used to ferment the mixture. Ice creams containing *Lb. rhamnosus* (BLr and BFLr) had a longer time for the first dropping time after 7 days of storage than those containing *Bifidobacterium* Bb-12 (Table 6). Extending the ice cream storage time to 21 days significantly reduced the first dropping time by 19–22 s in all ice cream groups.

A fast-melting product is undesirable, and a too slow melting rate can also be a disadvantage of ice cream [51]. The total melting time was shorter in the apple fiber ice cream (AFbb12 and BFLr) than their inulin only counterparts (Abb12 and BLr). Zhang et al. [51] found that the addition of pectin reduced ice cream's melting rate and led to a more excellent product stabilization. The pectin present in apple fiber may interact with other milk components to create a dense three-dimensional network structure and reduce the heat transfer rate. [52] reported that apple fiber's addition increased the freezing temperature and led to a decrease in ice crystals and the percentage of frozen water. The analysis of variance carried out indicates that the total melting time was influenced by the interactions between the storage time and the addition of apple fiber and the interactions between the three examined factors (type of bacteria, storage time, and fiber). According to Criscio et al. [53] and El-Nagar et al. [54] samples containing 5% inulin had a significantly higher melting rate than the controls and samples with 2.5% inulin. In the studies of Balthazar et al. [44], probiotic ice cream with a 10% addition of inulin also had a longer melting time than the probiotic ice cream without inulin. Akin et al. [38], in their study on ice cream depending on inulin, noted that the values of the first dropping time and total melting time were within the ranges of 1780 s (15% sugar without inulin)–2058 s (21% sugar with 2% inulin), respectively, and 4806 s (21% sugar without inulin)–5313 s (18% sugar with 2% inulin). In other yogurt ice cream studies, the addition of 5% inulin reduced the melting rate from 5% to 9% due to binding water, thus reducing the interaction of dry matter components with water [54]. According to our research (Table 1), all ice cream groups did not differ in fat content. Therefore, no differences in overrun were found. In this case, the addition of inulin had a more significant effect on extending the ice cream melting time. Analyses show that ice cream with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber (AFbb12, BFLr) is quicker to melt than ice cream with 4% inulin (Abb12, BLr). Also, in the studies of Akalin and Erisir [27], the addition of inulin increased the first dropping time and the total time of ice cream melting.

From a technological point of view, the use of fruit fiber in ice cream production causes significant changes in organoleptic characteristics, improves their taste and texture [55].

The addition of apple fiber significantly changed the appearance of sheep's milk ice cream. It increased sandiness and intensified the additives taste, and the smell of the expansion of mango–passion fruit essence, both on the 7th and 21st day of freezing storage (Table 7).

**Table 7.** Sensory characteristics of ice cream on 7 and 21 days of storage.

Properties	Storage Time (Days)	Abb12	AFbb12	BLr	BFLr
Appearance	7	8.07 <sup>Ab</sup> ± 1.33	5.71 <sup>Aa</sup> ± 1.50	7.43 <sup>Ab</sup> ± 1.51	5.57 <sup>Aa</sup> ± 1.76
	21	8.25 <sup>Ab</sup> ± 1.39	5.75 <sup>Aa</sup> ± 0.50	8.75 <sup>Ab</sup> ± 0.50	5.00 <sup>Aa</sup> ± 1.15
Hardness	7	6.00 <sup>Aa</sup> ± 1.35	6.71 <sup>Aa</sup> ± 1.36	6.14 <sup>Aa</sup> ± 1.04	6.71 <sup>Aa</sup> ± 1.89
	21	6.38 <sup>Aa</sup> ± 1.20	6.75 <sup>Aa</sup> ± 1.26	6.00 <sup>Aa</sup> ± 0.82	6.85 <sup>Aa</sup> ± 1.26
Smoothness	7	7.07 <sup>Ab</sup> ± 1.77	3.14 <sup>Aa</sup> ± 1.91	6.86 <sup>Ab</sup> ± 1.07	3.00 <sup>Aa</sup> ± 1.31
	21	6.38 <sup>Ab</sup> ± 1.06	3.75 <sup>Aa</sup> ± 1.26	6.50 <sup>Ab</sup> ± 1.29	3.50 <sup>Aa</sup> ± 1.29
Sweet taste	7	5.43 <sup>Aa</sup> ± 1.03	4.43 <sup>Aa</sup> ± 0.53	5.24 <sup>Aa</sup> ± 1.07	4.57 <sup>Aa</sup> ± 1.62
	21	5.25 <sup>Aa</sup> ± 1.67	5.75 <sup>Aa</sup> ± 1.71	5.25 <sup>Aa</sup> ± 1.71	5.25 <sup>Aa</sup> ± 1.50
Additives taste	7	5.29 <sup>Aab</sup> ± 1.77	6.71 <sup>Ab</sup> ± 1.60	4.00 <sup>Aa</sup> ± 1.21	6.57 <sup>Ab</sup> ± 1.72
	21	5.75 <sup>Aab</sup> ± 1.05	6.50 <sup>Ab</sup> ± 1.29	4.25 <sup>Aa</sup> ± 1.71	7.25 <sup>Ab</sup> ± 1.50
Off taste	7	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00
	21	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00
Odor additives	7	3.00 <sup>Aa</sup> ± 1.71	4.00 <sup>Ab</sup> ± 1.00	1.71 <sup>Aa</sup> ± 0.76	4.29 <sup>Ab</sup> ± 1.56
	21	3.88 <sup>Aa</sup> ± 1.30	4.50 <sup>Ab</sup> ± 1.52	2.00 <sup>Aa</sup> ± 0.82	4.75 <sup>Ab</sup> ± 1.06
Off odor	7	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.10 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00
	21	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00

Mean ± standard deviation.  $n = 20$ ; <sup>a,b</sup>—Mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A</sup> Mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). Abb12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* bb12, AFbb12: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Bifidobacterium* bb12, BLr: sample with 4% inulin and *Lb. rhamnosus*, BFLr: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. rhamnosus*. Storage time: 7 after 7 days, 21 after 21 days.

Akalin et al. [35] showed that, in the ice cream samples prepared with apple and orange fiber, lower scores were given for flavor characteristics compared to the control ice cream. Crizel et al. [47] also showed lower taste scores for ice cream with 1.5% orange fiber than for the controls. The addition of microorganisms and inulin in the studies of Criscio et al. [53] did not significantly affect flavor intensity, texture, and smoothness. On the other hand, Akbari et al. [42] indicated that the introduction of inulin as a fat substitute made the evaluators prefer the taste of the ice cream containing 3% and 4% of inulin to the taste of the ice cream without inulin. Akin et al. [38] conducted studies on inulin and sugar influence on prebiotic ice cream's physical and sensory properties. They found that the addition of inulin does not affect the sensory properties of ice cream. The analysis of variance performed shows that the storage time, type of bacteria, and interactions of all examined factors (storage time, kind of bacteria, fiber) do not affect the hardness, smoothness, sweet taste, taste, and smell of additives as well as foreign taste and smell. The research indicates that only apple fiber's addition contributed to a change in the smoothness additives, taste and smell.

#### 4. Conclusions

Sheep's milk ice cream can be a good source of probiotic bacteria and dietary fiber. The addition of 1.5% apple fiber instead of inulin resulted in a change in the ice cream's physicochemical and organoleptic characteristics. On an industrial scale, when using the addition of apple fiber for the production of probiotic ice cream, attention should be paid to selecting the strain and the survival of probiotic bacteria during the freezing of the mixture and storage of ice cream.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K. and A.Z.; methodology, M.K.; software, M.B.; validation, M.K., A.Z., M.B.; formal analysis, A.Z.; investigation, M.K. and M.B.; resources, M.K. and A.Z.; data curation, M.K. and A.Z.; writing—original draft preparation, M.K. and A.Z.; writing—review and editing, M.K., A.Z. and M.B.; supervision, A.Z.; project administration, A.Z.; funding acquisition, M.K., A.Z. and M.B.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Buniowska, M.; Carbonell-Capella, J.M.; Frigola, A.; Esteve, M.J. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1834–1842. [CrossRef]
2. Balthazar, C.F.; Silva, H.L.A.; Vieira, A.H.; Neto, R.P.C.; Cappato, L.P.; Coimbra, P.T.; Raices, I.B.; Silva, R.S.L.; Cruz, A.G. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Res. Int.* **2017**, *91*, 38–46. [CrossRef]
3. Ayar, A.; Siçramaz, H.; Öztürk, S.; Yilmaz, S.Ö. Probiotics properties of ice creams produced with dietary fibres from by-products of the industry. *Int. J. Dairy Technol.* **2017**, *70*, 1–9. [CrossRef]
4. FAO; WHO. Joint Expert Consultation Report: Evaluations of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina. 2001. Available online: [http://www.fao.org/documents/pub\\_dett.asp?lang=en&pub\\_id=61756/](http://www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=61756/) (accessed on 22 March 2021).
5. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [CrossRef] [PubMed]
6. Lopez-Santamarina, A.; Lamas, A.; del Carmen Mondragón, A.; Cardelle-Cobas, A.; Regal, P.; Rodriguez-Avila, J.A.; Miranda, J.M.; Franco, C.M.; Cepeda, A. Probiotic effects against virus infections: New weapons for an old war. *Foods* **2021**, *10*, 130. [CrossRef] [PubMed]
7. Spence, C.; Youssef, J.; Navarra, J. Using ice-cream as an effective vehicle for energy/nutrient delivery in the elderly. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2019**, *16*, 100140. [CrossRef]
8. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Berni Canani, R.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [CrossRef] [PubMed]
9. U.S. Department of Health and Human Services; U.S. Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans 2015–2020. Available online: <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/> (accessed on 4 August 2018).
10. Sah, B.N.P.T.; Vasiljevic, S.; McKechnie, O.N. Donkor, Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yoghurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 978–986. [CrossRef]
11. Baye, K.; Guyot, J.P.; Mouquet-Rivier, C. The unresolved role of dietary fibers on mineral absorption. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57*, 949–957. [CrossRef] [PubMed]
12. Shah, B.R.; Li, B.; Al Sabbah, H.; Xu, W.; Mraz, J. Effects of prebiotic dietary fibers and probiotics on human health: With special focus on recent advancement in their encapsulated formulations. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *102*, 178–192. [CrossRef]
13. Tojo, R.; Suárez, A.; Clemente, M.G.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; Ruas-Madiedo, P. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 15163–15176. [CrossRef] [PubMed]
14. Salazar, N.; Dewulf, E.M.; Neyrinck, A.M.; Bindels, L.B.; Cani, P.D.; Mahillon, J.; de Vos, W.M.; Thissen, J.P.; Gueimonde, M.; de Los Reyes-Gavilán, C.G.; et al. Inulin-type fructans modulate intestinal bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 501–507. [CrossRef] [PubMed]
15. Man, S.; Liu, T.; Yao, Y.; Lu, Y.; Ma, L.; Lu, F. Friend or foe? The roles of inulin-type fructans. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *252*, 117155. [CrossRef]
16. Kumar, J.; Rani, K.; Datt, C. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 6229–6237. [CrossRef] [PubMed]
17. Mateos-Aparicio, I.; Armada, R.D.P.; Pérez-Cózar, M.L.; Rupérez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J. Apple by-product dietary fibre exhibits potential prebiotic and hypolipidemic effects in high-fat fed Wistar rats. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **2020**, *23*, 100219. [CrossRef]
18. Rabetafika, H.N.; Bchir, B.; Blecker, C.; Richel, A. Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *40*, 99–114. [CrossRef]
19. Mituniewicz-Malek, A.; Ziarno, M.; Dmytrów, I.; Balejko, J. Short Communication: Effect of the Addition of Bifidobacterium Monocultures on the Physical, Chemical, and Sensory Characteristics of Fermented Goat Milk. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 6972–6979. [CrossRef]
20. Jemaa, M.B.; Falleh, H.; Neves, M.A.; Isoda, H.; Nakajima, M.; Ksouri, R. Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. *Food Chem.* **2017**, *217*, 726–734. [CrossRef]
21. Rezaei, R.; Khomeiri, M.; Aalami, M.; Kashaninejad, M. Effect of inulin on the physicochemical properties, flow behavior and probiotic survival of frozen yogurt. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 2809–2814. [CrossRef]
22. Lima, K.G.D.; Kruger, M.F.; Behrens, J.; Destro, M.T.; Landgraf, M.; Franco, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 491–495. [CrossRef]
23. Znamirowska, A.; Szajnar, K.; Pawlos, M. Probiotic Fermented Milk with Collagen. *Dairy* **2020**, *1*, 8. [CrossRef]

24. Szajnar, K.; Znamirowska, A.; Kuźniar, P. Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and increased calcium concentration. *Int. J. Food Prop.* **2020**, *23*, 582–598. [[CrossRef](#)]
25. Góral, M.; Kozłowicz, K.; Pankiewicz, U.; Góral, D. Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chem.* **2018**, *239*, 1151–1159. [[CrossRef](#)]
26. Vardar, N.B.; Öksüz, O. Artisan strawberry ice cream made with supplementation of lactococci or *Lactobacillus acidophilus*. *Ital. J. Food Sci.* **2007**, *19*, 403–412.
27. Akalin, A.S.; Erisir, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 184–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Homayouni, A.; Azizi, A.; Ehsani, M.R.; Yarmand, M.S.; Razavi, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem.* **2008**, *111*, 50–55. [[CrossRef](#)]
29. Pankiewicz, U.; Góral, M.; Kozłowicz, K.; Góral, D. Application of pulsed electric field in production of ice cream enriched with probiotic bacteria (*L. rhamnosus* B 442) containing intracellular calcium ions. *J. Food Eng.* **2020**, *275*, 109876. [[CrossRef](#)]
30. Cruz, A.G.; Antunes, A.E.; Sousa, A.L.O.; Faria, J.A.; Saad, S.M. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1233–1239. [[CrossRef](#)]
31. Mohammadi, R.; Mortazavian, A.M.; Khosrokhavar, R.; da Cruz, A.G. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 411–424. [[CrossRef](#)]
32. Da Silva, P.D.L.; De Fátima Bezerra, M.; Dos Santos, K.M.O.; Correia, R.T.P. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 452–457. [[CrossRef](#)]
33. Ozturk, H.I.; Demirci, T.; Akin, N. Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional characteristics. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *90*, 339–345. [[CrossRef](#)]
34. Dos Santos Cruxen, C.E.; Hoffmann, J.F.; Zandoná, G.P.; Fiorentini, A.M.; Rombaldi, C.V.; Chaves, F.C. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. *LWT Food Sci. Technol.* **2017**, *75*, 379–385. [[CrossRef](#)]
35. Akalin, A.S.; Kesencas, H.; Dinkci, N.; Unal, G.; Ozer, E.; Kınık, O. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 37–46. [[CrossRef](#)]
36. Śliwińska, A.; Lesiów, T. Lody jako żywność funkcjonalna—badania konsumenckie. Ice cream as functional—consumer research. *Nauki Inż. Technol.* **2013**, *1*, 65–76. (In Polish)
37. Tripathi, M.K.; Giri, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct Foods* **2014**, *9*, 225–241. [[CrossRef](#)]
38. Akin, M.B.; Akin, M.S.; Kirmaci, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chem.* **2007**, *104*, 93–99. [[CrossRef](#)]
39. Al-Shawi, S.G.; Ali, H.I. Study the Possibility of Manufacturing Therapeutic Ice Cream by Adding Synbiotic and Study its Microbiological and Sensory Characteristics. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2020**, *14*, 2147–2156. [[CrossRef](#)]
40. Godward, G.; Sultana, K.; Kailaspathy, K.; Peiris, P.; Arumugaswamy, R.; Reynolds, N. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft* **2000**, *55*, 441–445.
41. Tamime, A.Y.; Saarela, M.; Sondergaard, A.K.; Mistry, V.V.; Shah, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiot. Dairy Prod.* **2005**, *1*, 39–63. [[CrossRef](#)]
42. Akbari, M.; Eskandari, M.H.; Niakosari, M.; Bedeltavana, M. The effect of inulin on the physicochemical properties and sensory attributes of low-fat ice cream. *Int. Dairy J.* **2016**, *57*, 52–55. [[CrossRef](#)]
43. Champagne, C.P.; Gardner, N.J.; Roy, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 61–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Balthazar, C.F.; Silva, H.L.; Esmerino, E.A.; Rocha, R.S.; Moraes, J.; Carmo, M.A.; Franco, R.M. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. *Food Chem.* **2018**, *246*, 464–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jayamanne, V.S.; Adams, M.R. Determination of survival, identity, and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42*, 189–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mateos-Aparicio, I.; Matias, A. Food industry processing by-products in foods. In *The Role of Alternative and Innovative Food Ingredients and Products in Consumer Wellness*, 1st ed.; Galanakis, C., Ed.; Elsevier Inc.: London, UK, 2019; pp. 239–281.
47. Crizel, T.d.M.; de Araujo, R.R.; Rios, A.d.O.; Rech, R.; Flores, S.H. Orange fiber as a novel fat replacer in lemon ice cream. *Food Sci. Technol.* **2014**, *34*, 332–340. [[CrossRef](#)]
48. Dervisoglu, M.; Yazici, F. Note. The effect of citrus fibre on the physical, chemical and sensory properties of ice cream. *Food Sci. Technol. Int.* **2006**, *12*, 159–164. [[CrossRef](#)]
49. Calligaris, S.; Marino, M.; Maifreni, M.; Innocente, N. Potential application of monoglyceride structured emulsions as delivery systems of probiotic bacteria in reduced saturated fat ice cream. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *96*, 329–334. [[CrossRef](#)]
50. Florowska, A.; Wójcik, E.; Florowski, T.; Dłużewska, E. Wpływ dodatku preparatów błonnikowych na wybrane wyróżniki jakości lodów. Influence of the addition of fiber preparations on selected quality parameters of ice cream. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* **2013**, *574*, 11–18. (In Polish)

51. Zhang, H.; Chen, J.; Li, J.; Wei, C.; Ye, X.; Shi, J.; Chen, S. Pectin from citrus canning wastewater as potential fat replacer in ice cream. *Molecules* **2018**, *23*, 925. [[CrossRef](#)]
52. Varela, P.; Pintor, A.; Fiszman, S. How hydrocolloids affect the temporal oral perception of ice cream. *Food Hydrocoll.* **2014**, *36*, 220–228. [[CrossRef](#)]
53. Di Criscio, T.; Fratianni, A.; Mignogna, R.; Cinquanta, L.; Coppola, R.; Sorrentino, E.; Panfili, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 4555–4564. [[CrossRef](#)]
54. El-Nagar, G.; Clowes, G.; Tudorică, C.M.; Kuri, V.; Brennan, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *Int. J. Dairy Technol.* **2002**, *55*, 89–93. [[CrossRef](#)]
55. Al-Sheraji, S.H.; Ismail, A.; Manap, M.Y.; Mustafa, S.; Yusof, R.M.; Hassan, F.A. Prebiotics as functional foods: A review. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1542–1553. [[CrossRef](#)]



## Article

# The Use of Olkuska Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream

Magdalena Kowalczyk <sup>\*</sup>, Agata Znamiorska , Małgorzata Pawlos and Magdalena Buniowska 

Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Cwiklinskiej 2D, 35-601 Rzeszow, Poland; aznamiorska@ur.edu.pl (A.Z.); mpawlos@ur.edu.pl (M.P.); mbuniowska@ur.edu.pl (M.B.)

\* Correspondence: mkowalczyk@ur.edu.pl

**Simple Summary:** Ice cream may be used as a carrier to deliver probiotics and prebiotics. In this study, we decided to investigate the possibility of using sheep milk from the Olkuska breed for ice cream manufacture and evaluate the viability of *Lactobacillus* and *Lactocaseibacillus* strains and the chemical, physical and organoleptic properties of dairy ice cream during storage. The obtained results contribute to a more practical application of different probiotic strains for the fermentation of ice cream mixes and the possibility of using apple fiber in ice cream production. Moreover, the study's findings showed that symbiotic ice cream with acceptable physicochemical and organoleptic characteristics might be produced from sheep milk of the Olkuska breed.

**Abstract:** The aim of this study was to determine the possibility of using Olkuska sheep milk for the production of ice cream with probiotics and prebiotics. The study examined the effect of the storage and type of bacteria used for the fermentation of ice cream mixes and partial replacement of inulin with apple fiber on the physicochemical properties, viability of probiotic cultures and organoleptic properties of sheep's milk ice cream stored at  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 21 days. The addition of apple fiber reduced the pH value of ice cream mixes before fermentation. In ice cream mixes and ice cream with apple fiber, the lactic acid content was higher by  $0.1\text{--}0.2\text{ g L}^{-1}$  than in their equivalents with inulin only. These differences persisted during the storage of the ice cream. After fermentation of the ice mixes, the bacterial cell count ranged from  $10.62\text{ log cfu g}^{-1}$  to  $12.25\text{ log cfu g}^{-1}$ . The freezing process reduced the population of probiotic bacteria cells in ice cream with inulin from  $0.8\text{ log cfu g}^{-1}$  in ice cream with *Lactobacillus acidophilus*,  $1.0\text{ log cfu g}^{-1}$  in ice cream with *Lactocaseibacillus paracasei* and  $1.1\text{ log cfu g}^{-1}$  in ice cream with *Lactocaseibacillus casei*. Freezing the varieties with apple fiber also resulted in a reduction of viable bacterial cells from  $0.8\text{ log cfu g}^{-1}$  in ice cream with *L. paracasei* and *Lb. acidophilus* to  $1\text{ log cfu g}^{-1}$  in ice cream with *L. casei*, compared to the results after fermentation. The highest percentage overrun was determined in ice cream with *L. paracasei* and *Lb. acidophilus*. Ice cream with *L. casei* was characterized by significantly lower overrun on the 7th and 21st days of storage. Although *L. paracasei* ice cream had the highest overrun, it did not cause a significant reduction in the probiotic population during storage. After seven days of storage, the first drop differed significantly depending on the type of bacteria used for fermentation of the mixture and the addition of apple fiber. *L. casei* ice cream had a longer first drop time than *L. paracasei* and *Lb. acidophilus* ice cream. Partial replacement of inulin with apple fiber resulted in a significant darkening of the color of ice cream mixes. Depending on the type of bacteria used for fermentation, the addition of apple fiber decreased the value of the  $L^*$  parameter. Ice cream mixes and ice cream with inulin and apple fiber were characterized by a high proportion of yellow. Partial replacement of inulin with apple fiber reduced the hardness of ice cream compared to inulin-only ice cream. Moreover, the panelists found that ice cream with inulin was characterized by a sweeter taste than ice cream with apple fiber. Moreover, the addition of apple fiber favorably increased the flavor and aroma perception of the mango-passion fruit. Therefore, the milk of Olkuska sheep could be successfully used for the production of symbiotic dairy ice cream.



**Citation:** Kowalczyk, M.; Znamiorska, A.; Pawlos, M.; Buniowska, M. The Use of Olkuska Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream. *Animals* **2022**, *12*, 70. <https://doi.org/10.3390/ani12010070>

Academic Editors: Aneta Brodziak and Joanna Barłowska

Received: 23 November 2021

Accepted: 28 December 2021

Published: 29 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** sheep milk; Olkuska breed; dairy ice cream; probiotics; symbiotic; apple fiber; *Lactobacillus*; *Lactocaseibacillus*

## 1. Introduction

The parameters of sheep milk are influenced by various factors including genetic, physiological and environmental. Polish sheep breeds, such as Olkuska, are well adapted to local environmental conditions. This breed is characterized by resistance to diseases and demanding environmental conditions, moreover good milk yield [1].

Sheep milk is characterized by a higher content of total solids compared to cow and goat milk. Moreover, sheep milk is characterized by a high content of micro- and macroelements, vitamins, protein and fat [2].

The protein content of raw milk differs among the species and the sheep raw milk has the higher protein content (5.5%). According to Balthazar et al. [3] the total casein content in sheep raw milk is 85% of total proteins, where  $\alpha S_1$ ,  $\alpha S_2$ ,  $\beta$  and  $\kappa$ -casein represent 6.7%, 22.8%, 61.6% and 8.9%, respectively. The remaining 15% of milk proteins includes major whey proteins  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin as well as other protein constituents [4].

Milk proteins have a wide range of functional properties such as emulsifying, thickening, gelling and foaming. Milk proteins promote the formation and stabilization of oil droplets in emulsions or air bubbles in foams in food formulations [5]. Moreover, the higher viscosity of sheep milk may also be attributable to an increased water binding capacity in the milk proteins [6]. These functional properties of milk proteins are used to produce dairy products such as ice cream.

Raw milk from different species remains an element of human nutrition. Therefore, the free and total amino acid profile of milk from different species plays a crucial role for both milk producers and processors as well as consumers to achieve innovative new product design, complexity, flavor and functionality [4]. The characteristic profiles of free amino acid content vary among species. According to Landi et al. [4], the free amino acid found in the highest amounts in raw cow, sheep and goat milk is glutamic acid (9.07 mg per 100 g), tyrosine (4.72 mg per 100 g) and glycine (4.54 mg per 100 g). In contrast, raw goat milk is a rich source of taurine (14.92 mg per 100 g), which is found in small amounts in raw cow milk (1.38 mg per 100 g) and sheep milk (2.10 mg per 100 g).

Sheep milk could be considered a substitute for cow's milk for allergy sufferers. Specific antibodies in milk-allergic individuals (IgE) poorly recognize the  $\alpha S_1$ -casein,  $\alpha S_2$ -casein and  $\beta$ -casein protein fractions from goat and sheep milk, which is not observed with cow milk [3,7]. Nevertheless, protein polymorphism is described as playing an essential role in the induction of different degrees of an allergic reaction [3,8].

Sheep's milk ice cream can be an excellent carrier of bioactive compounds, including probiotic cultures and prebiotic ingredients. The high protein level and fat in sheep's milk allows for the production of ice cream with a higher density, which translates into better protection of probiotic cells against oxygen access during ice cream storage and during passage through the gastrointestinal tract [9].

Probiotics added to food benefits by restoring the intestinal microflora balance [10–12] with a minimum number of live probiotic cells of  $10^6$ – $10^9$  cfu g<sup>-1</sup> is required for a therapeutic effect [13–15]. Probiotic bacteria used in ice cream production should be freeze-resistant and survive for a particular time at low temperatures [16–18]. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the most commonly used probiotic strains in food production [19,20]. Few studies show that probiotics in milk ice cream have better survival in the presence of inulin [21,22]. Inulin can be used as a replacement for fat and sugar, improving the viscosity of ice cream, thus affecting better overrun, resistance to melting and maintaining shape by stabilizing the foam [23] due to the ability to bind water and create a gel network, giving a feeling of smoothness and creaminess [24,25] in addition, it reduces the hardness of reduced-fat ice cream [26].

Recent studies indicate that prebiotic compounds may also increase the bioavailability of milk protein [27]. Simultaneous consumption of prebiotic ingredients that ferment into acetate, propionate, and butyrate stimulates the growth and development of probiotic bacteria [28]. Fruit fibers are gaining more and more recognition among consumers and are considered natural additives with a low degree of processing [29]. This group of prebiotics includes apple fiber, a natural fruit product containing protein, carbohydrates, polyphenols and pectins [30]. The addition of fiber to dairy products fits well with the “clean label” trend in the natural food market segment.

Sheep milk ice cream with the addition of prebiotics such as inulin and apple fiber, apart from the health benefits and properties stimulating the growth of probiotic bacteria, is an innovative product with functional properties. There are few publications on the production of ice cream from sheep’s milk with probiotic strains and prebiotics in the scientific literature. Therefore, the study aimed to determine the possibility of using Olkuska sheep milk for the production of ice cream with probiotics and prebiotics.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Raw morning and cooled (4 °C) sheep’s milk for the production of ice cream was purchased from the farm “Owczka Zagroda” (Wyżne, Podkarpacie, Poland) in June 2021. A flock of 35 Olkuska breed sheep were kept on the farm. Green fodder and hay with the addition of cereals (oats, barley and maize in a quantity of 0.5 kg/sheep/day) from the breeder’s farm were used for feeding animals. Milking was conducted by hand. Before ice cream manufacture, milk was filtrated to remove dirt and foreign particles.

The chemical composition of milk was determined in the chemical composition analyzer of milk and dairy products Bentley B-150 (Bentley, MN, USA).

The following materials were used to prepare the ice cream mixture: inulin (carbohydrate 97 g/100 g, including sugars 7 g/100 g, fiber 90 g/100 g, fat 0 g/100 g and protein 0 g/100 g; Orafit HP, Oreya, Belgium); apple fiber (carbohydrate 87 g/100 g, including sugars 27 g/100 g, fiber 51 g/100 g, fat 3.3 g/100 g and protein 5.1 g/100 g; Aura Herbals Jarosław Paul, Sopot, Poland) composed of 100% micronized apple fiber; white sugar (Polish sugar, Toruń, Poland); mango-passion fruit flavor essence (Browin, Łódź, Poland) with the composition: natural and identical to raw mango and passion fruit flavors, citric acid E330 and mango juice. Probiotic bacteria (Chr. Hansen, Hoersholm, Denmark) were used to produce the inoculum: *Lactocaseibacillus paracasei* L-26, *Lactocaseibacillus casei* 431 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

### 2.2. Manufacture of Ice Cream Mixes

Sheep’s milk (84.9%), sugar (11%) and flavor essence (0.1%) were mixed and then divided into two parts. Inulin (4%) was added to the first part of the blend and divided into three groups: CP, CC and CA. Inulin (2.5%) and apple fiber (1.5%) were added to the second part and analogously divided into three groups: CPF, CCF and CAF. The milk with additives was mixed and homogenized with a homogenizer (Nuoni GJJ-0.06/40, Zhejiang, China) at 60 °C with a pressure of 20 MPa, and then pasteurized at 85 °C, 1 min. After heat treatment, it was cooled to 37 °C.

The CP and CPF groups were inoculated with a monoculture *Lactocaseibacillus paracasei* L-26, the CC and CCF groups were inoculated with *Lactocaseibacillus casei* 431. The CA and CAF groups were inoculated with *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Each starter probiotic culture was previously inoculated in sheep’s milk at 40 °C for five hours. After five hours, 5% (w/w) of inoculum containing 9 log CFU of  $g^{-1}$  bacteria was added to the ice mixes. The fermentation process of the ice cream mixes was carried out in an incubator (Cooled Incubator ILW 115, POL-EKO-Aparatura, Wodzisław Śląski, Poland) at 37 °C for 10 h. After cooling to 5 °C, it was conditioned at the specified temperature for 12 h in an incubator and then froze in a DeLux 48816 freezer (UNOLD AG, Hockenheim, Germany) for 40–50 min

with a freezing temperature down to  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The prepared ice cream was packaged in 100 mL plastic cups and stored at  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  for twenty-one days.

The experiment was repeated on three occasions.

### 2.3. Physicochemical Analysis

The chemical composition of the ice cream mixes was determined using a Bentley B-150 Milk and Milk Product Analyzer (Bentley, MN, USA). The determination of the pH value was performed with a FiveEasy digital pH meter (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) with an electrode InLab<sup>®</sup>Solids Pro-ISM (Mettler Toledo, Switzerland) with an integrated temperature sensor. The content of lactic acid was determined ( $\text{g of lactic acid L}^{-1}$ ) by titration of samples of ice cream mixes and dissolved ice cream with 0.1 N NaOH (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) according to the method of Jemaa et al. [31]. The melting rate, first dropping time and total melting time was determined at an ambient temperature of  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ice cream samples were placed on a wire mesh grid (95 mm diameter, holes  $5 \times 5\text{ mm}$ , wire thickness 0.5 mm). Then the time until the ice cream wholly dissolved was recorded [32]. Ice cream overrun was estimated as the air volume ratio in frozen ice cream to the importance of melted ice cream expressed in % [33]. Five samples were tested for each ice cream variant, and it was repeated was repeated in triplicate.

### 2.4. Microbiological Analysis

The number of probiotic strains (*Lactocaseibacillus paracasei* L-26, *Lactocaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5) was determined in the ice mix, then immediately after freezing and on the 7th and 21st days of storage at  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 10 g of each sample was diluted in 90 mL of sterile peptone water solution (0.1%) (BTL Sp. z o.o., Łódź, Poland). Serial dilutions from  $1\text{ log CFU g}^{-1}$  to  $8\text{ log CFU g}^{-1}$  were made. The inoculation was performed by the plate-deep method using MRS agar (Biocorp, Warszawa, Poland) and incubated anaerobically in a vacuum desiccator at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 72 h using the GENbox anaer (Biomérieux, Warszawa, Poland). The cultured probiotic colonies were counted with a colony counter (TYPE J-3, Chemland, Stargard Szczeciński, Poland). The result was expressed as  $\text{log CFU g}^{-1}$ . Five samples were tested for each ice cream variant, and it was repeated was repeated in triplicate.

### 2.5. Color of Ice Cream

The color of the ice cream was measured with a precise colorimeter (model No. 145, Shenzhen, China) using the CIElab system. The following parameters were measured:  $L^*$ —brightness of ice cream (0—black, 100—white),  $a^*$  ( $- a^*$ —shades of green,  $+ a^*$ —shades of red) and  $b^*$  ( $- b^*$ —shades of blue,  $+ b^*$ —shades of yellow),  $C$ —color saturation and purity and  $h^{\circ}$  as a hue of color. Before analysis, the device was calibrated on a white and black reference standard [34,35]. Five samples were tested for each ice cream variant, and it was repeated was repeated in triplicate.

### 2.6. Organoleptic Analysis

Organoleptic assessment for six groups of ice cream was carried out by a trained team of 15. The samples of ice cream encoded (with a random three-digit code) were analyzed on a nine-point linear scale with marginal, structured markings. The left end of the scale indicated the following features: not very characteristic (appearance); soft (hardness); sandy (smooth); immediate (spreadability); dark (color); hardly perceptible (taste, smell) [36]. The right side of the scale defined the features: very distinctive (appearance), hard (hardness), very smooth (smooth); delayed (spreadability); light (color); very intense (distinguishing features of taste and smell). After analyzing the tested ice cream sample, the panelists were asked to rinse their mouths with water to avoid a cold transfer effect [37].

### 2.7. Statistical Analysis

The mean and standard deviation were calculated using Statistica v. 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). One, two and three-way ANOVA was performed. The significance of differences between the mean values was verified with the Turkey test ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

The chemical composition of sheep milk was: fat  $6.56 \pm 0.5\%$ , protein  $4.60 \pm 0.3\%$  and lactose  $5.04 \pm 0.10\%$ , and was similar to the results obtained by Musial et al. [2]. Olokuska sheep milk was only characterized by a higher lactose content.

### 3.1. Chemical Composition of Ice Cream Mixes

The chemical composition of the ice cream mixes fermented by various strains of probiotic bacteria is presented in Table 1.

**Table 1.** Chemical composition of ice cream mixes samples after fermentation.

Chemical Composition	CP	CPF	CC	CCF	CA	CAF
Protein, %	$3.69^a \pm 0.08$	$3.71^a \pm 0.05$	$3.68^a \pm 0.03$	$3.72^a \pm 0.01$	$3.70^a \pm 0.02$	$3.75^a \pm 0.08$
Fat, %	$6.36^a \pm 0.21$	$6.41^a \pm 0.04$	$6.38^a \pm 0.02$	$6.46^a \pm 0.10$	$6.42^a \pm 0.10$	$6.38^a \pm 0.02$
Carbohydrates, %	$18.45^a \pm 0.06$	$18.48^a \pm 0.07$	$18.43^a \pm 0.02$	$18.45^a \pm 0.02$	$18.48^a \pm 0.11$	$18.50^a \pm 0.11$

Mean  $\pm$  standard deviation; n (for each trial) = 5; <sup>a</sup>—mean marked with the same letter do not differ at  $p \leq 0.05$ . CP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26, CPF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. paracasei* L-26, CC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431, CCF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. casei* 431, CA: sample with 4% inulin and *Lb. acidophilus* LA-5 and CAF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. acidophilus* LA-5.

The ice cream mixes contained 3.68–3.75% protein, 6.36–6.46% fat and 18.43–18.50% carbohydrates. The ice cream mixes did not differ significantly in terms of protein, fat and carbohydrate content. Partial replacement of inulin with apple fiber and fermentation of ice cream mixes with different probiotic strains do not significantly differentiate their chemical composition. Similar content of protein (3.39%) and carbohydrates (18.39%) in the control milk ice cream was demonstrated by Ismail et al. [38]. Moreover, Balthazar et al. [39] developed and tested sheep's milk ice cream with a higher fat content (10.03%) and lower protein content (3.2%).

Table 2 shows the moisture results of ice cream after 7 and 21 days of ice cream storage. There were no significant differences in moisture between individual ice cream groups and during storage, which was confirmed by the 3-factor ANOVA (Table 3). These results are in line with the studies by Abdelazez et al. [40] and Ranadheera et al. [41], who showed that the moisture of frozen products does not change significantly during freezer storage.

Table 2 shows the pH values determined before and after the fermentation of the ice mixes. As expected, the 1.5% addition of apple fiber lowered the pH value of ice cream mixes by about 0.2 units before fermentation. The optimal pH for *Lactobacillus* and *Lactocaseibacillus* growth is 5.5–6.0 [42]. The addition of apple fiber favorably reduced the pH value to 6.1, creating conditions similar to the optimal ones for fermentation than in mixtures with inulin only. Reducing the pH value of ice cream with apple fiber might be due to the presence of organic acids. Apple fiber obtained from apple pomace contains organic acids (0.6–0.9%) such as malic, quinic, citric and shikimic acids as well as sugars (7%), fiber (5–6%), trace amounts of protein as well as microelements: calcium, magnesium, iron and potassium [43,44].

**Table 2.** Lactic acid content, pH value and moisture of ice cream mixes and ice creams during storage.

Properties	Storage Time (Days)	CP	CPF	CC	CCF	CA	CAF
Moisture, %	7	71.79 <sup>Aa</sup> ± 0.19	71.98 <sup>Aa</sup> ± 0.23	71.53 <sup>Aa</sup> ± 0.44	71.55 <sup>Aa</sup> ± 0.13	71.61 <sup>Aa</sup> ± 0.23	71.65 <sup>Aa</sup> ± 0.20
	21	71.73 <sup>Aa</sup> ± 0.11	71.82 <sup>Aa</sup> ± 0.04	71.51 <sup>Aa</sup> ± 0.43	71.63 <sup>Aa</sup> ± 0.06	71.68 <sup>Aa</sup> ± 0.17	71.74 <sup>Aa</sup> ± 0.36
pH	0	6.47 <sup>Cd</sup> ± 0.01	6.18 <sup>Cb</sup> ± 0.01	6.38 <sup>Cc</sup> ± 0.01	6.13 <sup>Da</sup> ± 0.01	6.37 <sup>Bc</sup> ± 0.01	6.14 <sup>Ca</sup> ± 0.01
	1	4.42 <sup>Ac</sup> ± 0.00	4.19 <sup>Aa</sup> ± 0.01	4.55 <sup>Ad</sup> ± 0.01	4.35 <sup>Ab</sup> ± 0.00	5.29 <sup>Af</sup> ± 0.01	4.83 <sup>Ae</sup> ± 0.02
	7	4.49 <sup>Ba</sup> ± 0.03	4.34 <sup>Ba</sup> ± 0.06	4.58 <sup>ABb</sup> ± 0.04	4.51 <sup>Cb</sup> ± 0.06	5.31 <sup>Ad</sup> ± 0.01	4.88 <sup>ABc</sup> ± 0.06
	21	4.51 <sup>Bc</sup> ± 0.01	4.31 <sup>Ba</sup> ± 0.01	4.59 <sup>Bd</sup> ± 0.01	4.44 <sup>Bb</sup> ± 0.00	5.29 <sup>Af</sup> ± 0.01	4.88 <sup>Be</sup> ± 0.01
Lactic acid, g L <sup>-1</sup>	1	0.77 <sup>Ad</sup> ± 0.01	0.97 <sup>Bf</sup> ± 0.00	0.63 <sup>Ab</sup> ± 0.01	0.85 <sup>Be</sup> ± 0.01	0.48 <sup>Aa</sup> ± 0.01	0.70 <sup>Ac</sup> ± 0.00
	7	0.79 <sup>Ad</sup> ± 0.00	0.92 <sup>Af</sup> ± 0.10	0.74 <sup>Bc</sup> ± 0.01	0.83 <sup>Ae</sup> ± 0.00	0.50 <sup>Aa</sup> ± 0.01	0.69 <sup>Ab</sup> ± 0.02
	21	0.78 <sup>Ac</sup> ± 0.04	0.89 <sup>Ae</sup> ± 0.12	0.74 <sup>Bc</sup> ± 0.01	0.82 <sup>Ad</sup> ± 0.01	0.51 <sup>Aa</sup> ± 0.02	0.69 <sup>Ab</sup> ± 0.02

Mean ± standard deviation; n (for each trial storage time) = 5; <sup>a,b,c,d,e,f</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; <sup>A,B,C,D</sup>—mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). CP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26, CPF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. paracasei* L-26, CC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431, CCF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. casei* 431, CA: sample with 4% inulin and *Lb. acidophilus* LA-5 and CAF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. acidophilus* LA-5. Storage time: 0—ice cream mixes before fermentation, 1—ice cream mixes after fermentation, 7—ice cream after 7 days and 21—ice cream after 21 days.

**Table 3.** Analysis of variance (ANOVA)  $p$ -values on the effects of storage time and type of bacteria and fiber on color, pH, lactic acid, overrun, bacteria appearance, hardness, smoothness, sweet taste, additives taste, off taste, odor additives and off odor of ice cream.

Properties	Type of Bacteria $p$ -Values	Storage Time (Days) $p$ -Values	Fiber $p$ -Values	Type of Bacteria × Storage Time $p$ -Values	Type of Bacteria × Fiber $p$ -Values	Storage Time × Fiber $p$ -Values	Type of Bacteria × Storage Time × Fiber $p$ -Values
L*	↑0.0003	↑0.0013	↑0.0000	↑0.0002	↑0.0023	↑0.0409	↑0.0429
a*	↑0.0042	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0011	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0087
b*	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0229	↑0.0095
C*	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0050	↑0.0126
h*	↑0.0000	↑0.0445	↑0.0000	↑0.0192	↑0.0000	↑0.0210	↑0.0013
pH	↑0.0000	↑0.0092	↑0.0000	n.s. 0.5101	↑0.0000	n.s. 0.1481	n.s. 0.1938
Lactic acid	↑0.0000	↑0.0197	↑0.0000	n.s. 0.1708	↑0.0000	n.s. 0.3194	n.s. 0.7370
Moisture	n.s. 0.1445	n.s. 0.9054	n.s. 0.1250	n.s. 0.7038	n.s. 0.5281	n.s. 0.1147	n.s. 0.8499
Overrun	↑0.0000	↑0.0400	↑0.0000	↑0.0201	↑0.0000	↑0.0300	↑0.0050
First drop	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000	↑0.0000
Complete melting times	↑0.0012	↑0.0421	↑0.0000	↑0.0357	↑0.0000	↑0.0190	↑0.0038
Bacteria	↑0.0000	↑0.0467	↑0.0020	↑0.0148	↑0.0018	↑0.0075	↑0.0477
Appearance	n.s. 0.2095	n.s. 0.8393	↑0.0161	n.s. 0.4821	n.s. 0.8393	n.s. 0.3936	n.s. 0.7393
Hardness	n.s. 0.7721	n.s. 0.7320	n.s. 0.0752	n.s. 0.6358	n.s. 0.4151	n.s. 0.4705	n.s. 0.9648
Smoothness	n.s. 0.6102	n.s. 0.0538	↑0.0000	n.s. 0.8722	n.s. 0.5308	n.s. 0.2277	n.s. 0.8627
Sweet taste	n.s. 0.1617	n.s. 0.4032	n.s. 0.1286	n.s. 0.7476	n.s. 0.7831	n.s. 0.8888	n.s. 0.9072
Additives taste	n.s. 0.8766	n.s. 0.0532	n.s. 0.7218	n.s. 0.9038	n.s. 0.8437	n.s. 0.9432	n.s. 0.9537
Off taste	n.s. 0.1329	n.s. 0.7729	n.s. 0.1532	n.s. 0.9193	n.s. 0.1329	n.s. 0.7729	n.s. 0.9193
Odor additives	n.s. 0.8592	n.s. 0.4555	n.s. 0.5052	n.s. 0.9013	n.s. 0.9305	n.s. 0.1462	n.s. 0.9305
Off odor	n.s. 0.5317	n.s. 0.4276	n.s. 0.4276	n.s. 0.5327	n.s. 0.5317	n.s. 0.4276	n.s. 0.5317

Storage time (days) = interaction↑; Type of bacteria × fiber = interaction↑; Storage time × fiber = interaction ↑; Type of bacteria × storage time × fiber = interaction↑; indicates significant effect  $p < 0.05$ ; n.s.—no significant effect ↑.

As in our study, in the study by Favaro-Trindade et al. [45], the addition of acerola pulp reduced the pH value. In our research, after fermentation, the lower pH value of mixtures with apple fiber (CPF, CCF and CAF) was maintained compared to their counterparts only with inulin (CP, CC and CA). It was shown that using the same fermentation conditions for all mixes, the pH value decreased the most in the fermentation in CP mixtures fermented with *L. paracasei*. Most likely, it results from the specificity of *L. paracasei* because this strain, unlike *L. casei*, ferments lactose to produce L (+) lactic acid, and about 50% of cells also can ferment inulin [46].

Significantly higher pH values were obtained in Lb-fermented CC mixtures. *L. casei* and CA from *Lb. acidophilus* (Table 2). The decrease in the pH value of the mixtures results from the metabolic activity of probiotics in the ice cream mix and the inclusion of prebiotic preparations, i.e., apple fiber. A 3-factor analysis of variance showed that the

type of probiotic bacteria significantly affected the pH value and lactic acid content in ice cream (Table 3). In the studies of Soukoulis et al. [47], the pH value of fermented and non-fermented ice cream was between 4.5 and 6.3. In studies by Akca and Akpınar [48], probiotic milk ice cream with the addition of *Lactocaseibacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 was characterized by a pH value of 5.18–5.54 during 90 days of storage. The authors noted the lowest pH value in ice cream with powdered grape seed pulp with prebiotic properties.

In our research, an inverse relationship with the pH value was found for lactic acid content in ice cream mixes and ice cream. In ice cream mixes and ice cream with apple fiber, the lactic acid content was higher by 0.1–0.2 g L<sup>-1</sup> than in their equivalents with inulin only. These differences persisted during the storage of the ice cream. The lowest content of lactic acid after fermentation was determined in the CA ice cream mix fermented by *Lb. acidophilus*.

The highest amount of lactic acid was found in the mixture of CPF with apple fiber fermented by *L. paracasei*. The analysis of variance shows that lactic acid content is significantly influenced by single factors (bacterial type, storage time or fiber) and interactions between bacterial type and storage time. However, the combined effect of these three factors on the lactic acid content turned out to be insignificant.

Similar results were obtained by Ismail et al. [38] in ice cream enriched with pomegranate peel powder and Abd El-Rashid and Hassan [49], who used Doum palm fruit to make ice cream. According to Farias et al. [50], ice cream's pH value and acidity do not change during the storage period, regardless of whether they have been fermented or not. As in the studies by Farias et al. [50], our results indicate that extending the storage time from 7 to 21 days does not increase the lactic acid content.

The pH value and acidity of probiotic products can significantly affect the survival of probiotic bacteria cells in fermented ice cream. The addition of growth promoters and prebiotics such as inulin has been shown in many studies to significantly improve the viability of probiotic organisms [51]. Akin et al. [52] studied ice cream containing probiotic bacteria (*Lb. acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*), and their results suggest that the addition of inulin stimulates growth *Lb. acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*, which improved their survival. Therefore, partial replacement of inulin with apple fiber in our research might also contribute to the differentiation of growth and survival of probiotic bacteria cells.

### 3.2. Microbiological Analysis of Ice Cream

The number of bacterial cells in the mixes and ice cream depending on the type of bacteria, storage time and the addition of apple fiber is presented in Table 4.

After fermentation of the ice cream mixes, bacteria cells ranged from 10.62 log cfu g<sup>-1</sup> to 12.25 log cfu g<sup>-1</sup>. The addition of apple fiber did not significantly affect the growth of *L. paracasei* in the CPF ice cream mix compared to CP. In turn, this addition contributed to an increase in the number of *Lb. acidophilus* cells by approximately one log cfu g<sup>-1</sup> in CAF mixtures with apple fiber compared to the CAF mixture with inulin only. It should be mentioned that *Lb. acidophilus*, especially, has a high cytoplasmic buffering capacity (pH 3.72–7.74), which allows it to resist cytoplasmic pH changes and obtain stability under acidic conditions [53,54]. According to Talwalkar and Kailasapathy [55] and Haynes and Playne [56], and Takahashi et al. [57], this stability is influenced by the enzyme H<sup>+</sup>-ATPase.

**Table 4.** Viable counts of probiotic bacteria in ice creams and ice creams mixture (log cfu g<sup>-1</sup>).

Storage Time	CP	CPF	CC	CCF	CA	CAF
1	11.99 <sup>Cc</sup> ± 0.80	12.08 <sup>Cc</sup> ± 0.80	12.25 <sup>Cd</sup> ± 0.10	12.07 <sup>Cc</sup> ± 0.72	10.64 <sup>Ca</sup> ± 0.69	11.62 <sup>Cb</sup> ± 0.79
2	10.99 <sup>Bbc</sup> ± 0.85	11.19 <sup>Bd</sup> ± 0.88	11.17 <sup>Bd</sup> ± 0.14	11.05 <sup>Bc</sup> ± 0.77	9.80 <sup>Ba</sup> ± 0.75	10.74 <sup>Bb</sup> ± 0.83
7	10.18 <sup>Ac</sup> ± 0.85	10.20 <sup>Ac</sup> ± 0.87	9.97 <sup>Ab</sup> ± 0.81	9.85 <sup>Ab</sup> ± 0.81	8.86 <sup>Aa</sup> ± 0.72	9.74 <sup>Ab</sup> ± 0.61
21	10.18 <sup>Ac</sup> ± 0.80	10.17 <sup>Ac</sup> ± 0.86	9.88 <sup>Ab</sup> ± 0.76	9.85 <sup>Ab</sup> ± 0.77	8.83 <sup>Aa</sup> ± 0.72	9.68 <sup>Ab</sup> ± 0.76

Mean ± standard deviation; n (for each trial storage time) = 5; <sup>a,b,c,d</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B,C</sup>—mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). CP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26, CPF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. paracasei* L-26, CC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431, CCF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. casei* 431, CA: sample with 4% inulin and *Lb. acidophilus* LA-5 and CAF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. acidophilus* LA-5. Storage time: 1—after fermentation, 2—directly after freezing, 7—after 7 days and 21—after 21 days.

In this study, the highest number of bacterial cells was determined in the CC-fermented mixture with *L. casei* with inulin. However, the addition of apple fiber resulted in a reduction in the number of cells by about 1 log CFU g<sup>-1</sup> in the CCF mixture. These studies indicate that a vital problem is selecting probiotic bacteria for the fermentation of sheep's milk mixtures because partial replacement of inulin with apple fiber changed the fermentation conditions (e.g., pH value) and differentiated the number of probiotic cells after fermentation.

The resistance of probiotics to freezing damage varies among probiotic strains. Microorganisms that show a better ability to survive under freezing conditions can dehydrate without rupturing the cytoplasmic membranes. Such cells can reduce the number and growth of intracellular ice crystals and thus reduce the heat transfer of their cells; both factors minimize microbial cell damage [58].

In our research, the freezing process reduced the population of probiotic bacteria cells in all ice cream groups. After freezing, significant cell count reductions were observed by 0.8 log cfu g<sup>-1</sup> in CA ice cream, 1.0 log cfu g<sup>-1</sup> in CP ice cream and 1.1 log cfu g<sup>-1</sup> in CC ice cream with inulin. This means that the survival rate of bacteria when freezing sheep's milk ice cream mixes depends on the probiotic strain. *Lb. acidophilus* showed the best survival and the lowest reduction of the population after freezing. However, it should be added that this strain multiplied the least when fermenting the CA mix, which resulted in the lowest number of *Lb. acidophilus* cells in CA after fermentation. This is essential information for ice cream producers because fermentation should be extended in industrial production or the starter dose of bacteria increased to obtain a more significant number of *Lb. acidophilus* cells. These treatments are needed to obtain a comparable number of bacterial cells to those obtained in Lb mixtures: *L. paracasei* and *L. casei*.

Freezing mixtures with the addition of apple fiber also resulted in a reduction of viable bacterial cells from 0.8 log CFU g<sup>-1</sup> in CPF and CAF to 1 log cfu g<sup>-1</sup> in CCF, compared to the results after fermentation. This means that the reduction in the probiotic population in apple fiber ice cream due to freezing is similar to their inulin counterparts in CCF and CAF ice cream and less only in CPF ice cream. Additionally to the damage caused by probiotic cell freezing, the inclusion of oxygen in the mixture (aeration process) could result in an additional reduction in the number of viable probiotic bacteria cells since the oxygen content, and the redox potential (which is directly proportional to the amount of oxygen) is essential. Most of the probiotic *Lactobacillus* and *Lacticaseibacillus* strains are organisms derived from the intestines with microaerophilic or anaerobic metabolism. Therefore, molecular oxygen and high redox potential values are critical factors for these bacteria [53,59,60].

After seven days of freezing storage at -22 °C, the viability of the probiotics in all ice cream groups decreased, and the population was reduced by another 0.8–1.2 log cfu g<sup>-1</sup> compared to the number of bacterial cells after freezing. The most intense reduction in the log cycle (1.2 log cfu g<sup>-1</sup>) was found in CC and CCF ice cream with *L. casei* compared to the number of cells determined after freezing. The highest survival after seven days of

ice cream storage was characterized by *L. paracasei*, where the reduction in the number of bacterial cells was only 0.8 log cfu g<sup>-1</sup> in CP ice cream and 0.9 log cfu g<sup>-1</sup> in CPF ice cream with apple fiber, compared to the number of cells determined after freezing.

In our study, extending the storage time of ice cream from 7 to 21 days did not significantly affect the number of bacterial cells in all ice cream groups. After seven days and 21 days of ice cream storage, the lowest number of bacterial cells was determined in CA and CAF ice cream. After 21 days, the CAF ice cream showed a population reduction of only 0.1 log CFU g<sup>-1</sup> compared to the 7th day of storage. In contrast, probiotic ice cream stored at -20 °C for 90 days, tested by Turgut and Cakmakci [61], showed a reduction in the number of cells of *Lb. acidophilus* with 0.38 log CFU g<sup>-1</sup> at this time. Furthermore, in the study by Salem et al. [62], the number of live probiotics in ice cream decreased by 2.23, 1.68, 1.54, 1.23 and 1.77 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively, for *Lb. acidophilus*, *B. bifidum*, *Lb. reuteri*, *Lb. gasseri* and *Lb. rhamnosus* within 12 weeks of frozen storage (-26 °C).

The highest number of bacterial cells after 21 days of ice cream storage was determined in CP and CPF ice cream (Table 4). *L. paracasei* was characterized by the best survival rate, which predisposes it to be used to produce probiotic ice cream from sheep's milk. The conducted 3-factor ANOVA confirms that the survival and the number of probiotic bacteria cells are significantly influenced by all tested factors (type of bacteria, storage time and fiber) and their interactions.

After 21 days of storing ice cream, the number of bacterial cells in each group of ice cream exceeded 8 log cfu g<sup>-1</sup>, which means that the ice cream can be classified as a probiotic food [63,64]. According to Nezhad et al. [65], and at a concentration of 6–7 log cfu g<sup>-1</sup>, the daily therapeutic dose of probiotics is about 8–9 log cfu g<sup>-1</sup> to compensate for losses during the digestive process. In our research, all ice cream groups meet these recommendations for 21 days of storage.

### 3.3. Physical Analysis of Ice Cream

Detailed analysis of the influence of the bacteria used for fermentation on the aeration of ice cream (Table 5) shows the highest percentage of overrun in the ice cream with *L. paracasei* and *Lb. acidophilus*. *L. casei* ice cream was characterized by significantly lower overrun on the 7th and 21st days of storage. Although the *L. paracasei* ice cream had the greatest overrun, it did not cause a significant reduction in the probiotic population during storage.

**Table 5.** Overrun, first dropping time, and total melting rate of ice cream in 7 and 21 days of storage.

Properties	Storage Time (Days)	CP	CPF	CC	CCF	CA	CAF
Overrun, %	7	50.55 <sup>Ac</sup> ± 0.92	69.90 <sup>Ae</sup> ± 0.20	23.35 <sup>Aa</sup> ± 0.92	32.55 <sup>Ab</sup> ± 1.91	49.10 <sup>Ac</sup> ± 0.28	65.76 <sup>Ad</sup> ± 0.20
	21	52.67 <sup>Ac</sup> ± 0.47	69.46 <sup>Ad</sup> ± 0.65	22.70 <sup>Aa</sup> ± 0.42	35.79 <sup>Bb</sup> ± 0.76	52.34 <sup>Bc</sup> ± 1.00	69.95 <sup>Bd</sup> ± 0.06
First drop, s	7	957 <sup>Bc</sup> ± 7.78	719 <sup>Bb</sup> ± 8.38	1580 <sup>Bd</sup> ± 4.04	977 <sup>Bc</sup> ± 8.82	954 <sup>Bc</sup> ± 8.49	647 <sup>Ba</sup> ± 7.07
	21	900 <sup>Ad</sup> ± 8.79	626 <sup>Ab</sup> ± 5.36	1449 <sup>Af</sup> ± 4.75	949 <sup>Ae</sup> ± 9.90	886 <sup>Ac</sup> ± 9.19	577 <sup>Aa</sup> ± 7.78
Complete melting times, s	7	5566 <sup>Ab</sup> ± 48.08	5078 <sup>Aa</sup> ± 60.10	7381 <sup>Bd</sup> ± 58.69	6175 <sup>Bc</sup> ± 49.50	6280 <sup>Bc</sup> ± 57.28	5565 <sup>Ab</sup> ± 79.20
	21	5543 <sup>Ac</sup> ± 35.16	5073 <sup>Aa</sup> ± 22.33	6978 <sup>Af</sup> ± 31.11	6014 <sup>Ad</sup> ± 15.86	6171 <sup>Ae</sup> ± 20.31	5477 <sup>Ab</sup> ± 29.50

Mean ± standard deviation; n (for each trial storage time) = 5; <sup>a,b,c,d,e,f</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). CP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26, CPF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. paracasei* L-26, CC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431, CCF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. casei* 431, CA: sample with 4% inulin and *Lb. acidophilus* LA-5 and CAF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. acidophilus* LA-5. Storage time: 7—ice cream after 7 days and 21—ice cream after 21 days.

The literature reports that grape, peach and apple pomace is valuable source of pectin, especially pectin with many methoxylated groups, which have favorable gelling properties [66]. This type of pectin also improves the aeration ability, which is also confirmed by our research results.

According to Feizi et al. [67], aeration decreases with the increasing addition of chia seed lyophilisate. The authors attribute less aeration of ice cream with a higher chia lyophilisate to the rheological properties of the mixes. Increasing the viscosity of the mixtures reduces the speed of whipping, although a certain level of density is necessary for optimal whipping and air retention. In a similar study, the aeration of ice cream for samples containing basil lyophilisate (0.1 and 0.2% *w/w*) was 46.5% and 42.5%, respectively [68].

According to Soukoulis et al. [69], prebiotics affects the incorporation of air and stabilize the foam by increasing the viscosity of the water phase (increasing the concentration of solute and gelling) surrounding the surface between air cells, raising the physical barrier against destabilization of air cells. Numerous ice cream studies have shown that inulin, oligofructose or resistant starch significantly improve air incorporation (aeration) and related properties such as melt resistance and shape retention [23,70]. The melting rate is influenced by many factors, including the chemical composition, the amount of air introduced, the size of the ice crystals, and the structure of the fatty globules formed during freezing [71].

Table 5 shows the first dropping time and total melting rate ice cream tests after 7 and 21 days of storage. It is generally known that the melting rate of ice cream correlates with its aeration [72]. Therefore, the CC ice cream with the lowest overrun had the longest first drop and total melting times. The high melting rate of ice cream with high overrun was probably due to poor air cell stability, air cell size distribution and a network of fat globules formed during freezing. Air, fat globules and ice are the main microstructural components of ice cream and significantly influence the melting or dripping behavior [73,74].

It should be added that the time of the first drop after seven days of storage in the freezer differed significantly depending on the type of bacteria used to ferment the mixture and the addition of apple fiber. The ice cream fermented with *L. casei* had a longer first drop time than that of *L. paracasei* and *Lb. acidophilus*. Extending the storage time from 7 to 21 days significantly reduced the first drop time in all ice cream groups by 57 s in CP, 93 s in CPF, 131 s in CC, 28 s in CCF and 68 s in CA 70 s in CAF. Furthermore, in a study by Bahram-Parvar et al. [71], the melting rate of ice cream increased with increasing shelf life, which may be due to an increase in ice crystal size due to ice recrystallization. Guven et al. [75] found that the addition of various combinations of selected hydrocolloids, such as salep, firewood flour, guar gum and sodium alginate, significantly changes the first drop's time.

The conducted research shows that the addition of apple fiber significantly shortens the total melting time. It is most likely related to the properties of apple fiber resulting from a lower water retention capacity than inulin. Inulin is a hygroscopic substance; it reacts with water molecules limiting their free movement and stabilizing the ice mixture, reducing meltability [76]. According to Syed et al. [76], the higher content of water-soluble compounds, i.e., inulin and apple fiber, resulted in the enrichment of the liquid phase. Thus, the freezing point was moderately lowered, and the percentage of water in frozen form also decreased, resulting in a lower melting point.

Several researchers have reported conflicting results about the effects of inulin on the melting properties of ice cream. Akbari et al. [26] and Akalin et al. [77] found that low-fat ice cream with different levels of inulin (up to 4%) showed significantly worse melting parameters compared to the control ice cream (no inulin with 10% fat content). In contrast, El-Nagar et al. [78] observed that incorporating inulin into yogurt ice cream mixes resulted in a reduction of the melting time. Akalin and Erisir [79] also indicated that using both inulin and oligofructose in ice cream improves the melting properties of ice cream with a 4% fat content. Akin et al. [52] confirmed that adding inulin delays the melting of ice cream because inulin can act as a stabilizer by binding water molecules.

However, the presence of pectin in apple fiber may also contribute to the cryopreservation of ice cream by controlling the mobility of water molecules in the non-frozen aqueous phase due to its thermodynamic incompatibility with the current separation phase proteins [25]. Goh et al. [80] report that protein–protein and protein–polysaccharide at the

interface with fat globule/air cell and dispersed components in the serum phase can also influence melting properties [67].

In our study, the difference in total melting time was most significant in the *L. casei* ice cream, where the melting time was 1206 s shorter in the CCF ice cream with apple fiber compared to the CCF ice cream with inulin. On the other hand, CP and CPF ice cream fermented with *L. paracasei* had a significantly lower total melting time. In these ice cream, the addition of apple fiber reduced the total melting time by 488 s compared to CP ice cream with inulin only. Extending the shelf life from 7 to 21 days significantly reduced the total melting time only in *L. casei*-fermented ice cream (CC and CCF) and *Lb. acidophilus* (CA and CAF). However, in ice cream with *L. paracasei*, the storage time did not significantly affect the total melting time.

### 3.4. Color Parameters of Ice Cream

The results describing the color parameters of ice cream and ice cream mixes are presented in Table 6.

**Table 6.** Color parameters of ice cream sample in the ice cream mixture during storage.

Color	Storage Time (Days)	CP	CPF	CC	CCF	CA	CAF
L*	1	83.36 <sup>Ae</sup> ± 0.65	66.72 <sup>Aa</sup> ± 0.86	81.97 <sup>Ad</sup> ± 0.94	68.38 <sup>Ab</sup> ± 0.35	82.43 <sup>Ade</sup> ± 0.62	69.22 <sup>Ac</sup> ± 0.56
	7	83.67 <sup>Ad</sup> ± 0.09	71.48 <sup>Bb</sup> ± 0.25	82.64 <sup>Ac</sup> ± 0.07	69.81 <sup>Aa</sup> ± 0.62	82.62 <sup>Ac</sup> ± 0.03	71.40 <sup>Bb</sup> ± 0.83
	21	84.86 <sup>Ac</sup> ± 0.85	77.20 <sup>Ca</sup> ± 0.15	83.31 <sup>Ac</sup> ± 0.79	69.83 <sup>Ab</sup> ± 1.84	87.37 <sup>Bd</sup> ± 0.10	76.43 <sup>Ca</sup> ± 1.17
a*	1	−1.88 <sup>Aa</sup> ± 0.12	3.57 <sup>Ad</sup> ± 0.18	−1.06 <sup>Bc</sup> ± 0.05	4.40 <sup>Ae</sup> ± 0.21	−1.23 <sup>Ab</sup> ± 0.06	3.41 <sup>Ad</sup> ± 0.21
	7	−2.09 <sup>Bb</sup> ± 0.04	3.94 <sup>Bc</sup> ± 0.09	−1.28 <sup>Ab</sup> ± 0.01	4.54 <sup>Ad</sup> ± 0.15	−1.25 <sup>Ab</sup> ± 0.02	3.88 <sup>Ac</sup> ± 0.33
	21	−2.08 <sup>Ba</sup> ± 0.02	4.74 <sup>Cc</sup> ± 0.05	−1.29 <sup>Ab</sup> ± 0.05	5.32 <sup>Bd</sup> ± 0.08	−1.41 <sup>Ab</sup> ± 0.20	4.92 <sup>Bc</sup> ± 0.13
b*	1	16.49 <sup>Ac</sup> ± 0.44	19.43 <sup>Ad</sup> ± 0.43	14.98 <sup>Ab</sup> ± 0.42	20.18 <sup>Ae</sup> ± 0.57	14.40 <sup>Aa</sup> ± 0.08	21.87 <sup>Af</sup> ± 0.28
	7	19.72 <sup>Bb</sup> ± 0.26	20.11 <sup>Bc</sup> ± 0.21	15.06 <sup>Ba</sup> ± 0.04	20.73 <sup>Ac</sup> ± 0.33	15.02 <sup>Ba</sup> ± 0.05	22.07 <sup>Ad</sup> ± 0.42
	21	20.69 <sup>Bb</sup> ± 0.60	22.01 <sup>Cc</sup> ± 0.09	15.79 <sup>Ca</sup> ± 0.54	22.82 <sup>Bc</sup> ± 0.30	15.06 <sup>Ba</sup> ± 0.41	22.95 <sup>Bc</sup> ± 0.33
C*	1	16.63 <sup>Ab</sup> ± 0.44	19.83 <sup>Ac</sup> ± 0.42	14.04 <sup>Aa</sup> ± 0.41	20.07 <sup>Ac</sup> ± 0.59	14.45 <sup>Aa</sup> ± 0.08	21.43 <sup>Ad</sup> ± 0.21
	7	19.87 <sup>Bc</sup> ± 0.06	20.61 <sup>Bd</sup> ± 0.06	16.12 <sup>Bb</sup> ± 0.04	20.14 <sup>Acd</sup> ± 0.44	14.97 <sup>Ba</sup> ± 0.04	21.37 <sup>Be</sup> ± 0.07
	21	20.82 <sup>Cc</sup> ± 0.59	23.63 <sup>Ce</sup> ± 0.10	16.85 <sup>Cb</sup> ± 0.54	22.60 <sup>Bd</sup> ± 0.31	15.13 <sup>Ba</sup> ± 0.41	22.61 <sup>Bd</sup> ± 0.35
h*	1	91.61 <sup>Ae</sup> ± 0.62	75.07 <sup>Ab</sup> ± 0.57	92.09 <sup>Ae</sup> ± 0.50	74.52 <sup>Ba</sup> ± 0.51	89.90 <sup>Ad</sup> ± 0.24	76.18 <sup>Ac</sup> ± 0.61
	7	90.45 <sup>Ad</sup> ± 0.53	74.39 <sup>Aa</sup> ± 0.54	92.06 <sup>Ae</sup> ± 0.25	74.32 <sup>Aba</sup> ± 0.97	89.68 <sup>Ac</sup> ± 0.17	76.89 <sup>Ab</sup> ± 0.72
	21	90.55 <sup>Ae</sup> ± 0.30	74.26 <sup>Ab</sup> ± 0.12	92.36 <sup>Af</sup> ± 0.13	73.39 <sup>Aa</sup> ± 0.09	89.37 <sup>Ad</sup> ± 0.71	76.67 <sup>Ac</sup> ± 0.22

Mean ± standard deviation; n (for each trial storage time) = 5; <sup>a,b,c,d,e,f</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B,C</sup>—mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). CP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26, CPF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. paracasei* L-26, CC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431, CCF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. casei* 431, CA: sample with 4% inulin and *Lb. acidophilus* LA-5 and CAF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. acidophilus* LA-5. Storage time: 1—after fermentation, 7—after 7 days and 21—after 21 days.

The brightest was the CP mixes fermented with *L. paracasei*, while the slightly darker CC mixes fermented with *L. casei* and CA with *Lb. acidophilus*. Partial replacement of inulin with 1.5% of apple fiber resulted in a significant darkening of the color of ice cream mixes. Depending on the type of bacterial mixtures used for fermentation, the addition of apple fiber increased the value of the L\* parameter from 13.2 to 16.6.

After seven days of freezing storage in CPF and CAF ice cream, the L\* brightness of the ice cream increased compared to the blends. The remaining ice cream (CP, CC, CA and CCF) also tended to increase the brightness of the ice cream, but the differences were not significant. This color change in ice cream samples was due to ice crystals and air bubbles inside the ice cream formed during whipping during freezing [81].

According to Nozière et al. [82], inulin molecules interact with casein micelles, which together with fat globules are responsible for light scattering and, consequently, for a high

L\* value. Extending the storage time to 21 days also increased the L\* parameter in all ice cream groups. Higher L\* values indicate a brighter, more white color of the ice cream.

The a\* (+ a—redness, – a—green) parameter in CP, CC and CA ice cream mixes and ice cream with inulin only took negative values, while CPF, CCF and CAF mixes and ice cream with apple fiber-positive values. This means that in ice cream mixes and ice cream with inulin only (CP, CC and CA), a greater proportion of green color was observed, while in mixes and ice cream with apple fiber (CPF, CCF and CAF), the red color was dominant. After the 7th day of storage, the proportion of green color in ice cream with inulin (CP, CC and CA) increased compared to the a\* parameter determined in ice cream mixes (CP, CC and CA). Moreover, in the ice cream with apple fiber, an intensification of the red color was observed compared to the a\* value determined in the mixes (CPF, CCF and CAF).

Extending the storage time of ice cream with apple fiber from 7 to 21 days increased the proportion of red color. The analyzed ice cream mixes and ice cream with inulin and apple fiber were characterized by a high ratio of yellow (+ b\*). The minor balance of yellow was found in the CA ice cream mix fermented by *Lb. acidophilus*. On the other hand, the most yellow CP mixes and ice cream fermented by *L. paracasei*. This effect is confirmed by the studies of Acevedo-Martinez et al. [83], which inform that the type of probiotic bacteria and the 5% addition of fructo-oligosaccharides may significantly impact the color of the analyzed products.

A 1.5% addition of apple fiber resulted in the intensification of the yellow color in CPF, CCF and CAF mixtures. Moreover, after 7 and 21 days of freezing storage, the yellow color was found. These results are confirmed by the analysis of variance, which shows that the type of bacteria, storage time and addition of apple fiber and the interactions of these factors significantly influenced the intensity of yellow color. Furthermore, when analyzing the results of the C color saturation and the h° hue of ice cream mixes and ice cream, a significant effect of apple fiber was found.

Apple fiber is characterized by a beige color, which is formed during the drying of apple pomace. During drying, the enzyme polyphenol oxidase causes oxidation of polyphenols resulting in browning of the powder. The same effect is obtained from the non-enzymatic browning reaction, i.e., the reaction of sugars with amino acids, occurring at high speed at an elevated temperature and with a water content of about 30% [84,85]. The color components of dried apple fiber, determined by Rząca and Witrowa-Rajchert [30], indicate a large proportion of red and yellow, which explains the role of these colors in forming the color of ice cream in our research.

### 3.5. Organoleptic Analysis

The results of the organoleptic evaluation of ice cream on days 7 and 21 of freezer storage are presented in Table 7.

The most characteristic appearance of milk ice cream was that of ice cream with CA and CP inulin, both after 7 and 21 days of freezing storage. This is probably because the use of apple fiber caused a significant reduction in L\* brightness, and the fiber ice cream was darker and redder than inulin only ice cream. The ANOVA, also, confirms that the addition of fiber had a significant effect on the appearance of sheep's milk ice cream.

In the Akalin et al. [77] study, ice cream with apple fiber also scored lower for appearance due to its darker color. Crizel et al. [86], also, observed that the orange peel fiber used lowered the acceptance of ice cream among consumers.

**Table 7.** Organoleptic characteristics of ice cream on 7 and 21 days of storage.

Properties	Storage Time (Days)	CP	CPF	CC	CCF	CA	CAF
Appearance	7	7.67 <sup>Abc</sup> ± 0.63	6.00 <sup>Aa</sup> ± 1.28	7.50 <sup>Bb</sup> ± 0.52	5.50 <sup>Aa</sup> ± 0.76	8.00 <sup>Ac</sup> ± 0.89	5.50 <sup>Aa</sup> ± 0.76
	21	7.25 <sup>Ac</sup> ± 0.56	5.50 <sup>Aab</sup> ± 0.73	6.00 <sup>Ab</sup> ± 0.56	5.50 <sup>Aab</sup> ± 0.91	7.00 <sup>Ac</sup> ± 0.41	4.75 <sup>Aa</sup> ± 0.71
Hardness	7	5.83 <sup>Aab</sup> ± 0.98	4.50 <sup>Aa</sup> ± 1.76	8.17 <sup>Aa</sup> ± 0.17	7.17 <sup>Aa</sup> ± 1.14	5.83 <sup>Ab</sup> ± 0.75	4.67 <sup>Aa</sup> ± 1.16
	21	5.25 <sup>Aab</sup> ± 0.50	4.00 <sup>Aa</sup> ± 0.16	8.75 <sup>Aa</sup> ± 0.22	7.00 <sup>Aa</sup> ± 0.16	5.25 <sup>Aa</sup> ± 0.71	4.75 <sup>Ab</sup> ± 0.89
Smoothness	7	7.17 <sup>Ac</sup> ± 0.75	4.00 <sup>Ab</sup> ± 0.67	6.50 <sup>Ac</sup> ± 0.38	3.83 <sup>Ab</sup> ± 0.23	7.00 <sup>Ac</sup> ± 0.89	3.83 <sup>Aa</sup> ± 0.17
	21	7.25 <sup>Ab</sup> ± 1.71	5.00 <sup>Aa</sup> ± 0.82	7.25 <sup>Ab</sup> ± 1.71	4.00 <sup>Aa</sup> ± 0.82	7.25 <sup>Ab</sup> ± 1.71	4.50 <sup>Aa</sup> ± 1.29
Sweet taste	7	5.33 <sup>Aa</sup> ± 0.51	4.83 <sup>Aa</sup> ± 0.47	5.33 <sup>Aa</sup> ± 0.51	5.17 <sup>Aa</sup> ± 0.83	6.17 <sup>Ab</sup> ± 0.33	5.17 <sup>Aa</sup> ± 0.32
	21	4.75 <sup>Aa</sup> ± 0.26	4.50 <sup>Aa</sup> ± 0.29	5.00 <sup>Aa</sup> ± 0.82	4.50 <sup>Aa</sup> ± 0.96	6.15 <sup>Ab</sup> ± 0.56	5.25 <sup>Aa</sup> ± 0.26
Additives taste	7	4.50 <sup>Aa</sup> ± 0.55	5.00 <sup>Aa</sup> ± 0.90	4.50 <sup>Aa</sup> ± 0.55	4.67 <sup>Aa</sup> ± 0.47	4.67 <sup>Aa</sup> ± 0.21	4.33 <sup>Aa</sup> ± 0.27
	21	5.25 <sup>Aa</sup> ± 0.96	5.50 <sup>Aa</sup> ± 1.00	5.50 <sup>Aa</sup> ± 0.29	5.75 <sup>Aa</sup> ± 0.96	5.25 <sup>Aa</sup> ± 0.96	5.25 <sup>Aa</sup> ± 1.71
Off taste	7	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.17 <sup>Aa</sup> ± 0.41
	21	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.25 <sup>Aa</sup> ± 0.50
Odor additives	7	2.50 <sup>Aa</sup> ± 0.14	3.00 <sup>Aa</sup> ± 0.15	2.33 <sup>Aa</sup> ± 0.15	3.33 <sup>Aa</sup> ± 0.11	2.33 <sup>Aa</sup> ± 0.21	2.83 <sup>Aa</sup> ± 0.17
	21	3.25 <sup>Aa</sup> ± 0.50	3.00 <sup>Aa</sup> ± 0.82	3.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	2.75 <sup>Aa</sup> ± 0.50	3.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	2.75 <sup>Aa</sup> ± 0.50
Off odor	7	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00
	21	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Ba</sup> ± 0.00	1.00 <sup>Aa</sup> ± 0.00

Mean ± standard deviation; n (for each trial storage time) = 15; <sup>a,b,c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at ( $p \leq 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—mean values in columns obtained for a given parameter denoted by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ). CP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26, CPF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. paracasei* L-26, CC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431, CCF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *L. casei* 431, CA: sample with 4% inulin and *Lb. acidophilus* LA-5 and CAF: sample with 2.5% inulin, 1.5% apple fiber and *Lb. acidophilus* LA-5. Storage time: 7—ice cream after 7 days and 21—ice cream after 21 days.

Ice cream hardness depends on the aeration and size of the ice crystals. The hardness is the greater the larger the ice crystals, while with the increase in overrun, the hardness decreases [87,88]. Moreover, in our research, the highest hardness was found in the least aerated CC and CCF ice cream. On the other hand, CPF and CAF ice cream, with the highest percentage of overrun, turned out to be the softest.

According to Franck [89], the added inulin of ice cream improves its texture due to its ability to bind water molecules and form a gel network of molecules. In our research, ice cream only with inulin (CP, CC and CA) was also characterized by higher hardness than their counterparts with the addition of apple fiber. Additionally, El-Nagar et al. [78] found in yogurt ice cream that the addition of inulin increased the hardness of the ice cream. Moreover, in the studies of Tiwari et al. [90], the milk ice cream with 4% inulin was harder than the control ice cream. Akalin and Erisir [79] and Di Criscio et al. [22] also demonstrated the effect of inulin addition on ice cream hardness. In ice cream tested by Hashemi et al. [91], an increase in hardness was also observed in ice cream where hydrogenated vegetable oil was replaced with inulin.

The addition of apple fiber in our study reduced the hardness of ice cream compared to ice cream with inulin only, but these differences were not significant. According to Bahram-Parvar et al. [71], hardness is a parameter that indicates the smoothness and wateriness of ice cream samples [92]. In our research, the smoothness of ice cream was significantly influenced by the addition of apple fiber, which reduced the feeling of smoothness and creaminess during consumption, increasing their sandiness at both times. The significant effect of the addition of apple fiber is confirmed by the ANOVA (Table 3).

According to Abdullah et al. [93] and Soukoulis and Tzia [94], the most important parameter determining the acceptance of frozen desserts is their taste. In our research, the sweetest ice cream turned out to be CA ice cream from *Lb. acidophilus* on both dates. This is most likely due to the low lactic acid content of 0.50–0.51 g L<sup>-1</sup> in CA ice cream compared to other ice cream groups. Moreover, the panelists, analyzing the taste of sheep's milk ice

cream (Table 7), found that ice cream with 4% inulin was characterized by a sweeter taste than ice cream with apple fiber. The least sweet were the CAF, CPF and CCF ice cream with 1.5% apple fiber at both storage times. This is probably related to the acids in apple fiber and the low pH and high lactic acid content of the ice cream. The panelists indicated that the addition of apple fiber positively increased the taste and aroma of the mango-passion fruit, but the differences in the notes were not significant.

As in the studies by Turgut and Cakmaci [61] also in our studies, fermentation guided by *L. paracasei*, *L. casei*, *Lb. acidophilus*, the addition of inulin and apple fiber did not introduce any foreign taste and smell to the ice cream. Furthermore, according to Salem et al. [62], no foreign taste was found in the milk ice cream with probiotic strains during storage. The conducted ANOVA (Table 3) shows that the storage time and type of bacteria used for fermentation and their interactions do not significantly affect the organoleptic characteristics of probiotic ice cream from sheep's milk. Only the addition of fiber significantly influenced the appearance and smoothness of the ice cream.

#### 4. Conclusions

Symbiotic ice cream with acceptable physicochemical and organoleptic characteristics may be produced from sheep milk of the Olkuska breed. Moreover, partial replacement of inulin with apple fiber contributed to increased overrun in the ice cream and to a shorter run-off time of the first drop and the total melting time. The addition of apple fiber stimulated the growth of *L. paracasei* and *Lb. acidophilus*. The best survival rate was found for *L. paracasei*. Results demonstrated the effects of using apple fiber and various types of bacteria in milk ice cream, mainly probiotics that have not yet been studied and used in sheep's milk ice cream. Partial replacement of inulin with apple fiber is, also, a way to reduce production costs.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K. and A.Z.; methodology, M.K. and A.Z.; software, M.K. and A.Z.; validation, M.K., A.Z., M.P. and M.B.; formal analysis, M.K. and A.Z.; investigation, M.K., A.Z., M.P. and M.B.; data curation, A.Z.; writing—original draft preparation, M.K., A.Z., M.P. and M.B.; writing—review and editing, M.K., M.P. and M.B.; visualization, M.K.; supervision, A.Z.; project administration, M.K.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The project is financed by the program of the Minister of Science and Higher Education named "Regional Initiative of Excellence" in the years 2019–2022, project number 026/RID/2018/19, the amount of financing PLN 9 542 500.00.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Sikora, J.; Kawęcka, A.; Puchała, M.; Obrzut, J.; Miksza-Cybulska, A.; Krupiński, J. Aktualny stan hodowli owiec objętych programem ochrony zasobów genetycznych (In Polish). Current status of sheep breeding and implementation of the genetic resources conservation program. *Wiad. Zoot.* **2015**, *4*, 70–75.
2. Musiał, K.; Walczak, J.; Pawłowska, J. Selected milk quality parameters of Olkuska sheep as affected by grazing in xerothermic grasslands of *Festuco-Brometea* class. *Rocz. Nauk. Zoot.* **2018**, *45*, 99–112.
3. Balthazar, C.F.; Pimentel, T.C.; Ferrão, L.L.; Almada, C.N.; Santillo, A.; Albenzio, M.; Mollakhalili, N.; Mortazavian, A.M.; Nascimento, J.S.; Silva, M.C.; et al. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 247–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Landi, N.; Ragucci, S.; Di Maro, A. Amino Acid Composition of Milk from Cow, Sheep and Goat Raised in Ailano and Valle Agricola, Two Localities of 'Alto Casertano' (Campania Region). *Foods* **2021**, *10*, 2431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sarkar, A.; Singh, H. Emulsions and Foams Stabilised by Milk Proteins. In *Advanced Dairy Chemistry*; McSweeney, P., O'Mahony, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2017. [[CrossRef](#)]
6. Mohapatra, A.; Shinde, A.K.; Singh, R. Sheep milk: A pertinent functional food. *Small Rumin. Res.* **2019**, *181*, 6–11. [[CrossRef](#)]

7. Ah-Leung, S.; Bernard, H.; Bidat, E.; Paty, E.; Rancé, F.; Scheinmann, P.; Wal, J.M. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy* **2006**, *61*, 1358–1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. El-Agamy, E.I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 64–72. [[CrossRef](#)]
9. Ranadheera, C.S.; Naumovski, N.; Ajlouni, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *22*, 109–114. [[CrossRef](#)]
10. FAO; WHO. Joint Expert Consultation Report: Evaluations of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina. 2001. Available online: [http://www.fao.org/documents/pub\\_dett.asp?lang=en&pub\\_id=61756/](http://www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=61756/) (accessed on 22 March 2021).
11. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Berni Canani, R.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gheziel, C.; Russo, P.; Arena, M.P.; Spano, G.; Ouzari, H.I.; Kheroua, O.; Saidi, D.; Fiocco, D.; Kaddouri, H.; Capozzi, V. Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from algerian infant feces, towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11*, 113–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rasika, D.M.D.; Munasinghe, M.A.D.D.; Vidanarachchi, J.K.; da Cruz, A.G.; Ajlouni, S.; Ranadheera, C.S. Probiotics and prebiotics in non-bovine milk. *Adv. Food Nutr. Res.* **2020**, *94*, 339–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ertem, H.; Cakmakci, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with *Lactobacillus acidophilus* and Gobbid. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 776–783. [[CrossRef](#)]
15. Neffe-Skocińska, K.; Rzepkowska, A.; Szydłowska, A.; Kolożyn-Krajewska, D. Trends and possibilities of the use of probiotics in food production. *Altern. Replace. Foods* **2018**, 65–94. [[CrossRef](#)]
16. Homayouni, A.; Azizi, A.; Javadi, M.; Mahdipour, S.; Ejtahed, H. Factors influencing probiotic survival in ice cream: A review. *Int. J. Dairy Sci.* **2012**, *7*, 1–10. [[CrossRef](#)]
17. Ranadheera, C.S.; Evans, C.A.; Baines, S.K.; Balthazar, C.F.; Cruz, E.A.; Esmerino, A.G.; Freitas, M.Q.; Pimentel, T.C.; Wittwer, A.E.; Naumovski, N.; et al. Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 867–882. [[CrossRef](#)]
18. Sangami, R.; Sri, S.R. Emerging trends in improving viability, advanced stability techniques and health claims of healthy microbiome—The probiotics. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 194–200. [[CrossRef](#)]
19. Fuller, S.; Beck, E.; Salman, H.; Tapsell, L. New horizons for the study of dietary fiber and health: A review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2016**, *71*, 1–12. [[CrossRef](#)]
20. Lordan, C.; Thapa, D.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components. *Gut Microbes* **2020**, *11*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Sarwar, A.; Aziz, T.; Al-Dalali, S.; Zhang, J.; ud Din, J.; Chen, C.h.; Cao, Y.; Fatima, H.; Yang, Z. Characterization of synbiotic ice cream made with probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in combination with inulin. *LWT-Food Sci. Technol.* **2021**, *141*, 110910. [[CrossRef](#)]
22. Di Criscio, T.; Fratianni, A.; Mignogna, R.; Cinquanta, L.; Coppola, R.; Sorrentino, E.; Panfili, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 4555–4564. [[CrossRef](#)]
23. Karaca, O.B.; Güve, M.; Yasar, K.; Kaya, S.; Kahayoglu, T. The functional, rheological and sensory characteristics of ice creams with various fat replacers. *Int. J. Dairy Technol.* **2009**, *62*, 93–99. [[CrossRef](#)]
24. Pintor, A.; Escalona, H.B.; Totosa, A. Effect of inulin on melting and textural properties of low-fat and sugar reduced ice cream: Optimization via a response surface methodology. *Int. Food Res. J.* **2017**, *24*, 1728–1734.
25. Soukoulis, C.; Lebesi, D.; Tzia, C. Enrichment of Ice Cream with Dietary Fibre: Effects on Rheological Properties, Ice Crystallisation and Glass Transition Phenomena. *Food Chem.* **2009**, *115*, 665–671. [[CrossRef](#)]
26. Akbari, M.; Eskandari, M.H.; Niakosari, M.; Bedeltavana, A. The effect of inulin on the physicochemical properties and sensory attributes of low-fat ice cream. *Int. Dairy J.* **2016**, *57*, 52–55. [[CrossRef](#)]
27. Cunningham, M.; Vinderola, G.; Charalampopoulos, D.; Lebeer, S.; Sanders, M.E.; Grimaldi, R. Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats—Is the clinical evidence transferable? *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *112*, 495–506. [[CrossRef](#)]
28. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [[CrossRef](#)]
29. Znamirska, A.; Kalicka, D.; Buniowska, M.; Rożek, P. Wpływ dodatku suszu z wyłoków jabłkowych na właściwości fizykochemiczne i sensoryczne jogurtów (In Polish). Effect of the addition of dried apple pomace on the physicochemical and sensory properties of yogurt. *Żywn. Nauka. Technol. Jakość.* **2018**, *25*, 71–80. [[CrossRef](#)]
30. Rząca, M.; Witrowa-Rajchert, D. Wpływ parametrów suszenia konwekcyjnomikrofalowego na aktywność przeciwnokową jabłek (In Polish). Effect of convection-microwave drying parameters on antiradical activity of apples. *Żywn. Nauka. Technol. Jakość.* **2007**, *5*, 222–230.
31. Jemaa, M.B.; Falleh, H.; Neves, M.A.; Isoda, H.; Nakajima, M.; Ksouri, R. Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. *Food Chem.* **2017**, *217*, 726–734. [[CrossRef](#)]
32. Goff, D.H.; Hartel, R. *Ice Cream*, 7th ed.; Springer Science & Business Media: Boston, MA, USA, 2013.

33. Rezaei, R.; Khomeiri, M.; Aalami, M.; Kashaninejad, M. Effect of inulin on the physicochemical properties, flow behavior and probiotic survival of frozen yogurt. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 2809–2814. [[CrossRef](#)]
34. Góral, M.; Kozłowicz, K.; Pankiewicz, U.; Góral, D. Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chem.* **2018**, *239*, 1151–1159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Góral, M.; Kozłowicz, K.; Pankiewicz, U.; Góral, D.; Kluza, F.; Wójtowicz, A. Impact of stabilizers on the freezing process, and physicochemical and organoleptic properties of coconut milk-based ice cream. *LWT-Food Sci. Technol.* **2018**, *92*, 516–522. [[CrossRef](#)]
36. Karaman, S.; Toker, Ö.S.; Yüksel, F.; Çam, M.; Kayacier, A.; Dogan, M. Physicochemical, bioactive, and sensory properties of persimmon-based ice cream: Technique for order preference by similarity to ideal solution to determine optimum concentration. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 97–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ferraz, J.L.; Cruz, A.G.; Cadena, R.S.; Freitas, M.Q.; Pinto, U.M.; Carvalho, C.C.; Faria, J.A.F.; Bolini, H.M.A. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. *J. Food Sci.* **2012**, *71*, 24–28. [[CrossRef](#)]
38. Ismail, H.A.; Hameed, A.M.; Refaey, M.M.; Sayqal, A.; Aly, A.A. Rheological, physio-chemical and organoleptic characteristics of ice cream enriched with Doum syrup and pomegranate peel. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 7346–735673. [[CrossRef](#)]
39. Balthazar, C.F.; Silva, H.L.A.; Vieira, A.H.; Neto, R.P.C.; Cappato, L.P.; Coimbra, P.T.; Raices, I.B.; Silva, R.S.L.; Cruz, A.G. Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Res. Int.* **2017**, *91*, 38–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Abdelazez, A.; Muhammad, Z.; Zhang, Q.X. Production of a Functional Frozen Yogurt Fortified with *Bifidobacterium* spp. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 6438528. [[CrossRef](#)]
41. Ranadheera, C.S.; Evans, C.A.; Adams, M.C.; Baines, S.K. Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Rumin. Res.* **2013**, *112*, 174–180. [[CrossRef](#)]
42. Mohammadi, R.; Mortazavian, A.M.; Khosrokhavar, R.; Gomes da Cruz, A. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 411–424. [[CrossRef](#)]
43. Śliwa, K.; Malinowska, M.; Sikora, E.; Ogonowski, J. Porównanie metod ekstrakcyjnych w pozyskiwaniu związków aktywnych z odpadów powstałych podczas produkcji soku jabłkowego (In Polish). Comparison of extraction methods in the extraction of active compounds from waste generated during apple juice production. *Przem. Chem.* **2015**, *94*, 357–360. [[CrossRef](#)]
44. Giryn, H.; Szteke, B.; Szymczyk, K. Wpływ procesu technologicznego i przechowywania na zawartość kwasów organicznych w zagęszczonych sokach jabłkowych (In Polish). The influence of technological process and storage on the content of organic acids in concentrated apple juices. *Żywn. Nauka. Technologia. Jakość.* **2004**, *2*, 92–107.
45. Favaro-Trindade, C.S.; Bernardi, S.; Bodini, R.B.; De Carvalho Balieiro, J.C.; De Almeida, E. Sensory Acceptability and Stability of Probiotic Microorganisms and Vitamin C in Fermented Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Ice Cream. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 492–495. [[CrossRef](#)]
46. Minervini, F. Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus casei* Group. *Encycl. Dairy Sci.* **2011**, 96–104. [[CrossRef](#)]
47. Soukoulis, C.; Chandrinou, I.; Tzia, C. Study of the functionality of selected hydrocolloids and their blends with κ-carrageenan on storage quality of vanilla ice cream. *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1816–1827. [[CrossRef](#)]
48. Akca, S.; Akpınar, A. The Effects of Grape, pomegranate, Sesame Seed Powder and Their Oils on Probiotic Ice Cream: Total phenolic contents, antioxidant activity and probiotic viability. *Food Biosci.* **2021**, *42*, 101203. [[CrossRef](#)]
49. Abd EL-Rashid, A.; Hassan, Z.M.R. Potential utilization and healthy effects of doum palm fruits in ice cream and sesame butter (tekena). *Alex. J. Food. Sci. Technol.* **2005**, *2*, 29–39. [[CrossRef](#)]
50. de Paulo Farias, D.; de Araújo, F.F.; Neri-Numa, I.A.; Pastore, G.M. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *93*, 23–35. [[CrossRef](#)]
51. Crittenden, R.G.; Morris, L.F.; Harvey, M.L.; Tran, L.T.; Mitchell, H.L.; Playne, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in synbiotic yoghurt. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 268–278. [[CrossRef](#)]
52. Akin, M.B.; Akin, M.S.; Kirmaci, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chem.* **2007**, *104*, 93–99. [[CrossRef](#)]
53. Godward, G.; Kailasapathy, K. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. *Dairy Sci. Int.* **2003**, *58*, 161–164.
54. Tamime, A.Y.; Saarela, M.; Sondergaard, A.K.; Mistry, V.V.; Shah, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In *Probiotic Dairy Products*; Tamime, A.Y., Ed.; Blackwell: Oxford, UK, 2005; pp. 39–72.
55. Talwalkar, A.I.; Kailasapathy, K.A. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2004**, *5*, 1–8. [[PubMed](#)]
56. Haynes, I.N.; Playne, M.J. Survival of probiotic cultures in low fat ice cream. *Aust. J. Dairy Technol.* **2002**, *57*, 10–14.
57. Takahashi, N.; Xiao, J.Z.; Miyaji, K.; Iwatsuki, K. H<sup>+</sup>-ATPase in the acid tolerance of *Bifidobacterium longum*. *Milchwissenschaft* **2007**, *62*, 151–153.
58. Jay, J.M.; Loessner, M.J.; Golden, D.A. *Modern Food Microbiology*, 7th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2005.
59. Cruz, A.G.; Faria, J.A.F.; Van Dender, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 951–956. [[CrossRef](#)]
60. Vasiljevic, T.; Shah, N.P. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 714–728. [[CrossRef](#)]

61. Turgut, T.; Cakmakci, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. *Int. J. Dairy Technol.* **2009**, *62*, 444–451. [[CrossRef](#)]
62. Salem, M.M.F.; Fathi, F.A.; Awad, R.A. Production of probiotic ice cream. *Pol. J. Food Sci. Nutr.* **2005**, *55*, 267–271.
63. Nadelman, P.; Frazão, J.V.; Vieira, T.I.; Balthazar, C.F.; Andrade, M.M.; Alexandria, A.K.; Cruz, A.G.; Fonseca-Gonçalves, A.; Maia, L.C. The performance of probiotic fermented sheep milk and ice cream sheep milk in inhibiting enamel mineral loss. *Food Res. Int.* **2017**, *97*, 184–190. [[CrossRef](#)]
64. Espitia, P.J.P.; Batista, R.A.; Azeredo, H.M.C.; Otoni, C.G. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Res. Int.* **2016**, *90*, 42–52. [[CrossRef](#)]
65. Nezhad, H.M.; Hussain, M.A.; Britz, M.L. Stress responses in probiotic *Lactobacillus casei*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 740–749. [[CrossRef](#)]
66. Schieber, A.; Stintzing, F.C.; Carle, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—Recent developments. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *12*, 401–413. [[CrossRef](#)]
67. Feizi, R.; Goh, K.K.T.; Mutukumira, A.N. Effect of chia seed mucilage as stabiliser in ice cream. *Int. Dairy J.* **2021**, *120*, 105087. [[CrossRef](#)]
68. Bahram-Parvar, M.; Goff, H.D. Basil seed gum as a novel stabilizer for structure formation and reduction of ice recrystallization in ice cream. *Dairy Sci. Technol.* **2013**, *93*, 273–285. [[CrossRef](#)]
69. Soukoulis, C.H.; Fisk, I.D.; Bohn, T. Ice Cream as a Vehicle for Incorporating Health-Promoting Ingredients: Conceptualization and Overview of Quality and Storage Stability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 627–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Soukoulis, C.; Rontogianni, E.; Tzia, C. Contribution of thermal, rheological and physical measurements to the determination of sensorially perceived quality of ice cream containing bulk sweeteners. *J. Food Eng.* **2010**, *100*, 634–641. [[CrossRef](#)]
71. Bahram-Parvar, M.; Tehrani, M.M.; Razavi, S.M.A. Effects of a novel stabilizer blend and presence of  $\kappa$ -carrageenan on some properties of vanilla ice cream during storage. *Food Biosci.* **2013**, *3*, 10–18. [[CrossRef](#)]
72. Singo, T.M.; Beswa, D. Effect of roselle extracts on the selected quality characteristics of ice cream. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 42–53. [[CrossRef](#)]
73. Sofjan, R.P.; Hartel, R.W. Effects of Overrun on Structural and Physical Characteristics of Ice Cream. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 255–262. [[CrossRef](#)]
74. Warren, M.M.; Hartel, R.W. Structural, Compositional, and Sensorial Properties of United States Commercial Ice Cream Products. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, 2005–2013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Guven, M.; Karaca, O.B.; Kacar, A. The effects of the combined use of stabilizers containing locust bean gum and the storage time on Kahramanmaras-type ice creams. *Int. J. Dairy Technol.* **2003**, *56*, 223–228. [[CrossRef](#)]
76. Syed, Q.A.; Anwar, S.; Shukat, R.; Zahoor, T. Effects of different ingredients on texture of ice cream. *J. Nutr. Health Food Eng.* **2018**, *8*, 422–435. [[CrossRef](#)]
77. Akalin, A.S.; Kesencas, H.; Dinkci, H.; Unal, G.; Ozer, E.; Kınık, O. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: Structural characteristics and culture viability. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 37–46. [[CrossRef](#)]
78. El-Nagar, G.; Clowes, G.; Tudorica, C.M.; Kuri, M.; Brennan, C.S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *Int. J. Dairy Technol.* **2002**, *55*, 89–93. [[CrossRef](#)]
79. Akalin, A.S.; Erisir, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 184–188. [[CrossRef](#)]
80. Goh, K.K.T.; Nair, R.S.; Matia-Merino, L. Exploiting the functionality of lactic acid bacteria in ice cream. *Food Biophys.* **2008**, *3*, 295–304. [[CrossRef](#)]
81. Adhikari, B.M.; Truong, T.; Prakash, S.; Bansal, N.; Bhandari, B. Impact of incorporation of CO<sub>2</sub> on the melting, texture and sensory attributes of soft-serve ice cream. *Int. Dairy J.* **2020**, *109*, 104789. [[CrossRef](#)]
82. Nozière, P.; Graulet, B.; Lucas, A.; Martin, B.; Grolier, P.; Doreau, M. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *131*, 418–450. [[CrossRef](#)]
83. Acevedo-Martinez, E.; Gutiérrez-Cortés, C.; García-Mahecha, M.; Díaz-Moreno, C. Evaluation of viability of probiotic bacteria in mango (*Mangifera indica* L. Cv. “Tommy Atkins”) beverage. *DYNA* **2018**, *85*, 84–92. [[CrossRef](#)]
84. Roos, Y.H. *Water Activity, Food Shelf Life Stability, Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*; Eskin, M., Ed.; CRC Press: London, UK, 2001; pp. 3–36.
85. Perera, C.O. Selected Quality Attributes of Dried Foods. *Dry. Technol.* **2005**, *23*, 717–730. [[CrossRef](#)]
86. Crizel, T.D.M.; Araujo, R.R.D.; Rios, A.D.O.; Rech, R.; Flôres, S.H. Orange fiber as a novel fat replacer in lemon ice cream. *Food Sci. Technol.* **2014**, *34*, 332–340. [[CrossRef](#)]
87. Muse, M.R.; Hartel, R.W. Ice cream structural elements that affect meltin rate and hardness. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1–10. [[CrossRef](#)]
88. Palka, A.; Palich, P. Wpływ fluktualizacji temperatury przechowywania na wybrane cechy jakościowe lodów. (In Polish). Effect of storage temperature fluctuation on selected quality characteristics of ice cream. *Acta Agrophysica* **2008**, *12*, 755–765.
89. Franck, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **2002**, *2*, 287–291. [[CrossRef](#)]
90. Tiwari, A.; Sharma, H.K.; Kumar, N.; Kaur, M. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of low-fat ice cream. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *68*, 374–380. [[CrossRef](#)]
91. Hashemi, M.; Reza Gheisari, H.; Shekarforoush, S. Preparation and evaluation of low-calorie functional ice cream containing inulin, lactulose and *Bifidobacterium lactis*. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *68*, 183–189. [[CrossRef](#)]

92. Meneses, R.B.; Silva, M.S.; Monteiro, M.L.G.; Rocha-Leão, M.H.M.; Conte-Junior, C.A. Effect of dairy by-products as milk replacers on quality attributes of ice cream. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 10022–10035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Abdullah, M.; Saleem-ur-Rehman; Zubair, H.; Saeed, H.M.; Kousar, S.; Shahid, M. Effect of Skim Milk in Soymilk Blend on the Quality of Ice Cream. *Pak. J. Nutr.* **2003**, *2*, 305–311. [[CrossRef](#)]
94. Soukoulis, C.; Tzia, C. Response surface mapping of the sensory characteristics and acceptability of chocolate ice cream containing alternate sweetening agents. *J. Sens. Stud.* **2010**, *25*, 50–75. [[CrossRef](#)]

## Article

# Sheep Milk Symbiotic Ice Cream: Effect of Inulin and Apple Fiber on the Survival of Five Probiotic Bacterial Strains during Simulated In Vitro Digestion Conditions

Magdalena Kowalczyk <sup>\*</sup>, Agata Znamierowska-Piotrowska , Magdalena Buniowska-Olejnik   
and Małgorzata Pawlos 

Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszów, Ćwiklińskiej 2D, 35-601 Rzeszów, Poland

\* Correspondence: mkowalczyk@ur.edu.pl

**Abstract:** We conducted a study to determine the survival of bacterial cells under in vitro digestion. For this purpose, ice cream mixes were prepared: control, with 4% inulin, 2.5% inulin and 1.5% apple fiber and 4% apple fiber. Each inoculum ( $\text{pH} = 4.60 \pm 0.05$ ), containing  $9 \log \text{cfu g}^{-1}$  bacteria, at 5% ( $w/w$ ) was added to the ice cream mixes (*Lactocaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactocaseibacillus paracasei* L-26, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12) and fermentation was carried out to  $\text{pH} 4.60 \pm 0.05$ . The in vitro digestion method simulated the stages of digestion that occur in the mouth, stomach and small intestine under optimal controlled conditions ( $\text{pH}$  value, time and temperature). At each stage of digestion, the survival rate of probiotic bacteria was determined using the plate-deep method. As expected, in the oral stage, there was no significant reduction in the viability of the probiotic bacteria in any ice cream group compared to their content before digestion. In the stomach stage, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 strain had the highest viable counts ( $8.48 \log \text{cfu g}^{-1}$ ) among the control samples. Furthermore, a 4% addition of inulin to ice cream with *Bifidobacterium* BB-12 increased gastric juice tolerance and limited strain reduction by only 16.7% compared to the number of bacterial cells before digestion. Regarding ice cream samples with *Bifidobacterium* BB-12, replacing part of the inulin with apple fiber resulted in increased survival at the stomach stage and a low reduction in the bacterial population of only 15.6% compared to samples before digestion. At the stomach stage, the positive effect of the addition of inulin and apple fiber was also demonstrated for ice cream samples with *Lactocaseibacillus casei* 431 ( $9.47 \log \text{cfu g}^{-1}$ ), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ( $8.06 \log \text{cfu g}^{-1}$ ) and *Lactocaseibacillus paracasei* L-26 ( $5.79 \log \text{cfu g}^{-1}$ ). This study showed the highest sensitivity to simulated gastric stress for ice cream samples with *Lactocaseibacillus rhamnosus* ( $4.54 \log \text{cfu g}^{-1}$ ). Our study confirmed that the 4% addition of inulin to ice cream increases the survival rate of *L. casei* and *Bifidobacterium* BB-12 in simulated intestinal juice with bile by 0.87 and  $2.26 \log \text{cfu g}^{-1}$ , respectively. The highest viable count in the small intestine stage was observed in ice cream with *L. acidophilus*. The addition of inulin increased the survival of *L. rhamnosus* by 10.8% and *Bifidobacterium* BB-12 by about 22% under conditions of simulated in vitro digestion compared to their control samples. The survival rates of *L. casei* and *L. paracasei* were also highly affected by the 4% addition of apple fiber, where the increase under gastrointestinal passage conditions was determined to range from 7.86–11.26% compared to their control counterparts. In comparison, the lowest survival rate was found in the control ice cream with *L. rhamnosus* (47.40%). In our study at the intestinal stage, only five ice cream groups: a sample with 4% inulin and *L. acidophilus*, a control sample with *Bifidobacterium* BB12, a sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *Bifidobacterium* BB12, a control sample with *L. rhamnosus*, a sample with 4% fiber and *L. rhamnosus* reported bacterial cell counts below  $6 \log \text{cfu g}^{-1}$  but higher than  $5 \log \text{cfu g}^{-1}$ . However, in the remaining ice cream groups, viable counts of bacterial cells ranged from 6.11 to  $8.88 \log \text{cfu g}^{-1}$ , ensuring a therapeutic effect. Studies have clearly indicated that sheep milk ice cream could provide a suitable matrix for the delivery of probiotics and prebiotics and contribute to intestinal homeostasis. The obtained results have an applicative character and may play an essential role in developing new functional sheep milk ice cream.



**Citation:** Kowalczyk, M.; Znamierowska-Piotrowska, A.; Buniowska-Olejnik, M.; Pawlos, M. Sheep Milk Symbiotic Ice Cream: Effect of Inulin and Apple Fiber on the Survival of Five Probiotic Bacterial Strains during Simulated In Vitro Digestion Conditions. *Nutrients* **2022**, *14*, 4454. <https://doi.org/10.3390/nu14214454>

Academic Editors: Nadia Calabriso and Barbara Laddomada

Received: 3 October 2022

Accepted: 20 October 2022

Published: 23 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** ice cream; probiotic; prebiotic; bacterial survival rate; in vitro

## 1. Introduction

In the recent decade, it has become common practice to integrate bioactive ingredients into food products to promote health and personal well-being [1]. Ice cream is a product widely known and consumed by all age groups worldwide. Increasing dietary concerns about the impact on health have led to a growing interest in ice cream manufactured with health-promoting ingredients, including prebiotics and probiotic bacteria.

Sheep milk is an excellent raw material for producing probiotic ice cream. Sheep milk differs from cow milk in chemical composition, including higher protein and fat content, and physicochemical properties [2]. High protein content enhances the growth of microorganisms, reducing the fermentation time in the production process. Some researchers have indicated that the fat content of ice cream positively affects the stability of probiotics [3]. According to Ranadheera et al. [2], higher fat and protein levels in sheep's milk can protect probiotics as they pass through the digestive tract. Moreover, sheep milk contains high levels of calcium, about 200 mg 100 g<sup>-1</sup> [4]. As an intracellular secondary messenger, calcium ions play a significant role in various cellular pathways, involving almost all cellular reactions required for average cell survival [5]. The addition of Ca<sup>2+</sup> has been found to increase the yield and biological activity of exopolysaccharides [6–8], which may affect the cell survival of probiotic strains in the gastrointestinal tract.

Probiotics are defined as live microorganisms that, when provided in adequate amounts, are beneficial to the host's health [9,10]. Probiotics are credited with numerous health benefits, including anti-infective, antimutagenic and anticarcinogenic effects, stimulation of the immune system, lowering serum cholesterol levels, improving nutritional value, and relieving symptoms of lactose intolerance [11–14].

Probiotic bacteria have the ability to spread from the gastrointestinal tract to extraintestinal sites through dendritic cells. These cells can penetrate the epithelium and absorb bacteria directly from the intestinal lumen. After entering dendritic cells or macrophages, probiotic bacteria can be transported to other locations by circulating immune cells in the bloodstream. Bacterial adhesion to the host surface is a crucial aspect of host colonization, as it prevents the mechanical clearance of pathogens [15]. Furthermore, some lactobacilli and bifidobacteria can produce antimicrobial peptides known as bacteriocins, which prevent the proliferation of selected pathogens. Bacteriocins are small cationic molecules composed of about 30–60 amino acids. These molecules act on the cytoplasmic membranes of bacteria and target energized membrane vesicles to disrupt the proton-motive force, thereby inhibiting the growth of many pathogens [16]. Numerous factors regulate the growth and development of probiotic bacteria, primarily optimal temperature, pH value, chemical composition, presence of oxygen and low oxidation-reduction potential. Probiotic bacteria have the ability to regulate intracellular pH. This attribute is essential because it allows growth at a pH in the range of 4.5 to 7.0. At a pH value that inhibits the growth of probiotic bacteria, the cytoplasmic membrane is damaged, and it causes bacterial death [17]. Probiotic bacteria are able to produce exopolysaccharides (EPS). These polymers surround probiotic cells, protecting them from harmful conditions and protecting them from cell dehydration, antibiotics, toxic substances, osmotic stress and pathogens [18]. Probiotics have the ability to inhibit intestinal bacterial enzymes that convert procarcinogens into carcinogens [19]. Some strains of probiotic bacteria have been shown to successfully bind to and neutralize aflatoxin B1 (AFB1) in vivo, thereby reducing the bioabsorption of the toxin from the gut [20]. Moreover, probiotics reduce the concentration of fecal enzymes (glycosidase, B-glucuronidase, azoreductase and nitroreductase) and secondary bile salts and reduce the absorption of harmful mutagens that contribute to colon cancer [19]. Probiotic strains of *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* combined with prebiotic inulin enriched with oligofructose provide anticancer effects [21]. *L. acidophilus* and *L. casei* also exhibit

immunoenhancing properties by increasing the phagocytic activity of granulocytes, the activity of immunoglobulin-secreting cells in the blood, and the excretion of cytokines in lymphocytes [22]. The probiotic bacteria *Bifidobacterium* spp. and *L. acidophilus* reduce blood cholesterol by causing the deconjugation of bile salts, binding cholesterol to bacterial cell walls and contributing to the reduction of cholesterol biosynthesis [23,24]. Furthermore, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* have been proven to reduce obesity and insulin resistance by regulating metabolism. The prevention of gastrointestinal infections is a consequence of probiotics' production of substances with antimicrobial properties, such as organic acids, mainly lactic and acetic acids, and through the stimulation of immune processes in the host. To induce a beneficial probiotic effect, the minimum therapeutic dose of a probiotic should be  $10^6$ – $10^9$  CFU.

Due to growing consumer interest, products containing cultures of live probiotic microorganisms have become an essential commercial commodity, coming in various forms: tablets, sprays, liquids, suspensions, capsules, powder sachets, granules and in food [25]. Probiotics must be present in the food product in sufficient quantity before expiration, pass through the gastrointestinal tract, resist acidic and alkaline environments, and colonize the gut in sufficient numbers required to have a measurable beneficial effect [9,26]. Therefore, the quality of the final product is highly dependent on production processes, where procedures such as fermentation, the chemical composition of the growth environment, cell isolation, spray drying, freeze-drying and storage conditions such as temperature, humidity and pH are production factors that can affect microbial survival and growth [27–29]. Probiotic products are available as medicinal products, but most are categorized as foods or dietary supplements. In 2001, the Food and Agriculture Organization/World Health Organization [9] issued recommendations on the information that should be on the label of a probiotic food product: designation of genus, species and strain, minimum viable number of each probiotic strain at the end of shelf life, suggested serving size, which must provide an effective dose of probiotics related to the health claim, proper storage conditions and manufacturer's contact information. The quality control process for probiotic food products should ensure that the probiotic content stated on the label corresponds to the actual content throughout the shelf life of the product while being free of contamination [25].

Optimal conditions for the growth of probiotic bacteria include a temperature of 30–40 °C and a pH of 5.5–6.2, but they can grow at a temperature of 2–53 °C [30] and a pH varying between 4.5 and 7.0, depending on the strain. However, culture conditions can affect growth kinetics parameters, such as the specific growth rate and the lag phase duration, which is the time bacteria adapt to a new medium and do not multiply [31]. The literature reports on the kinetics parameters of milk acidification by various strains of lactic acid bacteria, including probiotic strains, where the maximum acidification rate ( $V_{max}$ ) ranged from 15.9 to  $18.9 \times 10^{-3}$  upH/min for milk fermented by *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 with co-cultures of *S. thermophilus*. When 4% inulin was added to the milk, there was an increase in the time to reach  $V_{max}$ , which ranged from 17.0 to  $19.0 \times 10^{-3}$  upH/min [32].

Probiotic bacteria cells are destroyed during freezing and aeration of the ice cream mixes and in storage; however, many researchers have shown that probiotic cultures have better viability in frozen products than in fermented milk [33–35]. The most commonly applied probiotic bacteria in food production, including ice cream, are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [36,37]. The probiotic strains of these bacteria are potentially resistant to low temperatures during freezing, extremely low pH (1–4) in the stomach, the activity of digestive enzymes (bile salts and pancreatin) in the intestine, and toxic metabolites formed during digestion [38–40].

Prebiotics are substrates that pass through the esophagus and stomach, reaching the intestines in undigested form and providing an abundant energy source for intestinal microflora [26,41,42]. Research results indicate that the consumption of dietary fiber, particularly inulin and fructooligosaccharides (FOS), can stimulate growth and increase the activity of intestinal microflora, leading to the restoration of human health and intestinal

colonization by probiotic bacteria [43]. It was also confirmed that these compounds improve mineral absorption and regulate lipid metabolism, and reduce the possibility of diseases, including cardiovascular disease, diabetes, constipation and colon cancer [44–46]. Moreover, these natural polysaccharides were proven to positively affect the ice cream-making process by improving gelation and controlling crystallization. Probiotics include apple fiber, which consists of pectin and insoluble cellulose [47]. Inulin can be safely used as a thickener and substitute for sugar and fat [48,49]. The use of various strains of probiotics and the use of inulin and apple fiber in ice cream manufacturing could affect the survival rate of probiotics in the human gastrointestinal tract. Therefore, it is essential to evaluate the survival of bacteria before and during passage through the gastrointestinal tract using an in vitro model digestion system [50].

Sheep milk ice cream combines the health-promoting properties of sheep milk with the beneficial effects of fiber and probiotics on human health. Studies on synbiotic sheep milk ice cream are important for ice cream manufacturers, consumers and nutritionists. These studies disprove of the myth of ice cream as a provider of empty calories consisting of sugar. Sheep milk ice cream provides a matrix rich in protein, fat and vitamins, further protecting probiotic cells. Therefore, it is crucial to show whether probiotic monocultures applied in the dairy industry can survive under simulated gastrointestinal conditions and induce a beneficial probiotic effect. The study aimed to evaluate the survival of five strains of probiotic bacteria, namely *Lacticaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, *Lacticaseibacillus paracasei* L-26 and *Lacticaseibacillus rhamnosus*, by simulated in vitro digestion in ice cream manufactured from sheep milk, using different doses of apple fiber and inulin.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Enzymes and reagents: heat-stable  $\alpha$ -amylase (TDF-100A, 24,975 U/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mucin from the porcine stomach (type II; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pepsin from the porcine gastric mucosa (250 U/mg solid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), porcine bile extract (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pancreatin from the porcine pancreas (8 $\times$ USP specifications; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), di-sodium hydrogen phosphate anhydrous pure p.a.  $\geq 99.0\%$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 141.96 g/mol; Chempur, Piekary Śląskie, Poland), di-potassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 174.18 g/mol; Chempur, Piekary Śląskie, Poland), sodium chloride pure p.a.  $\geq 99.9\%$  ( $\text{NaCl}$ ; 58.44 g/mol; Chempur, Piekary Śląskie, Poland), hydrochloric acid 12 mol ( $\text{HCl}$ , Chempur, Piekary Śląskie, Poland), sodium hydroxide 1 mol ( $\text{NaOH}$ , Chempur, Piekary Śląskie, Poland). All of the reagents used were of analytical reagent grade.

Materials used in the manufacture of ice cream mixtures: raw sheep milk was purchased from the farm “Owczka Zagroda” (Wyzne, Podkarpacie, Poland); inulin (Orafti HP, Oreya, Belgium); apple fiber (Aura Herbals Jarosław Paul, Sopot, Poland); and white sugar (Polish Sugar, Toruń, Poland). Five types of commercial freeze-dried starter cultures for direct vat set (*Lacticaseibacillus paracasei* L-26, *Lacticaseibacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12) were purchased from Chr. Hansen (Hoersholm, Denmark). These starter cultures are widely used by the dairy industry to produce probiotic fermented milk and are not genetically modified.

### 2.2. Ice Cream Manufacture

For each probiotic bacteria, 4 groups of mixtures with additives were prepared:

1. Sheep milk (89%) with sugar (11%);
2. Sheep milk (85%), sugar (11%), inulin (4%);
3. Sheep milk (85%), sugar (11%), inulin (1.5%), apple fiber (2.5%);
4. Sheep milk (85%), sugar (11%), apple fiber (4%).

Five groups of inoculum were prepared according to the method of Mituniewicz-Małek et al. [51] and Kowalczyk et al. [52]. Previously revived monocultures of probiotic

bacteria, in the amount of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ( $w/w$ ), were activated at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  until the pH was  $4.60 \pm 0.10$ . Bacteria inoculums were approximately  $9 \log \text{ CFU bacteria g}^{-1}$ . The inoculum was added to ice cream mixes in the amount of  $5\%$  ( $w/w$ ). Prior to adding inoculum, each mixture was homogenized with a homogenizer (CAT UNIDRIVE X 1000 D, Ballrechten-Dottingen, Germany) and then pasteurized at  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min. After the heat treatment, the mixtures were cooled to  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  and fermented in an incubator (cooled incubator ILW 115, POL-EKO-Aparatura, Wodzisław Śląski, Poland) at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for ten hours, then cooled to  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  and conditioned at this temperature for 12 h. The ice cream mixtures were frozen in a DeLux 48,816 freezer (UNOLD AG, Hockenheim, Germany) for 40–50 min with freezing temperatures down to  $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ . The ice cream was packed into 100 mL plastic cups and stored at  $-22 \text{ }^\circ\text{C}$  for seven days. The experiment was repeated three times. The ice cream was coded according to the probiotic bacteria type and the different fiber and inulin doses (Table 1).

**Table 1.** Ice cream experimental groups.

Bacterial Strain	Control Group	Group with 4% Inulin	Group with 2.5% Inulin and 1.5% Apple Fiber	Group with 4% Fiber
<i>Lactocaseibacillus casei</i> 431	CLC	ILC	IFLC	FLC
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	CLA	ILA	IFLA	FLA
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> L-26	CLP	ILP	IFLP	FLP
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	CLR	ILR	IFLR	FLR
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12	CBB12	IBB12	IFBB12	FBB12

### 2.3. In Vitro Digestion Process

In vitro gastrointestinal digestion was conducted according to the methods presented by Buniowska et al. [53] and Camelo-Silva et al. [54], with slight modifications. The process of simulated in vitro digestion of ice cream was carried out after seven days of storage at  $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ . The in vitro digestion method simulates the digestion stages that occur in the mouth, stomach and small intestine.

The in vitro digestion model was initiated from the oral stage. 50 mL of each sample was transferred to a 100 mL dark glass bottle and then mixed with 5 mL of salivary enzyme solution. The salivary solution was obtained by mixing and dissolving 2.38 g of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.19 g of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 8 g of NaCl, 100 mg/L of mucin and 150 mg/L  $\alpha$ -amylase with enzymatic activity 200 U/L, solution per 1 L of distilled water. The mixture of dissolved ice cream and saliva was adjusted to  $\text{pH } 6.75 \pm 0.20$  with HCl (12 mol/L) or NaOH (1 mol/L) and incubated in a shaking water bath at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  and 90 rpm for 10 min.

The stomach stage was initiated by adding 13.08 mg of pepsin to the sample after the oral stage, and the pH was reduced to  $2.0 \pm 0.20$  by adding HCl (12 mol/L). The sample with digestive contents was placed in a shaking water bath for 2 h at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  and 90 rpm.

To obtain the intestinal fraction, the oral and gastric contents were mixed with 5 mL pancreatin (4 g/L) and bile salt (25 g/L) at a pH value of  $7.00 \pm 0.20$  (HCl 12 mol/L or NaOH 1 mol/L) and incubation was continued for another 2 h ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 90 rpm).

The survival rate (%) was determined in terms of viable colony counts of probiotic bacteria remaining in the intestinal content relative to the non-digested sample, according to Equation (1):

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Viable counts of probiotic bacteria in digested sample} \times 100}{\text{Viable counts of probiotic bacteria in non-digested sample}} \quad (1)$$

#### 2.4. Microbiological Analysis

The survival rates of probiotic strains: *L. paracasei* L-26, *L. casei* 431, *L. acidophilus* LA-5, *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium* BB-12 were determined in ice cream before digestion and at each stage of simulated in vitro digestion (oral, stomach and intestinal stage) after seven days of storage at  $-22$  °C. According to the method of Znamirowska et al. [55], 10 g of each sample was diluted in 90 mL of sterile peptone water solution (0.1%) (BTL Sp. z o.o., Łódź, Poland). Serial dilutions were prepared between  $1 \log \text{ cfu g}^{-1}$  and  $8 \log \text{ cfu g}^{-1}$ . Inoculation was performed by the plate-deep method using MRS agar (Biocorp, Warsaw, Poland). A vacuum desiccator and GENbox anaer (Biomérieux, Warszawa, Poland) were used to maintain anaerobic conditions, while an Anaer indicator (Biomérieux, Warszawa, Poland) was used to monitor anaerobic conditions. The cultured probiotic colonies were counted using a colony counter (TYP J-3, Chemland, Stargard Szczeciński, Poland). The result was presented as  $\log \text{ cfu g}^{-1}$ .

#### 2.5. Statistical Analysis

From the obtained results, the mean and standard deviation were calculated using Statistica v. 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). One-, two-, and three-way ANOVA were performed. The significance of differences between the mean values was verified with the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

The  $p$ -value for the ANOVA determining the effect of bacterial type and inulin and apple fiber on the survival of probiotic bacteria in the simulated digestive system is included in the Supplementary Material.

### 3. Results

The number of bacterial cells in the ice cream before digestion was determined to evaluate the effect of adding inulin and apple fiber on the viability of probiotic strains during gastrointestinal passage. The results indicating the viable counts of probiotic bacteria of *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium* BB-12 are shown in Table 2.

Before digestion, the highest number of bacterial cells was determined in ice cream with *L. casei* (CLC, ILC, IFLC), while the lowest number was determined in ice cream with *L. acidophilus* (CLA, ILA). The number of probiotic bacteria cells in all tested ice cream groups before digestion exceeded  $6 \log \text{ CFU g}^{-1}$ , which qualifies this product as probiotic ice cream and initially guarantees a therapeutic effect. However, only the number of cells determined at the small intestine stage will accurately indicate probiotic activity.

During the freezing process, specific changes occur in ice cream manufacturing that cause the loss of metabolic characteristics due to changes in osmotic pressure in the cells. The ice crystals that form can mechanically damage the cell walls of probiotic bacteria. Adverse factors also include the effects of oxygen during the aeration of the mixture or during storage and high redox potential values [33]. However, substances that exhibit selective protective effects to reduce cell damage during freezing may be added to the ice mix. Cryoprotectants include milk, whey, prebiotics, saccharides and amino acids [56]. On the other hand, during product melting, chemical stressors, i.e., osmotic stress and high concentrations of components such as hydrogen ions, organic acids, oxygen and other components, can negatively affect probiotic cells. In our study, during the freezing and storage of ice cream and passage through the simulated digestive system, the addition of inulin, apple fiber, and sheep's milk performed protective functions for the probiotics.

**Table 2.** Survival [%] and viable counts of probiotic bacteria in ice cream ( $\log \text{cfu g}^{-1}$ ) before and during simulated in vitro digestion.

Group of Ice Cream	Viable Counts of Probiotic Bacteria in Ice Cream, $\log \text{cfu g}^{-1}$				Survival Rate, %
	Before Digestion	Simulated In Vitro Digestion Stage			
		Oral	Stomach	Small Intestine	
CLC	12.18 <sup>cb</sup> ± 0.40	12.12 <sup>cb</sup> ± 0.39	7.98 <sup>ba</sup> ± 0.57	6.94 <sup>aa</sup> ± 0.12	56.97
ILC	12.14 <sup>cb</sup> ± 0.32	12.03 <sup>cb</sup> ± 0.34	8.84 <sup>bb</sup> ± 0.27	7.81 <sup>ac</sup> ± 0.28	64.33
IFLC	12.57 <sup>cb</sup> ± 0.37	12.13 <sup>cb</sup> ± 0.26	9.47 <sup>bc</sup> ± 0.32	7.39 <sup>ab</sup> ± 0.18	58.79
FLC	11.80 <sup>ca</sup> ± 0.33	11.48 <sup>ca</sup> ± 0.13	8.15 <sup>bab</sup> ± 0.52	7.65 <sup>abc</sup> ± 0.16	64.83
CLA	10.73 <sup>ca</sup> ± 0.73	10.05 <sup>ca</sup> ± 0.10	5.01 <sup>aa</sup> ± 0.15	8.88 <sup>bd</sup> ± 0.21	82.75
ILA	10.24 <sup>ba</sup> ± 0.46	10.20 <sup>ba</sup> ± 0.44	5.26 <sup>aa</sup> ± 0.58	5.16 <sup>aa</sup> ± 0.23	50.39
IFLA	11.46 <sup>cb</sup> ± 0.61	11.22 <sup>cb</sup> ± 0.46	8.06 <sup>bc</sup> ± 0.24	7.02 <sup>ab</sup> ± 0.79	61.25
FLA	11.85 <sup>cb</sup> ± 0.96	11.78 <sup>cb</sup> ± 0.61	6.84 <sup>ab</sup> ± 0.29	8.49 <sup>bc</sup> ± 0.17	71.64
CBB12	11.47 <sup>ca</sup> ± 0.57	11.34 <sup>ca</sup> ± 0.51	8.48 <sup>ba</sup> ± 0.21	5.83 <sup>aa</sup> ± 0.14	50.82
IBB12	11.13 <sup>ca</sup> ± 0.56	10.83 <sup>ca</sup> ± 0.47	9.27 <sup>bb</sup> ± 0.22	8.09 <sup>ac</sup> ± 0.10	72.68
IFBB12	11.00 <sup>ca</sup> ± 0.35	10.61 <sup>ca</sup> ± 0.26	9.28 <sup>bb</sup> ± 0.18	5.91 <sup>aa</sup> ± 0.09	53.72
FBB12	11.17 <sup>ca</sup> ± 0.45	11.13 <sup>ca</sup> ± 0.69	8.66 <sup>ba</sup> ± 0.24	6.32 <sup>ab</sup> ± 0.16	56.58
CLP	11.28 <sup>ca</sup> ± 0.59	11.31 <sup>ca</sup> ± 0.58	5.04 <sup>aa</sup> ± 0.44	6.31 <sup>ba</sup> ± 0.39	55.93
ILP	11.37 <sup>ba</sup> ± 0.89	11.39 <sup>ba</sup> ± 0.50	5.74 <sup>ab</sup> ± 0.27	6.16 <sup>aa</sup> ± 0.31	54.17
IFLP	11.28 <sup>ba</sup> ± 0.60	11.19 <sup>ba</sup> ± 0.48	5.79 <sup>ab</sup> ± 0.22	6.11 <sup>aa</sup> ± 0.23	54.16
FLP	11.37 <sup>ca</sup> ± 0.88	11.35 <sup>ca</sup> ± 0.75	6.47 <sup>ac</sup> ± 0.27	7.64 <sup>bb</sup> ± 0.15	67.19
CLR	10.99 <sup>ca</sup> ± 0.42	10.98 <sup>ca</sup> ± 0.33	4.79 <sup>aa</sup> ± 0.24	5.21 <sup>ba</sup> ± 0.10	47.40
ILR	11.21 <sup>ca</sup> ± 0.36	11.12 <sup>ca</sup> ± 0.63	4.74 <sup>aa</sup> ± 0.21	6.53 <sup>bc</sup> ± 0.19	58.25
IFLR	11.21 <sup>ca</sup> ± 0.38	11.11 <sup>ca</sup> ± 0.45	4.54 <sup>aa</sup> ± 0.30	6.50 <sup>bc</sup> ± 0.39	57.98
FLR	11.25 <sup>ca</sup> ± 0.53	11.20 <sup>ca</sup> ± 0.29	4.77 <sup>aa</sup> ± 0.14	5.73 <sup>bb</sup> ± 0.26	50.93

Mean ± standard deviation;  $n$  (for each trial) = 9; a–c—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; A–D—mean values in columns obtained for a single bacterial strain denoted by different letters differ significantly  $p \leq 0.05$ ; CLC: control sample with *L. casei* 431; ILC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431; IFLC: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. casei* 431; FLC: sample with 4% fiber and *L. casei* 431; CLA: control sample with *L. acidophilus*; ILA: sample with 4% inulin and *L. acidophilus*; IFLA: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. acidophilus*; FLA: sample with 4% fiber and *L. acidophilus*; CBB12: control sample with *Bifidobacterium* BB12; IBB12: sample with 4% inulin and *Bifidobacterium* BB12; IFBB12: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *Bifidobacterium* BB12; FBB12: sample with 4% fiber and *Bifidobacterium* BB12; CLP: control sample with *L. paracasei* L-26; ILP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26; IFLP: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. paracasei* L-26; FLP: sample with 4% fiber and *L. paracasei* L-26; CLR: control sample with *L. rhamnosus*; ILR: sample with 4% inulin and *L. rhamnosus*; IFLR: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. rhamnosus*; FLR: sample with 4% fiber and *L. rhamnosus*.

A three-way analysis of variance indicated that the number of bacterial cells before digestion was significantly affected by the type of bacteria, the interaction between the type of bacteria ( $p = 0.000$ ), the interactions between bacterial type and inulin addition ( $p = 0.0003$ ), and the interactions between bacterial type and apple fiber addition ( $p = 0.0001$ ) (Table S1). It was also demonstrated that adding inulin to ice cream did not significantly increase the number of probiotic bacteria in ice cream compared to the control samples before digestion [57]. In ice cream fermented by *L. acidophilus*, it was shown that the addition of apple fiber significantly increased the number of viable cells before digestion, while in ice cream with *L. casei* 4%, the addition of apple fiber significantly reduced the number of cells of this probiotic.

The results in Table 2 show that at the end of the oral stage, there was no significant loss of probiotic viability in any ice cream group compared to the results obtained before digestion. These results are consistent with Melchior et al.'s [58] study, which also showed no significant effect of saliva activity on the viability of probiotic bacteria. Since the optimal

pH for these probiotics is 6.5 to 7.5 and saliva is 6.5 to 7.0, the pH in this environment is suitable for bacterial cell survival [59]. Venema et al. [60] showed that the intake of probiotics before, during or after a meal can significantly affect their survival rate. Since human physiological conditions in the gastrointestinal tract vary depending on the time of probiotic ingestion, they interact differently with the intestinal lining, which dissolves depending on the pH of the stomach. The pH in the stomach before meal consumption (pH~2.0) is different from that during the meal (increasing to pH 5.5–7.0 within 2–3 h) and 1 h after meal (decreasing pH to 2.5–4.0) and depends on the age of the host. In this study, the pH was reduced to about 2.0 during the stomach stage. As is commonly known, strongly acidic conditions typical of the gastric environment can damage the cell membranes of DNA and proteins. Meanwhile, in the small intestine, the presence of bile salts can damage protein DNA through oxidative shock and low intracellular pH. These factors usually result in a substantial reduction in cell viability during digestion [58,61].

Among the control samples, the CBB12 samples with *Bifidobacterium* BB-12 and the CLC samples with *L. casei* 431 were found to be the most susceptible to the acid stress that occurs during gastric passage, with population reductions of 73.93% and 65.52% compared to the number of viable cells before digestion. Slightly smaller population reductions in the stomach (43.59%) were found in the CLR control sample with *L. rhamnosus*. Probiotics must survive in the stomach's acidic environment if they reach the small intestine and colonize the host. *Lactobacillus* species are thought to be intrinsically acid resistant [62]. Although there are differences between species and strains, organisms generally show increased sensitivity at pH values below 3.0 [63,64]. Hence, acid tolerance is one of the desirable properties used to select potentially probiotic strains. The strong acidic environment in the stomach reduces the endogenous pH due to the intracellular accumulation of protons (H<sup>+</sup> ions) and also affects the trans-membrane pH. Lactic acid and acetic acid could penetrate the cell membrane and dissociate to form H<sup>+</sup>, reducing cytoplasmic pH and promoting transport across the membrane. Acid stress can cause damage to the cell membrane, DNA and proteins. Thus, acid resistance is one of the selection criteria for probiotics [65,66]. The resistance to an acidic environmental reaction by lactobacilli is due to the presence of a constant gradient between extracellular and cytoplasmic pH. Cellular functions are inhibited, and cells die when the internal pH reaches a critical limit [67]. The enzyme F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase is used by gram-positive organisms to protect themselves from acidic environmental conditions. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, induced at low pH, can increase intracellular pH at low extracellular pH [68]. It was concluded that the best survival rate of the gastric stage among the control samples was CBB12 with *Bifidobacterium* BB-12, where a population reduction of only 26.0% was found compared to the count before digestion. Furthermore, it was found that the addition of inulin to IBB12 ice cream increased gastric juice tolerance and reduced strain reduction to 16.7% compared to the number of bacterial cells before digestion. For IFBB12 samples with *Bifidobacterium* BB-12, replacing part of the inulin with apple fiber resulted in increased survival in the gastric stage and a poor reduction in the bacterial population of only 15.6% compared to the samples before digestion. However, the complete replacement of inulin with apple fiber in the IFBB12 ice cream resulted in a population reduction of 22.4%, but the survival rate was still 3.6% higher than in the CBB12 control sample. The obtained results indicate that the addition of these fibers to ice cream with *Bifidobacterium* BB-12 increases the survival of this strain in model gastric juice.

In the gastric stage, the positive effect of the addition of inulin and apple fiber was also demonstrated for ice cream samples fermented with *L. casei*, *L. acidophilus* and *L. paracasei*. The best survival of probiotics in the stomach was observed for ice cream samples with inulin partially replaced by IFLC apple fiber (population reduction of 24.6%, 29.6% and 48.6%, respectively, compared to live cells before digestion). This study demonstrated the highest sensitivity to simulated gastric stress for ice cream samples with *L. rhamnosus*. At the gastric stage, there was a reduction of 56.4% of the population in the CLR ice cream compared to the cell counts before digestion. Adding fibers to the samples with this strain resulted in an even higher 1–3% population reduction at the stomach stage compared

to the CLR control sample. In the FLC, FLA, FBB12 and FLP ice cream samples, the 4% addition of apple fiber (without inulin) was found to increase bacterial survival more effectively than the presence of a combination of inulin (2.5%) and apple fiber (1.5%) in the gastric juice.

Numerous studies confirm the improved survival rate of microencapsulated probiotics under simulated in vitro digestion [69,70] and report that, in a low pH environment, positively charged milk protein molecules repel each other, resulting in the dissolution of microcapsules and loss of bacterial protection. In addition, Afzaal et al.'s [71] study confirmed that a low pH (2.0) contributed to lower numbers of *L. casei* in simulated gastric juice. A faster reduction in cell counts (from 10.79 to 5.48 log<sub>10</sub> cfu/mL) was observed for ice cream samples with free probiotics compared to ice cream, where probiotics were encapsulated (10.72 to 7.65 log<sub>10</sub> cfu/mL). Other studies indicate that the addition of inulin to microencapsulated probiotics provides protection upon passage through the gastrointestinal tract [72].

The intestinal juice is secreted at a rate of 0.7 L per day. Its pH is around 8 and the concentration of mineral salts is about 0.5%. The factors determining the survival of bacteria in this section of the digestive tract are bile and the presence of enzymes. The second barrier to the survival of lactic fermentation bacteria in the gastrointestinal tract is bile acids produced in the liver from cholesterol and secreted into the duodenum. The concentration of bile acid salts fluctuates between 0.15% and 0.5%. Bile secreted into the digestive tract plays an important role in emulsifying lipids, especially since the fat content in the ice cream evaluated ranged from 6.2% to 6.4%. Furthermore, bile has the ability to affect phospholipids and cell membrane proteins and thus disrupt the cellular homeostasis of microorganisms [73,74]. Bile salts exhibit potent antimicrobial activity by changing the conformation of cell membrane proteins and lipids, resulting in altered membrane integrity and permeability. In addition, bile salts induce the production of free radicals, which cause DNA damage [15]. However, many strains of probiotic bacteria have well-developed bile resistance mechanisms [75]. In addition, food components can protect probiotic strains from the negative effects of digestive juices. Microbial adhesion can also be affected by the culture method, more specifically, the composition of the culture medium, the number of bacteria and the incubation time [76]. Lebeer et al. [76] showed that limiting glucose availability in the medium affected biofilm formation by *L. rhamnosus* GG.

In our study, the highest sensitivity to simulated intestinal stress was found for *Bifidobacterium* BB-12 due to a reduction in survival from 12.7–31.0% compared to the high number of cells determined in the stomach. It should be mentioned that Ruas-Madiedo et al. [77] detected EPS production by *Bifidobacterium* in the presence of bile and explained that EPS probably poses a defense mechanism against this toxic compound. Ruiz et al. [78] investigated the effect of bile on the fatty acid composition and membrane characteristics of *B. animalis* IPLA 4549 and its mutant with acquired bile resistance, *B. animalis* 4549dOx. According to these authors' studies, bile adaptation caused *B. animalis* 4549dOx to decrease membrane fluidity and protein: phospholipid ratio, as well as alter the fatty acid composition of the cell. Unfortunately, our study does not confirm the high tolerance of the *Bifidobacterium* strain BB-12 to bile.

Lower survival in the small intestine was also found for *L. casei*, which was lower by 6.1–21.9% compared to the number of bacteria determined in the stomach (Table 2). Our study confirmed that the 4% addition of inulin to ice cream increased the survival rates of *L. casei* and *Bifidobacterium* BB-12 under simulated intestinal juice with bile. The highest survival rate in the small intestine stage was reported in ice cream with *L. paracasei* and *L. rhamnosus*, as an increase in viable cells was observed in the small intestine compared to their count in the stomach. It should also be mentioned that good tolerance was found in the small intestine stage for the control sample with CLA and FLA apple fiber fermented by *L. acidophilus* compared to the number of cells of the strain determined in the stomach.

According to other authors' studies, the survival rate of probiotic strains gradually decreased during in vitro passage through the stomach and small intestine [79,80]. In

our study, the survival rate and tolerance of the transit of strains were evaluated using simulated *in vitro* digestion. When comparing the number of viable cells before digestion to the number of viable cells in the gut, we found the highest strain survival rate in the CLA control ice cream with *L. acidophilus* (82.7%). Presumably, the whey proteins in sheep milk contributed to better tolerance of *L. acidophilus* to the simulated digestive conditions of the gastrointestinal tract. In the study by de Figueiredo Furtado et al. [81], the physicochemical conditions of the gastric environment caused aggregation of fat droplets and partial hydrolysis of proteins, considering that whey proteins were resistant to gastric conditions. However, all proteins were extensively hydrolyzed after intestinal digestion, absorbing intestinal juices.

In ice cream with *L. acidophilus*, the addition of inulin and apple fiber resulted in a 11.1–31.4% reduction in the survival of this strain compared to the CLA sample. Meanwhile, the lowest survival rate was found in the CLR control ice cream with *L. rhamnosus*. As shown by the results in Table 2, the addition of inulin increased the survival rate of *L. rhamnosus* by 10.8% compared to the CLR control sample under simulated *in vitro* digestion conditions. An even higher survival rate (about 22%) after inulin addition compared to the control sample was found for the *Bifidobacterium* BB-12 strain. This is consistent with the findings of Tarifa et al. [47], where the survival rate of free and encapsulated cells of *L. casei* and *L. rhamnosus* in the absence of inulin significantly decreased, between 60% and 90%, after passage through the gastrointestinal tract, showing a 62.2% reduction in the *Lactobacillus* population in simulated *in vitro* digestion. Furthermore, Hu et al. [59] showed a 62.2% reduction in the *Lactobacillus* population in simulated *in vitro* digestion. In contrast, the addition of only apple fiber improved the survival of *Bifidobacterium* BB-12 under simulated *in vitro* digestion by only about 6% compared to the control. Similarly, the survival rate of *L. casei*, *L. paracasei*, and *L. acidophilus* was also highly affected by the 4% addition of apple fiber, where its increase under gastrointestinal passage conditions was determined to range from 5.7–11.2% compared to their control counterparts. In apple fiber, soluble pectin represents 40% of the content, and about half is insoluble cellulose [82]. Pectin and cellulose show less sensitivity to chemical agents and higher resistance to the gastric environment than alginate. Pectin and cellulose have been found to be suitable mucoadhesive materials [83], which can prolong the residence time and exposure time. Furthermore, they exist as aggregates of macromolecules in an acidic environment and are resistant to proteases and amylases, which are active in the upper gastrointestinal tract, which may explain the better survival of some bacterial strains [84].

Krasaekoopt and Bhandari [85] also found that when the synbiotic matrix absorbed bile salt in the intestine, an insoluble complex between the positive calcium ion and the negative cholate was formed electrostatically. It reduces the diffusion of bile salt into the matrix and inhibits the interaction between bile salt and trapped cells. Moreover, Li and Zhang [86] reported for *L. rhamnosus* that pectin cross-links with  $\text{Ca}^{2+}$  to protect probiotic cells from acid inactivation. *Bifidobacterium* ssp. show poor pectin degradation but are adapted to degrade side chains from arabinose and galactan [87]. In a subsequent study, pectin encapsulation was found to improve the survivability of *L. rhamnosus* in gastric environments at a very low pH [88]. Gebara and Chaves [89] described a similar study in which pectin-encapsulated *Lactobacillus acidophilus* showed less reduction (1.51 log cycles) than unencapsulated cells (3.54 log cycles) when incubated in gastric and intestinal juices. Additionally, a study by Tarifa et al. [47] showed that *L. casei* and *L. rhamnosus* coated with pectin and inulin could improve viability under gastrointestinal conditions compared to free cells. At the end of the sequence, the survival rate of *L. casei* 393 was 51.00%, and the survival rate for *L. rhamnosus* was 61.00%.

In our study, in the small intestine stage, only five ice cream groups (ILA, CBB12, IFBB12, CLR and FLR) had bacterial cell counts below  $6 \log \text{cfu g}^{-1}$ , but higher than  $5 \log \text{cfu g}^{-1}$ . In the remaining ice cream groups, the number of viable bacterial cells ranged from 6.11 to  $8.88 \log \text{cfu g}^{-1}$ , which qualifies them as probiotic ice cream and guarantees a therapeutic effect.

The three-way analysis of variance indicated that the survival rate and tolerance to conditions in the small intestine were significantly influenced by all the factors analyzed (inulin, apple fiber, type of bacteria) and their interactions.

The gastrointestinal tract passage might not be sufficient for good intestinal colonization [90]. Since the adhesion of bacteria to the intestinal epithelium affects their residence time in the gastrointestinal tract, this ability is considered an important criterion when selecting probiotic strains [91]. Bacterial binding to intestinal epithelial cells is not regulated by one specific molecule but by several different factors. These include cell wall elements, various proteins, the presence of intestinal mucus and environmental conditions.

Adhesion is a process that allows microorganisms to adhere to other cells or surfaces [15]. Structures located on the surface of microbial cells directly affect this process. Factors affecting the adhesion process of the probiotic bacterium *Lactobacillus* ssp. can be divided into protein, non-protein, environmental, aggregation capacity and hydrophobicity. Factors such as bile salts, low pH, digestive enzymes or oxidative and osmotic stress affect the cell wall properties of lactobacilli and, thus, their adhesion abilities. Tuomola et al. [92] showed that applying digestive enzymes (trypsin and pepsin) reduced *L. acidophilus* LA-1 adhesion, indicating that the outer protein layer of the cell wall plays an essential role in cell adhesion. Moreover, Lim and Ahn [93], who studied the effect of proteolytic enzymes on the adhesion capacity of seven *Lactobacillus* strains, showed that *L. plantarum* GK81, *L. acidophilus* GK20, and *L. paracasei* GK74 strains, after incubation with pepsin, protease and trypsin, showed significantly lower adhesion to Caco-2 cells (immortalized cell line of human colorectal adenocarcinoma cells). It was also observed that the adhesion of probiotic strains is related to the growth phase of the microorganisms and that cells in the logarithmic growth phase adhere better than cells in the stationary phase [76].

Additionally, for probiotic bacteria to benefit the host, they need to reach a sufficient mass. Therefore, the ability to aggregate is desirable among probiotic strains [94]. The formation of aggregates between cells of the same strain is autoaggregation or self-aggregation, while coaggregation occurs between different strains and even species [95]. These properties are essential in colonizing various environments, especially the intestines, oral cavity and genitourinary tract, by probiotic bacteria. Autoaggregation of probiotic strains is essential in the process of microbial adhesion to the intestinal epithelium [15].

#### 4. Conclusions

The popularity of frozen desserts continues to grow with new varieties and flavors. Food manufacturers can provide consumers with healthier probiotic- and prebiotic-providing frozen dessert options. An additional nutritional benefit would be for food manufacturers to provide a product that qualifies as probiotic ice cream and pre-guarantees a therapeutic effect, similar to the probiotic strains provided with drugs and food supplements. Sheep milk functional ice cream is a food product that contains valuable bioactive ingredients that offer health benefits beyond their nutritional value. The bioactive ingredients are synbiotics, a combination of probiotics and prebiotics, which are generally important for gut health.

The conducted studies clearly indicate that sheep milk ice cream could provide a suitable matrix for the delivery of probiotics from commercial dairy cultures and prebiotics and could contribute to intestinal homeostasis. The results indicated that in the small intestinal phase, all groups had a higher probiotic content than  $5 \log \text{cfu g}^{-1}$ , demonstrating a good survival rate.

Evaluating the effect of fiber addition on the survival of probiotic bacterial strains in the gastrointestinal tract would be helpful in developing new and innovative products with enhanced health properties tailored to the needs of the intestinal ecosystem.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu14214454/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K. and A.Z.-P.; methodology, M.K., A.Z.-P. and M.B.-O.; software, M.K. and A.Z.-P.; validation, M.K. and A.Z.-P.; formal analysis, M.K. and A.Z.-P.; investigation, M.K.; resources, M.K.; writing—original draft preparation, M.K., A.Z.-P. and M.P.; writing—review and editing, M.K., A.Z.-P. and M.P.; supervision, A.Z.-P.; project administration, M.K.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The project is funded by the program of the Minister of Education and Science named “Regional Initiative of Excellence” in the years 2019–2023, grant number 026/RID/2018/19.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original data presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ares, G.; Giménez, A.; Gámbaro, A. Consumer-perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts. Influence of ingredient, ingredient name and health claim. *Food Qual. Prefer.* **2009**, *20*, 50–56. [CrossRef]
2. Ranadheera, C.S.; Naumovski, N.; Ajlouni, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *22*, 109–114. [CrossRef]
3. Rasika, D.M.D.; Munasinghe, M.A.D.D.; Vidanarachchi, J.K.; da Cruz, A.G.; Ajlouni, S.; Ranadheera, C.S. Probiotics and prebiotics in non-bovine milk. *Adv. Food Nutr. Res.* **2020**, *94*, 339–384. [CrossRef]
4. Chia, J.; Burrow, K.; Carne, A.; McConnell, M.; Samuelsson, L.; Day, L.; Young, W.; Bekhit, A.E.-D. Minerals in Sheep milk. In *Nutrients in Milk and Their Implications on Health and Disease*; Watson, R.R., Collier, R.J., Preedy, V., Eds.; Elsevier Publishing: London, UK, 2017; pp. 345–363. [CrossRef]
5. Dominguez, D.C. Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 291–297. [CrossRef] [PubMed]
6. Purwandari, U.; Vasiljevic, T. Microbial growth, EPS concentration and textural properties of fermented milk supplemented with calcium and whey protein analysed using response surface methodology. *Int. Food Res. J.* **2012**, *19*, 85–93.
7. Ng, I.S.; Xue, C. Enhanced exopolysaccharide production and biological activity of *Lactobacillus rhamnosus* ZY with calcium and hydrogen peroxide. *Process Biochem.* **2017**, *52*, 295–304. [CrossRef]
8. Pu, M.; Storms, E.; Chodur, D.M.; Rowe-Magnus, D.A. Calcium-dependent site-switching regulates expression of the atypical *iam* pilus locus in *Vibrio vulnificus*. *Environ. Microbiol.* **2020**, *22*, 4167–4182. [CrossRef] [PubMed]
9. FAO; WHO. Joint Expert Consultation Report: Evaluations of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina. 2001. Available online: [http://www.fao.org/documents/pub\\_dett.asp?lang=en&pub\\_id=61756/](http://www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=61756/) (accessed on 27 September 2022).
10. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Berni Canani, R.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [CrossRef]
11. Dale, H.F.; Rasmussen, S.H.; Asiller, Ö.Ö.; Lied, G.A. Probiotics in irritable bowel syndrome: An up-to-date systematic review. *Nutrients* **2019**, *11*, 2048. [CrossRef]
12. Barichella, M.; Pacchetti, C.; Bolliri, C.; Cassani, E.; Lorio, L.; Pusani, C.; Pinelli, G.; Privitera, G.; Cesari, I.; Faierman, S.A.; et al. Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease: An RCT. *Neurology* **2016**, *87*, 1274–1280. [CrossRef]
13. Toejing, P.; Khampithum, N.; Sirilun, S.; Chaiyasut, C.; Lailerd, N. Influence of *Lactobacillus paracasei* HII01 Supplementation on Glycemia and Inflammatory biomarkers in Type 2 Diabetes: A randomized clinical trial. *Foods* **2021**, *10*, 1455. [CrossRef] [PubMed]
14. Lv, T.; Ye, M.; Luo, F.; Hu, B.; Wang, A.; Chen, J.; Yan, J.; He, Z.; Chen, F.; Qian, C.; et al. Probiotics treatment improves cognitive impairment in patients and animals: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2021**, *120*, 159–172. [CrossRef] [PubMed]
15. Paliwoda, A.; Nowak, A. Czynniki warunkujące zdolności adhezyjne bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (In Polish). Factors determining the adhesive capacity of *Lactobacillus* bacteria. *Post. Mikrobiol.-Adv. Microbiol.* **2017**, *56*, 196–204. [CrossRef]
16. Umu, Ö.C.O.; Rudi, K.; Diep, D.B. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2017**, *28*, 1348886. [CrossRef]
17. Gajewska, J.; Błaszczuk, M.K. Probiotyczne Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) (In Polish). Probiotic Lactic Fermentation Bacteria (LAB). *Post. Mikrobiol.* **2012**, *51*, 55–65.
18. Castro-Bravo, N.; Wells, J.M.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2426. [CrossRef]

19. Kumar, M.; Verma, V.; Nagpal, R.; Kumar, A.; Gautam, S.K.; Behare, P.V.; Grover, C.R.; Aggarwal, P.K. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB1-induced hepatocellular carcinoma. *Gene* **2011**, *490*, 54–59. [[CrossRef](#)]
20. Haskard, C.; Binnion, C.; Ahokas, J. Czynniki wpływające na sekwestrację aflatoksyny przez *Lactobacillus rhamnosus* GG (In Polish). Factors affecting aflatoxin sequestration by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *128*, 39–49. [[CrossRef](#)]
21. Femia, A.P.; Luceri, C.; Dolara, P.; Giannini, A.; Biggeri, A.; Salvadori, M.; Clune, Y.; Collins, K.J.; Paglierani, M.; Caderni, G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1953–1960. [[CrossRef](#)]
22. Nagpal, R.; Kumar, A.; Kumar, M.; Behare, P.V.; Jain, S.; Yadav, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *334*, 1–15. [[CrossRef](#)]
23. Pereira, D.I.A.; Gibson, G.R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and *bifidobacteria* isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4689–4693. [[CrossRef](#)]
24. Ishimwe, N.; Daliri, E.B.; Lee, B.H.; Fang, F.; Du, G. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 94–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kolaček, S.; Hojsak, I.; Berni-Canani, R.; Guarino, A.; Indrio, F.; Orel, R.; Pot, B.; Shamir, R.; Szajewska, H.; Vandenplas, Y.; et al. Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2017**, *65*, 117–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Auclair, J.; Frappier, M.; Millette, M. Lactobacillus acidophilus CL1285, Lactobacillus casei LBC80R, and Lactobacillus rhamnosus CLR2 (Bio-K+): Characterization, Manufacture, Mechanisms of Action, and Quality Control of a Specific Probiotic Combination for Primary Prevention of Clostridium difficile Infection. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 135–143. [[CrossRef](#)]
28. Grześkowiak, Ł.; Isolauri, E.; Salminen, S.; Gueimonde, M. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 887–894. [[CrossRef](#)]
29. Nivoliez, A.; Camares, O.; Paquet-Gachinat, M.; Bornes, S.; Forestier, C.; Veisseire, P. Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35<sup>®</sup>. *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 236–241. [[CrossRef](#)]
30. König, H.; Berkelmann-Löhnertz, B. Maintenance of wine-associated microorganisms. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*; König, H., Gottfried, U., Fröhlich, J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 549–572.
31. Ślizewska, K.; Chlebicz-Wójcik, A. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology* **2020**, *9*, 423. [[CrossRef](#)]
32. Oliveira, R.P.S.; Perego, P.; Converti, A.; Oliveira, M.N. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. *LWT Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1015–1021. [[CrossRef](#)]
33. Mohammadi, R.; Mortazavian, A.M.; Khosrokhavar, R.; Cruz da Gomes, A. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 411–424. [[CrossRef](#)]
34. Hekmat, S.; McMahon, D. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *J. Dairy Sci.* **1992**, *75*, 1415–1422. [[CrossRef](#)]
35. Kailasapathy, K.; Sultana, K. Survival of β-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. *Aust. J. Dairy Technol.* **2003**, *58*, 223–227.
36. Muninathan, C.; Guruchandran, S.; Viswanath Kalyan, A.J.; Ganesan, N.D. Microbial exopolysaccharides: Role in functional food engineering and gut-health management. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2021**, *57*, 27–34. [[CrossRef](#)]
37. Lee, Y.K.; Salminen, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2009; pp. 535–581. [[CrossRef](#)]
38. Sangami, R.; Sri, S.R. Emerging trends in improving viability, advanced stability techniques and health claims of healthy microbiome—The probiotics. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 194–200. [[CrossRef](#)]
39. Ranadhera, S.; Evans, C.; Adams, M.C.; Baines, K.S. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 619–625. [[CrossRef](#)]
40. Carvalho Lima, K.G.; Kruger, M.F.; Behrens, J.; Destro, M.T.; Landgraf, M.; Franco, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT—Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 491–495. [[CrossRef](#)]
41. Qi, X.; Al-Ghazzewi, F.H.; Tester, R.F. Dietary fiber, gastric emptying, and carbohydrate digestion: A mini-review. *Starch-Stärke* **2018**, *70*, 1700346. [[CrossRef](#)]
42. Zhang, H.; Li, Z.; Zhang, L.; Lai, P.F.H.; Tian, Y.; Cui, S.W.; Ai, L. Effects of soluble dietary fibers on the viscosity property and digestion kinetics of corn starch digesta. *Food Chem.* **2021**, *338*, 127825. [[CrossRef](#)]
43. Pabari, K.; Pithva, S.; Kothari, C.; Purama, R.K.; Kondepudi, K.K.; Vyas, B.R.M.; Kothari, R.; Ambalam, P. Evaluation of Probiotic Properties and Prebiotic Utilization Potential of *Weissella paramesenteroides* Isolated From Fruits. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2020**, *12*, 1126–1138.
44. Cai, Y.; Folkerts, J.; Folkerts, G.; Maurer, M.; Braber, S. Microbiota-dependent and -independent effects of dietary fibre on human health. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 1363–1381. [[CrossRef](#)]

45. Ahmad, A.M.R.; Ahmed, W.; Iqbal, S.; Javed, M.; Rashid, S.; Haq, U.L. Prebiotics and iron bioavailability? Unveiling the hidden association—A review. *Trends Food. Sci. Technol.* **2021**, *110*, 584–590. [[CrossRef](#)]
46. Rossi, M.; Corradini, C.; Amaretti, A.; Nicolini, M.; Pompei, A.; Zano, N.S.; Matteuzzi, D. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by *Bifidobacteria*: A Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Appl. Environ. Microb.* **2005**, *71*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tarifa, M.C.; Piqueras, C.M.; Genovese, D.B.; Brugnoli, L.I. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in pectin and pectin-inulin microgel particles: Effect on bacterial survival under storage conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *179*, 457–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Genovese, A.; Balivo, A.; Salvati, A.; Sacchi, R. Functional ice cream health benefits and sensory implications. *Food Res. Int.* **2022**, *161*, 111858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Man, S.; Liu, T.; Yao, Y.; Lu, Y.; Ma, L.; Lu, F. Friend or foe? The roles of inulin-type fructans. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *15*, 117155. [[CrossRef](#)]
50. Jacobsen, N.M.Y.; Caglayan, I.; Caglayan, A.; Bar-Shalom, D.; Mullertz, A. Achieving delayed release of freeze-dried probiotic strains by extrusion, spheronization and fluid bed coating—Evaluated using a three-step in vitro model. *Int. J. Pharm.* **2020**, *591*, 120022. [[CrossRef](#)]
51. Mituniewicz-Małek, A.; Ziarno, M.; Dmytrów, I.; Balejko, J. Short Communication: Effect of the Addition of *Bifidobacterium* Monocultures on the Physical, Chemical, and Sensory Characteristics of Fermented Goat Milk. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 6972–6979. [[CrossRef](#)]
52. Kowalczyk, M.; Znamirowska, A.; Pawlos, M.; Buniowska, M. The Use of Olkusz Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream. *Animals* **2022**, *12*, 70. [[CrossRef](#)]
53. Buniowska, M.; Carbonell-Capella, J.M.; Frigola, A.; Esteve, M.J. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1834–1842. [[CrossRef](#)]
54. Silva, C.C.; da Silva Barros, E.L.; Verruck, S.; Maran, B.M.; Canella, M.H.M.; Esmerino, E.A.; Ramon Silva, R.; Prudencio, E.S. How ice cream manufactured with concentrated milk serves as a protective probiotic carrier? An in vitro gastrointestinal assay. *Food Sci. Technol.* **2022**, *42*, 28621. [[CrossRef](#)]
55. Znamirowska, A.; Szajnar, K.; Pawlos, M. Effect of Vitamin C Source on Its Stability during Storage and the Properties of Milk Fermented by *Lactobacillus rhamnosus*. *Molecules* **2021**, *26*, 6187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Szosland-Fałtyń, A.M. Lody probiotyczne—zdrowe łakocie. (In Polish). Probiotic ice cream—healthy treats. *Przemysł Spożywczy* **2007**, *5*, 42–44.
57. Ahmad, I.; Khaliq, A.; Shahid, M.Q.; Ahid Rashid, A.; Faiz, F.; Ikram, M.A.; Ahmed, S.; Imran, M.; Khan, M.A.; Nadeem, M.; et al. Studying the Influence of Apple Peel Polyphenol Extract Fortification on the Characteristics of Probiotic Yoghurt. *Plants* **2020**, *9*, 77. [[CrossRef](#)]
58. Melchior, S.; Marino, M.; Innocente, N.; Calligaris, S.; Nicoli, M.C. Effect of different biopolymer-based structured systems on the survival of probiotic strains during storage and in vitro digestion. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 3902–3909. [[CrossRef](#)]
59. Hu, X.; Liu, C.; Zhang, H.; Hossen Md, A.; Sameen, D.E.; Dai, J.; Qin, W.; Liu, Y.; Li, S. In vitro digestion of sodium alginate/pectin co-encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and its application in yogurt bilayer beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 1050–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Venema, K.; Verhoeven, J.; Verbruggen, S.; Espinosa, L.; Courau, S. Probiotic survival during a multi-layered tablet development as tested in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the stomach and small intestine (TIM-1). *Let. Appl. Microbiol.* **2019**, *69*, 325–332. [[CrossRef](#)]
61. Amund, O.D. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Can. J. Microbiol.* **2016**, *62*, 715–725. [[CrossRef](#)]
62. Tannock, G.W. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3189–3194. [[CrossRef](#)]
63. Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Jalaludin, S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Let. Appl. Microbiol.* **1998**, *27*, 183–185. [[CrossRef](#)]
64. Wu, C.H.; Hsueh, Y.H.; Kuo, J.M.; Liu, S.J. Characterization of a Potential Probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and Efficient Production of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Batch Fermentation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 143. [[CrossRef](#)]
65. Corcoran, B.M.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.; Ross, R.P. Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 1382–1399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wesche, A.M.; Gurtler, J.B.; Marks, B.P.; Ryser, E.T. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial food pathogens. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 1121–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Corcoran, B.M.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3060–3067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Fortier, L.C.; Tourdot-Maréchal, R.; Diviès, C.; Lee, B.H.; Guzzo, J. Induction of *Oenococcus oeni* H<sup>+</sup>-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *222*, 165–169. [[CrossRef](#)]
69. Verruck, S.; de Carvalho-Wolf, M.; Rodrigues, L.G.; Amante, E.R.; Werneck-Vieira, C.R.; de Mello-Castanho, R.D.A.; Schwinden-Prudencio, E. Survival of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. *Small Rumin. Res.* **2017**, *153*, 48–56. [[CrossRef](#)]

70. Liu, H.; Gong, J.; Chabot, D.; Miller, S.S.; Cui, S.W.; Ma, J.; Zhong, F.; Wang, Q. Incorporation of polysaccharides into sodium caseinate-low melting point fat microparticles improves probiotic bacterial survival during simulated gastrointestinal digestion and storage. *Food Hydrocoll.* **2016**, *54*, 328–337. [[CrossRef](#)]
71. Afzaal, M.; Khan, A.U.; Saeed, F.; Arshad, M.S.; Khan, M.A.; Saeed, M.; Maan, A.A.; Khan, M.K.; Ismail, Z.; Ahmed, A.; et al. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 1649–1656. [[CrossRef](#)]
72. Krasaekoopt, W.; Watcharapoka, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT—Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 761–766. [[CrossRef](#)]
73. Ozkan, E.R.; Demirci, T.; Ozturk, H.I.; Akin, N. Screening *Lactobacillus* strains from artisanal Turkish goatskin casing Tulum cheeses produced by nomads via molecular and in vitro probiotic characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 2799–2808. [[CrossRef](#)]
74. Jensen, H.; Grimmer, S.; Naterstad, K.; Axelsson, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *1*, 216–222. [[CrossRef](#)]
75. Lebeer, S.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S.C. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 728–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Ouwehand, A.C.; Salminen, S. In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: A review. *Microb. Ecol.* **2003**, *15*, 175–184. [[CrossRef](#)]
77. Ruas-Madiero, P.; Gueimonde, M.; Arigoni, F.; de los Reyes-Gavilan, C.G.; Margolles, A. Bile Affects the Synthesis of Exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Appl. Environ. Microb.* **2009**, *4*, 1204–1207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Ruiz, L.; Sánchez, B.; Ruas-Madiedo, P.; Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A. Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis as a response to bile. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *274*, 316–322. [[CrossRef](#)]
79. Aboulfazli, F.; Baba, A.S. Effect of Vegetable Milk on Survival of Probiotics in Fermented Ice Cream under Gastrointestinal Conditions. *Food Sci. Technol. Res.* **2015**, *21*, 391–397. [[CrossRef](#)]
80. Mishra, V.; Prasad, D. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *103*, 109–115. [[CrossRef](#)]
81. Furtado, G.F.; Almeida, F.S.; Sato, A.C.K.; Hubinger, M.D. Model infant formulas: Influence of types of whey proteins and lipid composition on the in vitro static digestion behavior. *Food Res. Inter.* **2022**, *161*, 111835. [[CrossRef](#)]
82. Aprikian, O.; Levrat-Verny, M.A.; Besson, C.; Buserrolles, J.; Révész, C.; Demigné, C. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chem.* **2001**, *75*, 445–452. [[CrossRef](#)]
83. Munarin, F.; Tanzi, M.C.; Petrini, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 681–689. [[CrossRef](#)]
84. Shinohara, K.; Ohashi, Y.; Kawasumi, K.; Terada, A.; Fujisawa, T. Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe* **2010**, *16*, 510–515. [[CrossRef](#)]
85. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 737–743. [[CrossRef](#)]
86. Li, R.; Zhang, Y.; Polk, D.B.; Tomasula, P.M.; Yan, F.; Liu, L. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *J. Control. Release* **2016**, *28*, 79–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Pascale, N.; Gu, F.; Larsen, N.; Jespersen, L.; Respondek, F. The Potential of Pectins to Modulate the Human Gut Microbiota Evaluated by In Vitro Fermentation: A Systematic Review. *Nutrients* **2022**, *14*, 3629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Gerez, C.L.; de Valdes, G.F.; Gigante, M.L.; Grosso, C.R.F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Let. Appl. Microbiol.* **2012**, *54*, 552–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Gebara, C.; Chaves, K.S.; Ribeiro, M.C.E.; Souza, F.N.; Grosso, C.R.F.; Gigante, M.L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 872–878. [[CrossRef](#)]
90. Kadlec, R.; Jakubec, M. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 1983–1990. [[CrossRef](#)]
91. Laparra, J.M.; Sanz, Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Let. Appl. Microbiol.* **2009**, *49*, 695–701. [[CrossRef](#)]
92. Tuomola, E.M.; Salminen, S.J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *41*, 45–51. [[CrossRef](#)]
93. Lim, S.M.; Ahn, D.H. Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 1731–1739. [[CrossRef](#)]
94. Collado, M.C.; Surono, I.; Meriluoto, J.; Salminen, S. Indigenous dadih lactic acid bacteria: Cell-surface properties and interactions with pathogens. *Food Microbiol. Safety* **2007**, *3*, 89–93. [[CrossRef](#)]
95. Nikolic, M.; Jovicic, B.; Kojic, M.; Topisirovic, L. Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 925–931. [[CrossRef](#)]

## Article

# Bioavailability of Macroelements from Synbiotic Sheep's Milk Ice Cream

Magdalena Kowalczyk <sup>1,\*</sup>, Agata Znamiorska-Piotrowska <sup>1,\*</sup>, Magdalena Buniowska-Olejnik <sup>1</sup>,  
Grzegorz Zaguła <sup>2</sup> and Małgorzata Pawlos <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dairy Technology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszów, Ćwiklińskiej 2D, 35-601 Rzeszów, Poland; mbuniowska@ur.edu.pl (M.B.-O.); mpawlos@ur.edu.pl (M.P.)

<sup>2</sup> Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food and Nutrition Technology, College of Natural Science, University of Rzeszów, Ćwiklińskiej 2D, 35-601 Rzeszów, Poland; gzagula@ur.edu.pl

\* Correspondence: mkowalczyk@ur.edu.pl (M.K.); aznamiorska@ur.edu.pl (A.Z.-P.)

**Abstract:** To determine the potential bioavailability of macroelements (Ca, Mg, P, K), probiotic ice cream samples (*Lactaseibacillus paracasei* L-26, *Lactobacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactaseibacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12) from sheep's milk with inulin, apple fiber and inulin, or apple fiber and control samples were submitted to in vitro digestion in the mouth, stomach and small intestine. The bioavailability of calcium in the ice cream samples ranged from 40.63% to 54.40%, whereas that of magnesium was 55.64% to 44.42%. The highest bioavailability of calcium and magnesium was shown for the control samples. However, adding 4% inulin reduced the bioavailability of calcium by about 3–5% and magnesium only by about 5–6%. Adding 4% apple fiber reduced the bioavailability of calcium by as much as 6–12% and magnesium by 7–8%. The highest bioavailability of calcium was determined in ice cream with *L. paracasei*, and the highest bioavailability of magnesium was determined in ice cream with *L. casei*. The bioavailability of phosphorus in ice cream ranged from 47.82% to 50.94%. The highest bioavailability of phosphorus (>50%) was in sheep ice cream fermented by *B. animalis*. In the control ice cream, the bioavailability of potassium was about 60%. In ice cream with inulin, the bioavailability of potassium was lower by 3–4%, and in ice cream with apple fiber, the bioavailability of potassium was lower by up to 6–9%. The bioavailability of potassium was significantly influenced only by the addition of dietary fiber. The results of the study confirmed the beneficial effect of bacteria on the bioavailability of Ca, Mg and P.

**Keywords:** ice cream; sheep milk; probiotic; prebiotic; macroelements; bioavailability; in vitro



**Citation:** Kowalczyk, M.; Znamiorska-Piotrowska, A.; Buniowska-Olejnik, M.; Zaguła, G.; Pawlos, M. Bioavailability of Macroelements from Synbiotic Sheep's Milk Ice Cream. *Nutrients* **2023**, *15*, 3230. <https://doi.org/10.3390/nu15143230>

Academic Editors: Renata Markiewicz-Żukowska and Małgorzata Brzóska

Received: 26 June 2023  
Revised: 19 July 2023  
Accepted: 19 July 2023  
Published: 20 July 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Sheep's milk is a valuable source of minerals. Macronutrients occur in sheep's milk in substantially higher concentrations than in cow's or goat's milk (calcium 193 mg 100 g<sup>-1</sup>, magnesium 18 mg 100 g<sup>-1</sup>, phosphorus 158 mg 100 g<sup>-1</sup>, sodium 44 mg 100 g<sup>-1</sup> and potassium 136 mg 100 g<sup>-1</sup>) [1,2].

In milk, micelles are bound by calcium phosphate and small amounts of magnesium and citrate [3]. Micelles are characterized by different sizes in the milk of various animal species [4,5]. Camel milk features micelles with the largest diameter (380 nm), while goat milk is 260 nm and sheep milk is 180 nm, which may also affect the variations in the bioavailability of macronutrients. Another characteristic of sheep's milk is the richness of vitamin D, which promotes calcium absorption and contributes to the proper development of the skeletal system [6].

The mineral composition may differ from the content in dairy products. It was found that such differences may be the consequence of the processing factors applied, including

heat treatment, homogenization or pasteurization, fermentation, type of starter culture and fermentation time, as well as storage conditions and time [7–9]. These factors generally lead to structural changes, which may affect digestion, the kinetics of mineral delivery and, consequently, the bioavailability of these components [10,11].

Minerals are mainly absorbed in the small intestine. The bioavailability of minerals strongly depends on a human's age and health status, the type of product consumed, the form of the compound, the interaction between minerals contained in the product, technological processing and pH. The bioavailability of minerals is significantly influenced by probiotic bacteria, gastrointestinal microflora and prebiotics [12].

Enzymes in the small intestine do not digest prebiotics such as inulin and apple fiber, and these prebiotics stimulate the growth and activity of probiotic bacteria by undergoing fermentation [13,14], play essential roles in the prevention and treatment of disease, lower sugar and cholesterol levels and contain minerals. Numerous studies indicate that inulin and oligosaccharides, especially fructooligosaccharides (FOSs), may increase the absorption of minerals, including calcium and magnesium [15–18].

Probiotic bacteria colonizing the intestines are believed to contribute to the bioavailability of calcium and magnesium [19–22]. Bioavailability is defined as the intake of a nutrient in food that passes through the gastrointestinal tract, is absorbed, reaches tissues and is used in physiological functions of the body or stored. Therefore, bioavailability studies are essential to better assess the mineral content provided by foods. An effective way to determine the bioavailability of nutrients is the use of in vitro digestion models.

As a popular dessert consumed worldwide, dairy ice cream can be an excellent carrier of minerals. Adding probiotic bacteria, inulin and apple fiber could potentially help improve the bioavailability of macronutrients, a crucial issue. There is no information on the bioavailability of Ca, K, Mg and P from sheep's milk ice cream manufactured from mixes fermented by probiotic strains. The differences in milk composition (macro- and microscale) of different species mean that further research is needed to determine the most appropriate types of milk and milk products to improve the bioavailability of micro- and macronutrients [22–24]. Therefore, to determine the potential bioavailability of macronutrients (Ca, Mg, P, K), probiotic ice cream samples (*Lactaseibacillus paracasei* L-26, *Lactobacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactaseibacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12) from sheep milk with inulin, apple fiber and inulin, or apple fiber and control samples were subjected to in vitro enzymatic digestion.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Digestive enzymes: heat-stable  $\alpha$ -amylase (TDF-100A, 24 975 U ML<sup>-1</sup>), mucin from the porcine stomach (type II), pepsin from the porcine gastric mucosa (250 U mg<sup>-1</sup> solid), porcine bile extract and pancreatin from the porcine pancreas (8 × USP specifications) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Reagents: di-sodium hydrogen phosphate anhydrous pure p.a.  $\geq 99.0\%$  (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 141.96 g mol<sup>-1</sup>), di-potassium hydrogen phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 174.18 g mol<sup>-1</sup>), sodium chloride pure p.a.  $\geq 99.9\%$  (NaCl; 58.44 g mol<sup>-1</sup>), hydrochloric acid (12 M HCl) and sodium hydroxide (1 M NaOH) were supplied by Chempur (Piekary Śląskie, Poland). All of the reagents used were of analytical reagent grade. Nitric acid (HNO<sub>3</sub>) was provided by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). EDTA disodium salt (EDTA Na<sub>2</sub> 0.01 M), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>; 2%), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M) and sodium dodecyl sulfate (0.1%) were also purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MRS agar and peptone media were purchased from Biocorp (Warszawa, Poland). The cellulose membrane for dialyzing (avg. flat width 25 mm, molecular weight cut-off = 14,000) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Raw sheep's milk for the production of ice cream mixtures was obtained from a farm in Wyzne, Podkarpacie, Poland (5.34 ± 0.2% protein, 6.20 ± 0.3% fat, 5.01 ± 0.12% lactose, pH 6.8 ± 0.12). Inulin (carbohydrates 97 g 100 g<sup>-1</sup>, including sugars 7 g 100 g<sup>-1</sup>, fiber

90 g 100 g<sup>-1</sup>, fat 0 g 100 g<sup>-1</sup> and protein 0 g 100 g<sup>-1</sup>; Orafit HP, Oreya, Belgium), 100% micronized apple fiber (carbohydrates 87 g 100 g<sup>-1</sup>, including sugars 27 g 100 g<sup>-1</sup>, fiber 51 g 100 g<sup>-1</sup>, fat 3.3 g 100 g<sup>-1</sup> and protein 5.1 g 100 g<sup>-1</sup>; Aura Herbals Jarosław Paweł, Sopot, Poland) and white sugar (Cukier Polski, Toruń, Poland) were used as additives.

Probiotic bacteria used for fermentation: *Lactaseibacillus paracasei* L-26, *Lactobacillus casei* 431, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactaseibacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 were purchased from Chr. Hansen (Hoersholm, Denmark). Freeze-dried commercial starter cultures used in the dairy industry are not genetically modified.

## 2.2. Experimental Design and Ice Cream Manufacture

The process of producing ice cream from sheep's milk according to the method described by Kowalczyk et al. [25] is included in Figure 1. For each probiotic strain, four batches of mixtures with additives were produced: C—sheep milk (89%) with sugar (11%); I—sheep milk (85%), sugar (11%) and inulin (4%); IF—sheep milk (85%), sugar (11%), inulin (1.5%) and apple fiber (2.5%); F—sheep milk (85%), sugar (11%) and apple fiber (4%). Each batch was homogenized (CAT UNIDRIVE X 1000 D, Ballrechten-Dottingen, Germany) and pasteurized (85 °C, 1 min). After the heat treatment, mixes were cooled to 37 °C, inoculated with one of five previously revived monocultures of probiotic bacteria at 5% (*w/w*) and fermented for ten hours in an incubator (cooled incubator ILW 115, POL-EKO-Aparatura, Wodzisław Śląski, Poland), and then cooled to 5 °C and conditioned for 12 h. The ice cream mixtures were frozen in a DeLux 48,816 freezer (UNOLD AG, Hockenheim, Germany) for 40–50 min at −22 °C [25]. Next, the ice cream samples were stored in 100 mL plastic cups at −22 °C for seven days until simulated *in vitro* digestion was performed. The experiment was repeated three times, and all analyses were performed in three replicates each time.

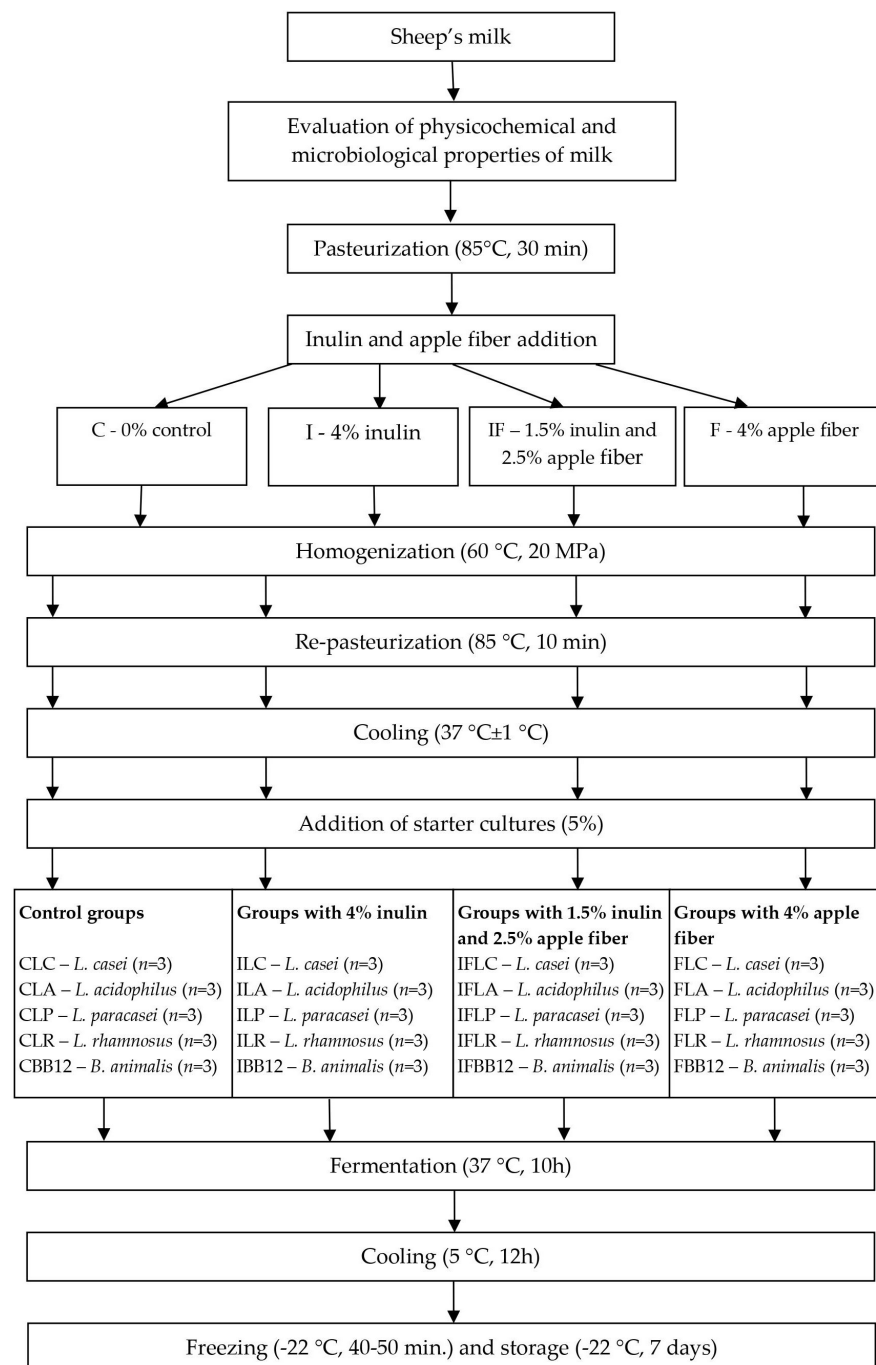
## 2.3. In Vitro Digestion Process

The procedure of simulated digestion in the gastrointestinal tract was carried out according to the methods presented by Buniowska et al. [26] and Camelo-Silva et al. [27] with some modifications. All ice cream samples were digested after seven days of storage at −22 °C. The simulated digestive system included the oral stage stomach and small intestine. The pH, enzymes and time were adjusted for each *in vitro* digestion step.

To simulate the oral stage, 50 mL of sample and 5 mL of saliva enzyme solution (2.38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.19 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 g NaCl, 100 mg L<sup>-1</sup> mucin and 150 mg L<sup>-1</sup> α-amylase with enzyme activity of 200 U L<sup>-1</sup>, dissolved in 1 L distilled water) were transferred to a dark glass bottle. Using HCl (12 mol L<sup>-1</sup>) or NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) buffers, the mixture was adjusted to pH 6.75 ± 0.20 and then incubated in a shaker at 37 °C and 90 rpm for 10 min. In particular, 10 min is an extended time relative to the average time food is in the mouth during chewing, but this value ensured repeatability between samples. After the oral stage, the simulation of the gastric phase was initiated. In this stage, 13.08 mg of pepsin was added to the sample mixed with saliva, and the pH value was reduced to 2.0 ± 0.20 by adding HCl (12 mol L<sup>-1</sup>). The sample was placed in a shaker for 2 h at 37 °C and 90 RPM.

To induce simulated intestinal digestion, the contents from the oral and gastric stages were mixed with 5 mL of pancreatin (4 g L<sup>-1</sup>) and bile salt (25 g L<sup>-1</sup>), changing the pH value to 7.00 ± 0.20 (12 M HCl M or 1 M NaOH). The previously prepared cellulose dialysis membranes (25 mm wide and 30 cm long) were conditioned (0.01 M EDTA Na<sub>2</sub>, 2% NaHCO<sub>3</sub> and 0.1% sodium dodecyl sulfate) at a temperature of 100 °C for 10 min and rinsed five times with deionized water, filled with 25 mL of NaHCO<sub>3</sub> (0.5 M) and placed in the sample until a pH value of 7.00 ± 0.20 was reached. During this process, the pH gradually adjusted, simulating intestinal conditions. The incubation was continued for another 2 h (37 °C/90 RPM). To complete the digestion process, the sample was placed in an ice bath for 10 min. Macroelements that diffuse into the semi-permeable dialysis membrane are potentially absorbed into the bloodstream, known as dialysate. Using a dialysis membrane eliminates the problems that occur during the dialysis of soluble and

insoluble compounds [28]. The solution remaining inside the dialysis membrane is the sample component potentially absorbed into the bloodstream.



**Figure 1.** Manufacture of ice cream from sheep's milk.

Bioavailability (%) refers to the percentage of the mineral compound tested that remains in the dialyzed intestinal fraction relative to the original undigested sample (before digestion), according to the following equation:

$$\text{Bioavailability} = 100 \times \frac{\text{Dialysed fraction}}{\text{Before digestion}}$$

After seven days, samples of the product and each stage and dialysate were frozen and stored at  $-45^{\circ}\text{C}$  until further analysis (about 12–14 days).

#### 2.4. ICP-OES Analysis

Macroelements in ice cream samples were measured before digestion and after each stage of in vitro digestion using optical emission spectrometry with horizontal plasma and detection capabilities both along and across the plasma flame (axial and radial) (ICP-OES) using a Thermo iCAP Dual 6500 spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Bridgewater, MA, USA) according to the method of Znamirowska et al. [29].

The instrument was calibrated with certified standards (Merck, Darmstadt, Germany) covering macronutrient concentrations (Ca, Mg, P, K) of 10,000 ppm. The method was validated using certified reference material (NIST-1515). Results were expressed in mg 100 g<sup>-1</sup> dry matter.

Before the determination, the test samples were subjected to out-of-pressure mineralization in 65% HNO<sub>3</sub> using a Milestone Ethos Ultra-wave-One mineralizer (Milestone SRL, Sorisole, Italy). The required amount of sample was placed in Teflon vessels, after which it was topped up with 8 mL of nitric acid and sealed tightly. The rotary mineralizer was topped up with a blank sample (8 mL of HNO<sub>3</sub>) during the mineralization process for all samples. The analyzed samples were mineralized for one hour using the temperature build-up algorithm, according to the procedure for this type of biological samples, not exceeding 200 °C. After mineralization, the samples were brought to room temperature, and the contents were poured into Falcon tubes (50 mL) topped up with demineralized water.

The detection level for each element was not less than 0.1 mg kg<sup>-1</sup> (assuming detection of the measuring apparatus at 10 ppb).

#### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Statistica v. 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). The mean and standard deviation were statistically calculated from the obtained results. A one- and two-factor ANOVA analysis of variance was performed. The significance of differences between the means was determined by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Calcium and Phosphorus

Dietary calcium intake does not meet the recommendations in many parts of the world. Dairy products provide a high level of calcium per serving, which becomes bioavailable under conditions in the gastrointestinal tract [30,31]. Crucial in sheep's milk ice cream is the presence of casein micelles, which are protein colloids containing ~70% of total calcium and ~50% of total inorganic phosphate [32]. Calcium phosphate is enclosed in casein micelles as small nanoclusters, typically 4–5 nm in diameter. Therefore, casein micelles, which contain several hundred nanoclusters of calcium phosphate and tens of thousands of casein molecules, could be considered a protein-based carrier of calcium phosphate [33,34]. To provide adequate transport, some of the calcium from ice cream is complexed with citrate, which is present in milk at a level of 0.20 mg 100 g<sup>-1</sup> [35]. The proper ratio of calcium to phosphorus in the diet is also essential for adequate phosphate–calcium metabolism. For adults, a beneficial ratio is 1:1 or 1.5:1 [36,37], indicating that in the example of the sheep's milk ice cream studied, the amount of each macroelement is highly favorable because it varies from 1.28:1 to 1.32:1 (Tables 1–5).

In all control ice cream groups (CLC, CLA, CBB12, CLP, CLR), the calcium content ranged from 199.47 mg 100 g<sup>-1</sup> to 202.45 mg 100 g<sup>-1</sup> and was comparable to the calcium concentration in sheep milk (202.83 mg 100 g<sup>-1</sup>). In comparison, the phosphorus content in these groups of ice cream ranged from 153.35 mg 100 g<sup>-1</sup> to 157 mg 100 g<sup>-1</sup>. Adding inulin does not significantly increase the calcium and phosphorus content of ice cream. On the contrary, apple fiber contains 15.96 mg 100 g<sup>-1</sup> of calcium and 51.80 mg 100 g<sup>-1</sup> of phosphorus, resulting in a proportional increase in calcium and phosphorus in FLC (*L. casei*), FLA (*L. acidophilus*), FBB12 (*B. animalis*), FLP (*L. paracasei*) and FLR (*L. rhamnosus*) ice cream.

**Table 1.** Macroelement content (mg 100 g<sup>-1</sup>) in ice cream with *L. casei*.

Macroelement	CLC	ILC	IFLC	FLC
Ca	200.36 <sup>a</sup> ± 2.48	203.63 <sup>a</sup> ± 0.63	205.70 <sup>b</sup> ± 1.86	208.90 <sup>b</sup> ± 2.76
K	124.78 <sup>a</sup> ± 1.66	124.89 <sup>a</sup> ± 1.32	135.59 <sup>b</sup> ± 1.79	141.57 <sup>c</sup> ± 1.20
Mg	15.96 <sup>a</sup> ± 0.25	16.02 <sup>a</sup> ± 0.21	17.07 <sup>b</sup> ± 0.28	17.40 <sup>b</sup> ± 0.24
P	154.35 <sup>a</sup> ± 0.22	154.08 <sup>a</sup> ± 0.67	158.36 <sup>b</sup> ± 0.20	159.37 <sup>c</sup> ± 1.96
Ca:P	1.29:1	1.32:1	1.29:1	1.31:1

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLC: control sample with *L. casei* 431; ILC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431; IFLC: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. casei* 431; FLC: sample with 4% fiber and *L. casei* 431.

**Table 2.** Macroelement content (mg 100 g<sup>-1</sup>) in ice cream with *L. acidophilus*.

Macroelement	CLA	ILA	IFLA	FLA
Ca	202.45 <sup>a</sup> ± 1.35	203.57 <sup>ab</sup> ± 1.33	204.25 <sup>b</sup> ± 1.63	208.20 <sup>c</sup> ± 2.51
K	125.34 <sup>a</sup> ± 1.31	124.96 <sup>a</sup> ± 0.44	129.59 <sup>b</sup> ± 0.65	139.18 <sup>c</sup> ± 0.80
Mg	16.55 <sup>a</sup> ± 0.33	17.43 <sup>a</sup> ± 0.12	17.94 <sup>b</sup> ± 0.15	18.01 <sup>b</sup> ± 0.24
P	157.00 <sup>a</sup> ± 0.92	157.83 <sup>a</sup> ± 0.50	159.13 <sup>b</sup> ± 0.45	160.67 <sup>c</sup> ± 0.18
Ca:P	1.28:1	1.28:1	1.28:1	1.29:1

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLA: control sample with *L. acidophilus*; ILA: sample with 4% inulin and *L. acidophilus*; IFLA: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. acidophilus*; FLA: sample with 4% fiber and *L. acidophilus*.

**Table 3.** Macroelement content (mg 100 g<sup>-1</sup>) in ice cream with *B. animalis*.

Macroelement	CBB12	IBB12	IFBB12	FBB12
Ca	201.97 <sup>a</sup> ± 1.22	202.63 <sup>a</sup> ± 0.76	203.85 <sup>b</sup> ± 0.87	206.59 <sup>c</sup> ± 0.37
K	125.55 <sup>a</sup> ± 1.94	124.81 <sup>a</sup> ± 0.64	131.27 <sup>b</sup> ± 1.77	141.10 <sup>c</sup> ± 0.84
Mg	16.53 <sup>a</sup> ± 0.36	16.60 <sup>a</sup> ± 0.10	16.83 <sup>a</sup> ± 0.35	17.34 <sup>b</sup> ± 0.19
P	156.50 <sup>a</sup> ± 0.68	157.42 <sup>a</sup> ± 0.45	158.50 <sup>b</sup> ± 0.32	159.92 <sup>c</sup> ± 0.13
Ca:P	1.29:1	1.28:1	1.28:1	1.29:1

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CBB12: control sample with *B. animalis*; IBB12: sample with 4% inulin and *B. animalis*; IFBB12: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *B. animalis*; FBB12: sample with 4% fiber and *B. animalis*.

**Table 4.** Macroelement content (mg 100 g<sup>-1</sup>) in ice cream with *L. paracasei*.

Macroelement	CLP	ILP	IFLP	FLP
Ca	199.47 <sup>a</sup> ± 1.09	201.82 <sup>a</sup> ± 0.73	203.90 <sup>b</sup> ± 0.57	205.40 <sup>c</sup> ± 0.78
K	125.37 <sup>a</sup> ± 0.99	125.68 <sup>a</sup> ± 1.04	130.28 <sup>b</sup> ± 0.55	142.02 <sup>c</sup> ± 0.90
Mg	17.52 <sup>a</sup> ± 0.16	17.64 <sup>a</sup> ± 0.08	17.88 <sup>b</sup> ± 0.08	18.02 <sup>b</sup> ± 0.21
P	154.03 <sup>a</sup> ± 0.98	154.90 <sup>a</sup> ± 0.72	157.45 <sup>b</sup> ± 0.34	159.46 <sup>c</sup> ± 1.05
Ca:P	1.29:1	1.30:1	1.29:1	1.28:1

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLP: control sample with *L. paracasei* L-26; ILP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26; IFLP: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. paracasei* L-26; FLP sample with 4% fiber and *L. paracasei* L-26.

**Table 5.** Macroelement content (mg 100 g<sup>-1</sup>) in ice cream with *L. rhamnosus*.

Macroelement	CLR	ILR	IFLR	FLR
Ca	200.83 <sup>a</sup> ± 1.31	201.38 <sup>a</sup> ± 0.60	203.13 <sup>b</sup> ± 0.85	206.23 <sup>c</sup> ± 1.49
K	124.83 <sup>a</sup> ± 0.68	125.17 <sup>a</sup> ± 0.92	133.19 <sup>b</sup> ± 0.53	142.23 <sup>c</sup> ± 1.51
Mg	16.34 <sup>a</sup> ± 0.12	16.67 <sup>a</sup> ± 0.21	16.41 <sup>a</sup> ± 0.13	17.44 <sup>b</sup> ± 0.37
P	154.93 <sup>a</sup> ± 1.10	155.04 <sup>a</sup> ± 0.93	158.56 <sup>b</sup> ± 0.54	160.17 <sup>b</sup> ± 0.57
Ca:P	1.29:1	1.29:1	1.28:1	1.28:1

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLR: control sample with *L. rhamnosus*; ILR: sample with 4% inulin and *L. rhamnosus*; IFLR: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. rhamnosus*; FLR: sample with 4% fiber and *L. rhamnosus*.

The calcium and phosphorus contents of raw materials and probiotic sheep's milk ice cream are shown in Tables 1–6.

**Table 6.** Macroelement content (mg 100 g<sup>-1</sup>) in raw materials.

Macroelement	Inulin	Apple Fiber	Sheep Milk
Ca	1.42 <sup>a</sup> ± 0.12	15.96 <sup>b</sup> ± 0.21	202.83 <sup>c</sup> ± 2.53
K	4.73 <sup>a</sup> ± 0.69	398.93 <sup>c</sup> ± 0.53	146.22 <sup>b</sup> ± 1.57
Mg	0.05 <sup>a</sup> ± 0.00	15.11 <sup>c</sup> ± 0.39	15.96 <sup>b</sup> ± 2.01
P	0.20 <sup>a</sup> ± 0.03	51.80 <sup>c</sup> ± 0.01	156.23 <sup>b</sup> ± 2.53

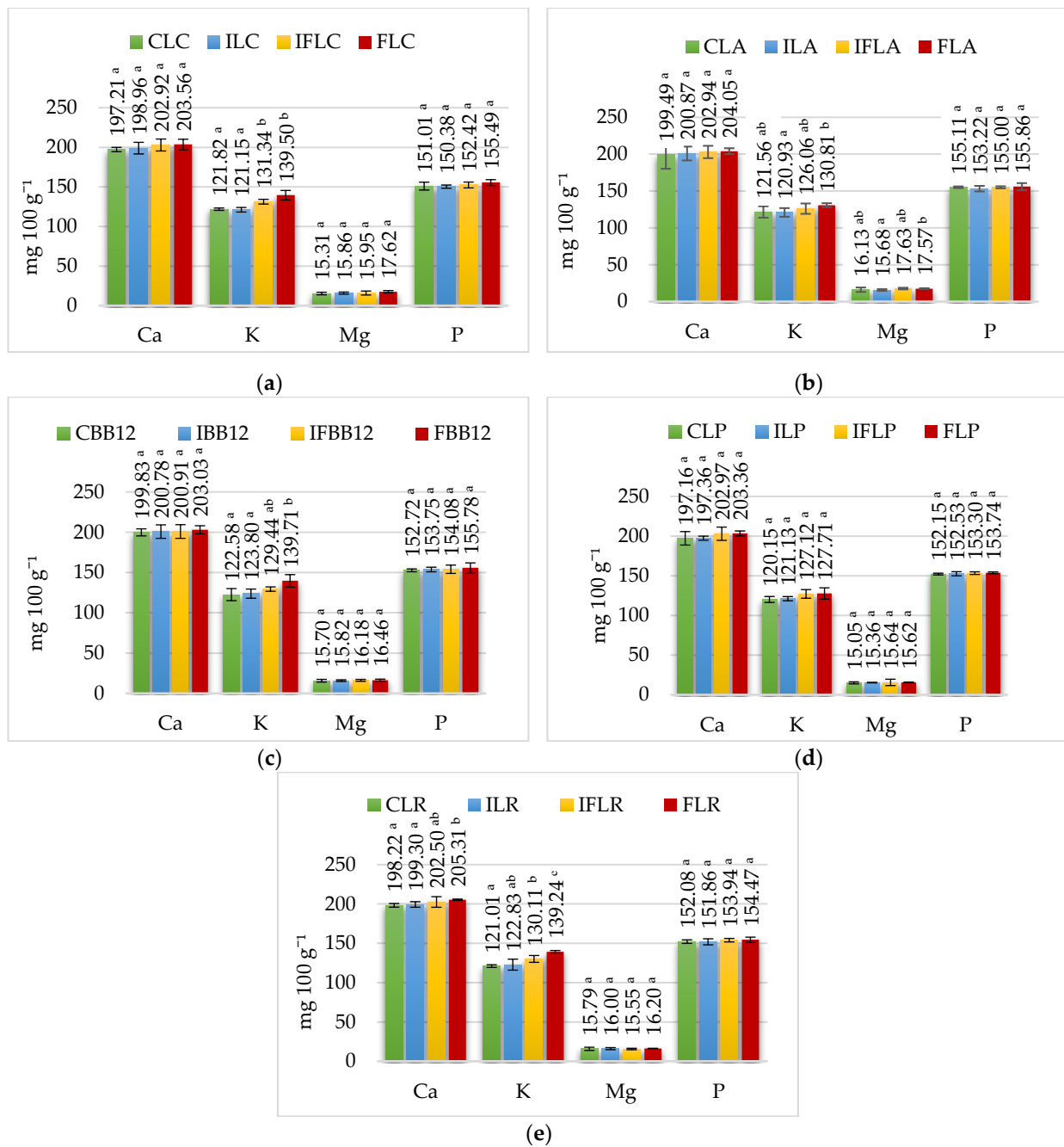
<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ .

In the mouth, ice cream samples are mixed with saliva and thus diluted, which contributes to a non-significant decrease in calcium concentration in all samples (Figure 2). On the contrary, the phosphorus content increased, which was caused by the presence of sodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in saliva. In humans, the amount of saliva secreted under resting conditions is 0.5 mL per minute, while after intense secretory stimulation with food, it can increase to 10 mL per minute [38].

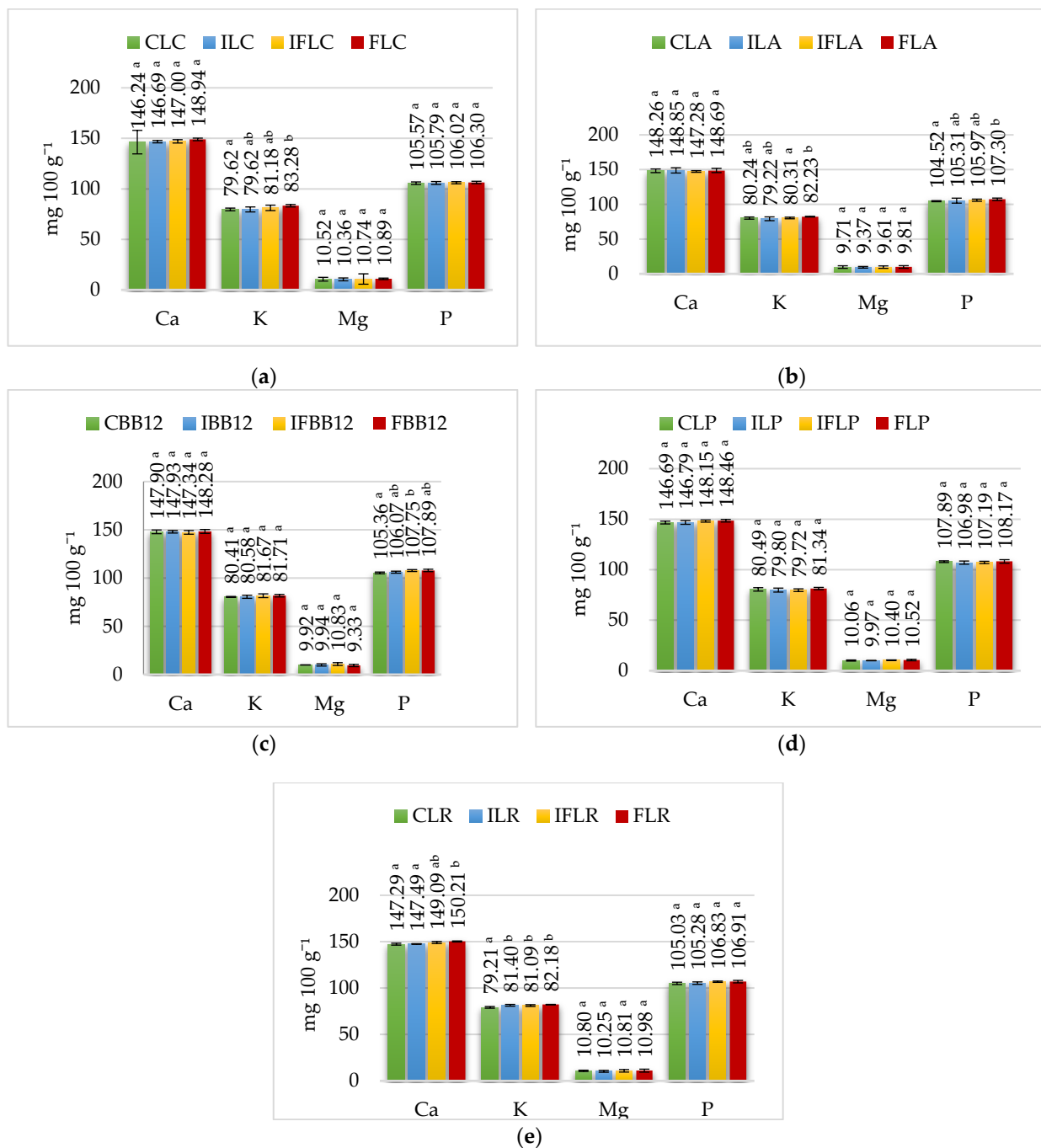
When the ice cream enters the stomach during fasting, it comes into contact with a small amount (~50 mL) of gastric juice, which for an adult will have a pH between 1 and 2 [39]. However, considering the portion size of the ice cream (~100 mL) with a pH of 4.3–5.3, compared to the amount of gastric juice, the pH of the stomach will quickly rise to a value of about 4. Subsequently, the stomach ice cream is slightly diluted and acidified, resulting in the dissolution of some of the calcium phosphate present in the casein micelles [40,41]. Subsequently, gastric juice is secreted into the stomach, gradually lowering the pH [42].

Therefore, when the pH value is lower than 4 in the stomach, it should be sufficient to dissolve all calcium and phosphate from casein micelles [34]. Possible enzymatic coagulation of the micelles could impede this process and delay the release of calcium and phosphate from the ice cream. This delayed release may finally benefit ice cream's calcium absorption due to the gastric phase's reduced calcium concentration. However, dilution with gastric juice and slow release from the gastric coagulum would significantly reduce the concentration of calcium phosphate in the food content leaving the stomach [43]. In the gastric phase, the calcium concentration in the analyzed ice cream ranged from 146.24 mg 100 g<sup>-1</sup> to 151.21 mg 100 g<sup>-1</sup> (Figure 3), representing 72.98% to 73.32% of the calcium content of the ice cream before digestion. However, in the gastric phase, a significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) calcium content was determined only in samples fermented by *L. rhamnosus*: the IFLR ice cream with inulin and fiber and FLR ice cream with fiber compared to control CLR ice cream and ILR ice cream with inulin. In other ice cream groups, added fiber had no effect on calcium content. In contrast, a significant effect of added apple fiber on the phosphorus content of the gastric phase was found in FLA (fermented by *L. acidophilus*) and FBB12 ice cream (fermented by *B. animalis*) compared to their control counterparts. Also notable was the tendency in the remaining ice cream with apple fiber to maintain higher phosphorus concentrations than those in samples without fiber.

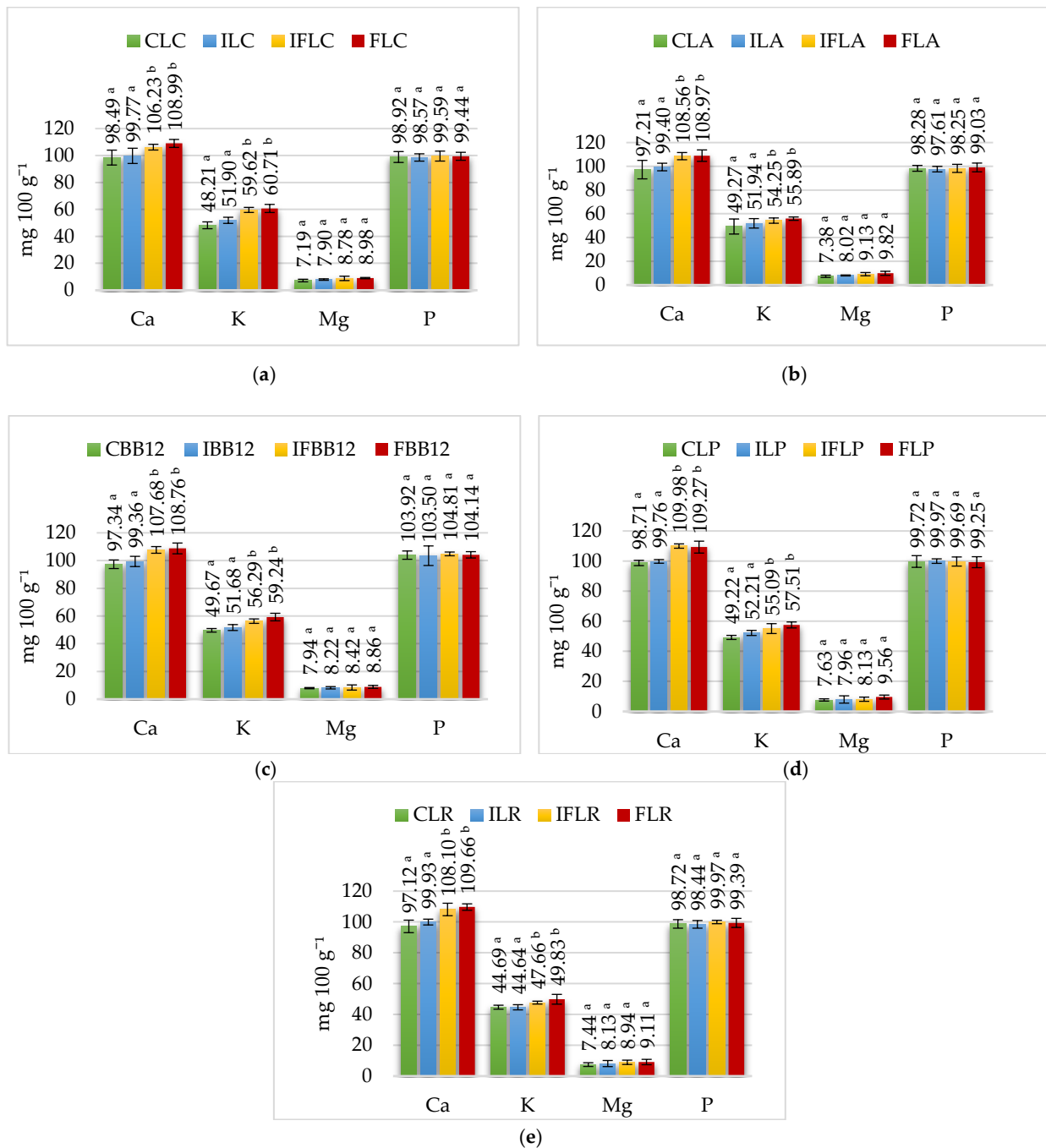
The rapidity of gastric emptying depends on many factors, including volume flow restrictions, caloric density, pH and rheological properties [43]. Phosphorus absorption occurs in the duodenum (35%), jejunum (25%) and ileum (40%) [44]. The naturally occurring phosphorus in food is absorbed from the gastrointestinal tract at 40–60% [37]. The phosphorus content in the tested samples in the intestinal phase is shown in Figure 4. The results of the bioavailability of macronutrients are shown in Tables 7–11.



**Figure 2.** Macroelement content at the oral stage. (a) *L. casei*, (b) *L. acidophilus*, (c) *B. animalis*, (d) *L. paracasei*, (e) *L. rhamnosus*. <sup>a-c</sup>—mean values denoted by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLC: control sample with *L. casei* 431; ILC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431; IFLC: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. casei* 431; FLC: sample with 4% fiber and *L. casei* 431; CLA: control sample with *L. acidophilus*; ILA: sample with 4% inulin and *L. acidophilus*; IFLA: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. acidophilus*; FLA: sample with 4% fiber and *L. acidophilus*; CBB12: control sample with *B. animalis*; IBB12: sample with 4% inulin and *B. animalis*; IFBB12: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *B. animalis*; FBB12: sample with 4% fiber and *B. animalis*; CLP: control sample with *L. paracasei* L-26; ILP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26; IFLP: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. paracasei* L-26; FLP: sample with 4% fiber and *L. paracasei* L-26; CLR: control sample with *L. rhamnosus*; ILR: sample with 4% inulin and *L. rhamnosus*; IFLR: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. rhamnosus*; FLR: sample with 4% fiber and *L. rhamnosus*.



**Figure 3.** Macroelement content at the stomach stage. (a) *L. casei* (b) *L. acidophilus*, (c) *B. animalis*, (d) *L. paracasei*, (e) *L. rhamnosus*. <sup>a-b</sup>—mean values denoted by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLC: control sample with *L. casei* 431; ILC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431; IFLC: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. casei* 431; FLC: sample with 4% fiber and *L. casei* 431; CLA: control sample with *L. acidophilus*; ILA: sample with 4% inulin and *L. acidophilus*; IFLA: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. acidophilus*; FLA: sample with 4% fiber and *L. acidophilus*; CBB12: control sample with *B. animalis*; IBB12: sample with 4% inulin and *B. animalis*; IFBB12: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *B. animalis*; FBB12: sample with 4% fiber and *B. animalis*; CLP: control sample with *L. paracasei* L-26; ILP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26; IFLP: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. paracasei* L-26; FLP: sample with 4% fiber and *L. paracasei* L-26; CLR: control sample with *L. rhamnosus*; ILR: sample with 4% inulin and *L. rhamnosus*; IFLR: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. rhamnosus*; FLR: sample with 4% fiber and *L. rhamnosus*.



**Figure 4.** Macroelement content at the small intestine stage. (a) *L. casei* (b) *L. acidophilus*, (c) *B. animalis*, (d) *L. paracasei*, (e) *L. rhamnosus*. <sup>a-b</sup>—mean values denoted by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLC: control sample with *L. casei* 431; ILC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431; IFLC: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. casei* 431; FLC: sample with 4% fiber and *L. casei* 431; CLA: control sample with *L. acidophilus*; ILA: sample with 4% inulin and *L. acidophilus*; IFLA: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. acidophilus*; FLA: sample with 4% fiber and *L. acidophilus*; CBB12: control sample with *B. animalis*; IBB12: sample with 4% inulin and *B. animalis*; IFBB12: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *B. animalis*; FBB12: sample with 4% fiber and *B. animalis*; CLP: control sample with *L. paracasei* L-26; ILP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26; IPLP: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. paracasei* L-26; FLP: sample with 4% fiber and *L. paracasei* L-26; CLR: control sample with *L. rhamnosus*; ILR: sample with 4% inulin and *L. rhamnosus*; IFLR: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. rhamnosus*; FLR: sample with 4% fiber and *L. rhamnosus*.

**Table 7.** Bioavailability of macroelements (%) in ice cream with *L. casei*.

Macroelement	CLC	ILC	IFLC	FLC
Ca	48.81 <sup>d</sup> ± 1.53	46.66 <sup>c</sup> ± 1.66	43.39 <sup>b</sup> ± 1.14	42.41 <sup>a</sup> ± 1.96
K	60.66 <sup>d</sup> ± 2.54	57.01 <sup>c</sup> ± 2.28	53.85 <sup>b</sup> ± 1.87	51.42 <sup>a</sup> ± 3.01
Mg	55.64 <sup>b</sup> ± 0.96	49.93 <sup>a</sup> ± 0.54	48.68 <sup>a</sup> ± 1.64	48.16 <sup>a</sup> ± 0.47
P	49.26 <sup>a</sup> ± 4.04	49.05 <sup>a</sup> ± 2.72	48.74 <sup>a</sup> ± 3.70	47.82 <sup>a</sup> ± 2.96

<sup>a-d</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLC: control sample with *L. casei* 431; ILC: sample with 4% inulin and *L. casei* 431; IFLC: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. casei* 431; FLC: sample with 4% fiber and *L. casei* 431.

**Table 8.** Bioavailability of macroelements (%) in ice cream with *L. acidophilus*.

Macroelement	CLA	ILA	IFLA	FLA
Ca	51.70 <sup>c</sup> ± 3.23	47.09 <sup>b</sup> ± 2.61	43.84 <sup>a</sup> ± 2.01	40.77 <sup>a</sup> ± 1.85
K	60.85 <sup>c</sup> ± 0.69	57.06 <sup>b</sup> ± 1.02	54.80 <sup>a</sup> ± 1.11	54.45 <sup>a</sup> ± 0.89
Mg	52.45 <sup>c</sup> ± 2.25	47.12 <sup>b</sup> ± 1.58	46.88 <sup>b</sup> ± 1.51	44.42 <sup>a</sup> ± 2.01
P	49.19 <sup>a</sup> ± 0.52	49.36 <sup>a</sup> ± 0.34	49.36 <sup>a</sup> ± 0.56	49.48 <sup>a</sup> ± 0.47

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLA: control sample with *L. acidophilus*; ILA: sample with 4% inulin and *L. acidophilus*; IFLA: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. acidophilus*; FLA: sample with 4% fiber and *L. acidophilus*.

**Table 9.** Bioavailability of macroelements (%) in ice cream with *B. animalis*.

Macroelement	CBB12	IBB12	IFBB12	FBB12
Ca	52.21 <sup>c</sup> ± 1.32	47.56 <sup>b</sup> ± 1.03	46.06 <sup>b</sup> ± 0.98	40.63 <sup>a</sup> ± 0.96
K	60.06 <sup>c</sup> ± 1.06	56.28 <sup>b</sup> ± 0.65	56.00 <sup>b</sup> ± 0.59	51.34 <sup>a</sup> ± 1.02
Mg	52.15 <sup>b</sup> ± 1.12	46.08 <sup>a</sup> ± 1.09	46.46 <sup>a</sup> ± 1.03	46.02 <sup>a</sup> ± 1.11
P	50.54 <sup>a</sup> ± 0.54	50.51 <sup>a</sup> ± 0.55	50.46 <sup>a</sup> ± 0.63	50.94 <sup>a</sup> ± 0.87

<sup>a-c</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CBB12: control sample with *B. animalis*; IBB12: sample with 4% inulin and *B. animalis*; IFBB12: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *B. animalis*; FBB12: sample with 4% fiber and *B. animalis*.

**Table 10.** Bioavailability of macroelements (%) in ice cream with *L. paracasei*.

Macroelement	CLP	ILP	IFLP	FLP
Ca	54.40 <sup>d</sup> ± 1.21	48.50 <sup>c</sup> ± 0.95	45.84 <sup>b</sup> ± 1.02	41.92 <sup>a</sup> ± 1.32
K	60.25 <sup>d</sup> ± 1.06	56.28 <sup>c</sup> ± 0.98	53.82 <sup>b</sup> ± 0.65	50.55 <sup>a</sup> ± 0.78
Mg	51.32 <sup>b</sup> ± 0.95	46.96 <sup>a</sup> ± 0.56	46.21 <sup>a</sup> ± 0.21	46.07 <sup>a</sup> ± 0.47
P	49.29 <sup>a</sup> ± 0.72	49.19 <sup>a</sup> ± 0.54	49.15 <sup>a</sup> ± 0.36	48.91 <sup>a</sup> ± 0.72

<sup>a-d</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLP: control sample with *L. paracasei* L-26; ILP: sample with 4% inulin and *L. paracasei* L-26; IFLP: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. paracasei* L-26; FLP sample with 4% fiber and *L. paracasei* L-26.

**Table 11.** Bioavailability of macroelements (%) in ice cream with *L. rhamnosus*.

Macroelement	CLR	ILR	IFLR	FLR
Ca	49.91 <sup>d</sup> ± 1.15	46.98 <sup>c</sup> ± 1.24	45.03 <sup>b</sup> ± 0.67	43.05 <sup>a</sup> ± 1.96
K	60.51 <sup>d</sup> ± 2.02	56.34 <sup>c</sup> ± 1.08	53.06 <sup>b</sup> ± 1.09	50.82 <sup>a</sup> ± 1.12
Mg	53.18 <sup>c</sup> ± 0.79	48.05 <sup>b</sup> ± 0.98	48.02 <sup>b</sup> ± 0.57	45.93 <sup>a</sup> ± 0.24
P	49.18 <sup>a</sup> ± 2.05	49.21 <sup>a</sup> ± 1.01	49.10 <sup>a</sup> ± 2.04	48.92 <sup>a</sup> ± 1.59

<sup>a-d</sup>—mean values denoted in rows by different letters differ statistically significantly at  $p \leq 0.05$ ; CLR: control sample with *L. rhamnosus*; ILR: sample with 4% inulin and *L. rhamnosus*; IFLR: sample with 2.5% inulin and 1.5% apple fiber with *L. rhamnosus*; FLR: sample with 4% fiber and *L. rhamnosus*.

The bioavailability of phosphorus in the ice cream ranged from 47.82% in FLC ice cream with fiber fermented by *L. casei* to 50.94% in the FBB12 group with fiber addition fermented by *B. animalis*. Adding apple fiber did not significantly reduce the bioavailability

of phosphorus in ice cream fermented by *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*, nor did it significantly increase bioavailability in ice cream with *L. acidophilus* (FLA) and *B. animalis* (FBB12), compared to control counterparts. The highest bioavailability of phosphorus (>50%) was found in sheep's milk ice cream fermented by *B. animalis*. The remaining sheep's milk ice creams had lower phosphorus bioavailability by 1–2.5%.

The bioavailability of calcium in the tested ice cream ranged from 40.63% in FBB12 (with fiber, fermented by *B. animalis*) to 54.40% in control CLP samples fermented by *L. paracasei* (Tables 7–11). The highest bioavailability of calcium, depending on the type of bacteria used in each group, was always shown for the control samples. However, adding 4% inulin already reduced calcium bioavailability by about 3–5%, and a mixture of 2.5% inulin with 1.5% apple fiber reduced calcium bioavailability by 4–8% compared to controls. Adding 4% apple fiber significantly reduced the bioavailability of calcium from sheep's milk ice cream by up to 6–12%. FLR ice cream with fiber fermented by *L. rhamnosus* showed a significant reduction in the bioavailability of >12% compared to control CLR ice cream. Our study and the two-factor analysis of variance (ANOVA) show that the bioavailability of calcium from sheep's milk ice cream is significantly influenced by the two factors analyzed, which are the fiber ( $p = 0.0000$ ) and the type of bacteria ( $p = 0.0001$ ), as well as interactions between these factors ( $p = 0.0006$ ). Also, a study by Bosscher et al. [45] showed that dietary fiber inhibits mineral bioavailability more in casein than in whey-based formulations.

Most calcium (about 65%) is absorbed at pH 6.5–7.5. It should be noted that calcium is not absorbed from the stomach [46]. In order to cross the intestinal barrier, calcium must be in soluble form, generally ionized ( $\text{Ca}^{2+}$ ) or bound to a soluble organic molecule. The auxiliary organs supporting intestinal digestion and absorption are the pancreas, liver and gallbladder [38]. Calcium transport involves both active and passive transport mechanisms. Active transport occurs mainly in the duodenum and upper jejunum [47]. In the ileum, the primary absorption mechanism is passive, since food moves slowly through this area of the gastrointestinal tract. The small intestine is responsible for more than 90% of total calcium uptake in humans, while about 3–6% of calcium is absorbed in the large intestine, depending on calcium loading [48,49]. A study by Szalast-Pietrzak et al. [50] on food products showed the highest percentage of calcium bioavailability from natural yogurt, at 37.73%.

Our study of the effect of applied probiotic strains on calcium bioavailability also supports the results of Sharifi-Rad et al. [51], where one possible mechanism by which calcium availability is increased is higher calcium absorption and fermentation in the intestine by probiotics. Gilman and Cashman [52] previously reported that in human intestinal Caco-2 cells in culture, *Lactobacillus salivarius* could increase  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, although exposure of Caco-2 cells to probiotics has no effect on  $\text{Ca}^{2+}$  transport.

### 3.2. Magnesium

Sheep milk provides 16–18 mg 100 g<sup>-1</sup> of magnesium, which occurs in the form of soluble compounds (about 73–75% of total Mg) and colloidal compounds (phosphates, citrates). Only about 15% of magnesium is presented in an ionized form. [3]. The results determining the magnesium content in the analyzed ice cream groups are shown in Tables 2–6. In the control ice cream, the content of this macroelement was determined in the range from 15.96 mg 100 g<sup>-1</sup> in control ice cream with *L. casei* (CLC) to 17.52 mg 100 g<sup>-1</sup> in control ice cream with *L. paracasei* (CLP). Adding apple fiber significantly increased the magnesium content of FLC (*L. casei*), FLA (*L. acidophilus*), FBB12 (*B. animalis*), FLP (*L. paracasei*) and FLR (*L. rhamnosus*) ice cream by about 0.5–1.4 mg 100 g<sup>-1</sup> due to the presence of magnesium in apple fiber (Table 1). In contrast, the addition of inulin did not change the magnesium content in the ice cream before digestion compared to its control counterparts. The concentration of magnesium in ice cream in the oral, stomach and intestine stages, depending on the addition of fiber and probiotic strain, is shown in Figures 2–4.

The bioavailability of magnesium from sheep's milk products is poorly studied. In our study, the bioavailability of magnesium in sheep's milk ice cream ranged from 55.64% in the

control ice cream fermented by *L. casei* (CLC) to 44.42% in the group with fiber fermented by *L. acidophilus* (FLA). The bioavailability of magnesium was highest in the control samples, where it always exceeded 50%. The highest bioavailability was determined in the control CLC ice cream fermented by *L. casei*. The addition of fiber had an essential role in modifying the bioavailability of magnesium. Hussain et al. [53] indicated that apple fiber contains 40% cellulose and 19% water-soluble hemicellulose. Also, as a polysaccharide, inulin is a low-molecular-weight polymer with poor water solubility, contributing to faster intestinal transit. However, it should be mentioned that adding inulin only reduced magnesium's bioavailability by about 5–6% compared to control counterparts. In contrast, adding apple fiber reduced the bioavailability of magnesium in the ice cream by 8.03% in FLA (fermented by *L. acidophilus*), 7.48% in FLC (fermented by *L. casei*) and 7.25% in the FLR (fermented by *L. rhamnosus*) group. Ice cream with fiber addition, FBB12 fermented by *B. animalis* and FLP fermented by *L. paracasei*, showed 5–6% lower magnesium bioavailability than controls.

Bielik et al. [22] consider that the gut microflora influences mineral metabolism by directly influencing mineral absorption in the digestive tract during digestion and producing several enzymes that help release minerals from food. These include bacterial phytases, which catalyze the hydrolysis of phytic acid found in many plant tissues, releasing proper forms of minerals such as calcium, magnesium and phosphorus [54,55]. Aljevich et al. [56] observed a higher bioavailability of magnesium and other minerals from cheese when combined with probiotics. Cultures of *Lactobacillus* spp. consumed with Dutch-type cheese increased Mg (~18%) and Ca (~2.5%) availability in vitro [28]. Similarly, fermented goat milk containing *Lactobacillus plantarum* increased Mg bioavailability compared to commercial fermented goat milk [21].

This implies that the bacterial strain conducting the fermentations of the ice cream mixes also significantly affects magnesium bioavailability ( $p = 0.0001$ ), as confirmed by a two-factor analysis of variance (ANOVA). The calculations show that the bioavailability of magnesium from sheep's milk ice cream is significantly influenced by both factors analyzed, including the fiber ( $p = 0.0011$ ) and the interactions between these factors ( $p = 0.0005$ ).

Comparable values for magnesium absorption from various diets to those in our study have been published [49]. In an equilibrium study conducted on healthy young men, the apparent magnesium absorption from a mixed Western diet containing 18 g of fiber daily was 46.3%. Knudsen et al. [57] found an average magnesium absorption of 46%. In another study, magnesium absorption from milk was measured in adolescents aged 9–14 years using the stable isotope multiscale technique. The absorption of magnesium from milk was 42.8% among girls and 45.3% among boys and did not differ significantly between the sexes [58].

### 3.3. Potassium

Due to the high potassium content in apple fiber (Table 1), its addition to ice cream mixes significantly increased the amount of potassium in sheep's milk ice cream (Tables 2–6). The concentration of potassium in ice cream in the mouth, stomach and intestine depending on the addition of fiber and the probiotic strain used for fermentation is shown in Figures 2–4.

Potassium is intrinsically soluble and rapidly diffuses into the lumen of the upper gastrointestinal tract. The small intestine is the primary location for potassium absorption, with approximately 90% of dietary potassium being absorbed by passive diffusion [59,60]. However, relatively little is known about the bioavailability of potassium, and most work has focused on assessing urinary potassium loss after potassium salt supplementation [61–63]. Only potato has been studied for potassium bioavailability, and this food consists mainly of easily digestible starch [59].

In our study, the bioavailability of potassium was higher in control ice cream than in ice cream with fiber (Tables 7–11). In the control ice cream (CLC, CLA, CBB12, CLP, CLR), the bioavailability of potassium was about 60%. In ice cream with inulin, it was lower by 3–4%, and in ice cream with apple fiber, it was lower by 6–9%. A two-factor analysis of

variance (ANOVA) shows that the bioavailability of potassium in sheep's milk ice cream is significantly affected by the addition of fiber ( $p = 0.0000$ ), while the type of bacteria ( $p = 0.6731$ ) and interactions between these factors ( $p = 0.7456$ ) were not significant.

The bioavailability of potassium in whole fruits and vegetables can be as high as 50% to 60%, and there is a lack of evidence linking higher consumption of fruits and vegetables to higher serum potassium concentrations [64]. The bioavailability of potassium from food additives can be as high as 100% [64,65]. Picard [65] and MacDonald-Clarke et al. [66] also found that the bioavailability of potassium from fruits and vegetables is 50–60%, compared to 90% from animal protein and 95% from additives. Only a few studies show how well the various forms of potassium contained in dietary supplements are absorbed. A dose–response study showed that people absorb about 94% of the potassium gluconate in supplements, and the absorption rate is similar to that of potassium from potatoes [66].

#### 4. Conclusions

In general, considering macronutrients in food matrices and their changes during digestion is crucial for allowing the optimal use of macroelements in the diet. The results of the study confirmed the beneficial effect of the bacterial strain on the bioavailability of Ca, Mg and P and, thus, their support for the human gut microbiome. Further research should address the action of specific bacterial species and their effect on improving or preventing micronutrient deficiencies. Similarly, a better understanding of the underlying mechanisms by which the gut microbiota influences host micronutrient uptake and absorption would enable a postbiotic approach to match micronutrient availability with host needs.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K. and A.Z.-P.; methodology, M.K., A.Z.-P., G.Z. and M.B.-O.; software, M.K. and A.Z.-P.; validation, M.K. and A.Z.-P.; formal analysis, M.K. and A.Z.-P.; investigation, M.K.; resources, M.K.; writing—original draft preparation, M.K., A.Z.-P. and M.P.; writing—review and editing, M.K., A.Z.-P. and M.P.; supervision, A.Z.-P.; project administration, M.K.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The project is funded by the program of the Minister of Education and Science named “Regional Initiative of Excellence” in the years 2019–2023, grant number 026/RID/2018/19, the amount of financing PLN 9 542 500.00.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original data presented in the study are included in the article; further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

#### References

1. Chia, J.; Burrow, K.; Carne, A.; McConnell, M.; Samuelsson, L.; Day, L.; Young, W.; Bekhit, A.E.-D. Minerals in Sheep milk. In *Nutrients in Milk and Their Implications on Health and Disease*; Watson, R.R., Collier, R.J., Preedy, V., Eds.; Elsevier Publishing: London, UK, 2017; pp. 345–363.
2. Burrow, K.; Young, W.; McConnell, M.; Carne, A.; Bekhit, A.E.-D. Do Dairy Minerals Have a Positive Effect on Bone Health? *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 989–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mayer, H.K.; Fiechter, G. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. *Int. Dairy J.* **2012**, *24*, 57–63. [[CrossRef](#)]
4. Bornaz, S.; Sahli, A.L.L.; Attalah, A.; Attia, H. Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: A comparison with goats', ewes' and cows' milks. *Int. J. Dairy Technol.* **2009**, *62*, 505–513. [[CrossRef](#)]
5. Mohapatra, A.; Shinde, A.K.; Singh, R. Sheep milk: A pertinent functional food. *Small Rumin. Res.* **2019**, *181*, 6–11. [[CrossRef](#)]
6. Molik, E.; Błasiak, M.; Nahajło, K. The health-promoting qualities of sheep's milk and the factors affecting its content of active compounds. *Przegl. Hod* **2018**, *2*, 16–19. (In Polish)

7. Serafeimidou, A.; Zlatanov, S.; Kritikos, G.; Tourianis, A. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *31*, 24–30. [[CrossRef](#)]
8. Gassem, M.; Osman, M.; Mohamed Ahmed, I.; Abdel Rahman, I.; Fadol, M.; Al-Maiman, S. Effect of fermentation by selected lactic acid bacteria on the chemical composition and fatty acids of camel milk. *J. Camel. Pract. Res.* **2016**, *23*, 277. [[CrossRef](#)]
9. Paszczyk, B.; Tońska, E. Fatty Acid Content, Lipid Quality Indices, and Mineral Composition of Cow Milk and Yogurts Produced with Different Starter Cultures Enriched with *Bifidobacterium bifidum*. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 6558. [[CrossRef](#)]
10. Turgeon, S.L.; Brisson, G. Symposium review: The dairy matrix—Bioaccessibility and bioavailability of nutrients and physiological effects. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 6727–6736. [[CrossRef](#)]
11. Mulet-Cabero, A.I.; Mackie, A.R.; Brodtkorb, A.P.; Wilde, J. Dairy structures and physiological responses: A matter of gastric digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 3737–3752. [[CrossRef](#)]
12. Scheers, N. Regulatory Effects of Cu, Zn, and Ca on Fe Absorption: The Intricate Play between Nutrient Transporters. *Nutrients* **2013**, *5*, 957–970. [[CrossRef](#)]
13. Rossi, M.; Corradini, C.; Amaretti, A.; Nicolini, M.; Pompei, A.; Zannoni, S.; Mateuzzi, D. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: A Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *App. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 10. [[CrossRef](#)]
14. Kumar, J.; Rani, K.; Datt, C. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 6229–6237. [[CrossRef](#)]
15. Younes, H.; Coudray, C.; Bellanger, J.; Demigné, C.; Rayssiguier, Y.; Révész, C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *J. Nutr.* **2001**, *86*, 479–485. [[CrossRef](#)]
16. Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Baba, S.; Adachi, T.; Sakata, T.; Sakaguchi, E. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 2417–2424. [[CrossRef](#)]
17. Coudray, C.; Feillet-Coudray, C.; Tressol, J.C.; Gueux, E.; Thien, S.; Jaffrello, L.; Mazur, A.; Rayssiguier, Y. Stimulatory effect of inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium in rats is modulated by dietary calcium intakes. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 293–302. [[CrossRef](#)]
18. Bohn, T.; Carriere, F.; Day, L.; Deglaire, A.; Egger, L.; Freitas, D.; Golding, M.; Le Feunteun, S.; Macierzanka, A.; Menard, O.; et al. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 2239–2261. [[CrossRef](#)]
19. Cashman, K. Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2003**, *4*, 21–32.
20. Massot-Cladera, M.; Azagra-Boronat, I.; Franch, À.; Castell, M.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Pérez-Cano, F.J. Gut Health-Promoting Benefits of a Dietary Supplement of Vitamins with Inulin and Acacia Fibers in Rats. *Nutrients* **2020**, *12*, 2196. [[CrossRef](#)]
21. Bergillos-Meca, T.; Cabrera-Vique, C.; Artacho, R.; Moreno-Montoro, M.; Navarro-Alarcón, M.; Olalla, M.; Giménez, R.; Seiquer, I.; Ruiz-López, M.D. Does *Lactobacillus plantarum* or ultrafiltration process improve Ca, Mg, Zn and P bioavailability from fermented goats' milk? *Food Chem.* **2015**, *187*, 314–321. [[CrossRef](#)]
22. Bielik, V.; Kolisek, M. Bioaccessibility and Bioavailability of Minerals in Relation to a Healthy Gut Microbiome. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *24*, 6803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Arbuckle, W.S. Minerals in ice cream. In *Ice Cream*, 4th ed.; Arbuckle, W.S., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 1986; p. 13.
24. Van der Hee, R.M.; Miret, S.; Slettenaar, M.; Duchateau, G.S.; Rietveld, A.G.; Wilkinson, J.E.; Quail, P.J.; Berry, M.J.; Dainty, J.R.; Teucher, B.; et al. Calcium absorption from fortified ice cream formulations compared with calcium absorption from milk. *J. Am. Diet. Assoc.* **2009**, *109*, 830–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kowalczyk, M.; Znamirowska-Piotrowska, A.; Buniowska-Olejniak, M.; Pawlos, M. Sheep Milk Symbiotic Ice Cream: Effect of Inulin and Apple Fiber on the Survival of Five Probiotic Bacterial Strains during Simulated In Vitro Digestion Conditions. *Nutrients* **2022**, *14*, 4454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Buniowska, M.; Carbonell-Capella, J.M.; Frigola, A.; Esteve, M.J. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1834–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Silva, C.C.; da Silva Barros, E.L.; Verruck, S.; Maran, B.M.; Canella, M.H.M.; Esmerino, E.A.; Ramon Silva, R.; Prudencio, E.S. How ice cream manufactured with concentrated milk serves as a protective probiotic carrier? An in vitro gastrointestinal assay. *Food Sci. Technol.* **2022**, *42*, 28621. [[CrossRef](#)]
28. Sulaiman, N.; Givens, D.I.; Anitha, S.A. Narrative Review: In-vitro Methods for Assessing Bio-Accessibility/Bioavailability of Iron in Plant-Based Foods. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *10*, 5. [[CrossRef](#)]
29. Znamirowska, A.; Szajnar, K.; Pawlos, M. Organic Magnesium Salts Fortification in Fermented Goat's Milk. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 1615–1625. [[CrossRef](#)]
30. Wawrzyniak, N.; Suliburska, J. Nutritional and health factors affecting the bioavailability of calcium: A narrative review. *Nutr. Rev.* **2021**, *79*, 1307–1320. [[CrossRef](#)]
31. Vavrusova, M.; Leif Skibsted, H. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT Food Sci. Technol.* **2014**, *59*, 1198–1204. [[CrossRef](#)]
32. Bijl, E.; van Valenberg, H.J.F.; Huppertz, T.; van Hooijdonk, A.C.M. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 5455–5464. [[CrossRef](#)]
33. De Kruif, C.G.; Huppertz, T.; Urban, V.S.; Petukhov, A.V. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *171–172*, 36–52. [[CrossRef](#)]
34. Shkemi, B.; Huppertz, T. Calcium Absorption from Food Products: Food Matrix Effects. *Nutrients* **2022**, *14*, 180. [[CrossRef](#)]

35. Dunshea, F.R.; Walker, G.P.; Williams, R.; Doyle, P.T. Mineral and Citrate Concentrations in Milk Are Affected by Seasons, Stage of Lactation and Management Practices. *Agriculture* **2019**, *9*, 25. [[CrossRef](#)]
36. Nieto, J.A.; Soriano-Romani, L.; Cobos-Tomas, L.; Sharma, L.; Budde, T. Improved *in vitro* bioavailability of a newly developed functionalized calcium carbonate salt as a food ingredient and its comparison with available commercial calcium salts. *Food Chem.* **2021**, *348*, 128740. [[CrossRef](#)]
37. Kaczkan, M.; Bienias, A.; Małgorzewicz, S. Realization of low phosphate diet and hidden sources of phosphorus. *Forum. Nefrol.* **2018**, *11*, 15–23.
38. Neuman, M.; Goderska, K.; Grajek, K.; Grajek, W. In vitro gastrointestinal models for nutrient bioavailability studies. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* **2006**, *13*, 30–45. (In Polish)
39. Huppertz, T.; Chia, L.W. Milk protein coagulation under gastric conditions: A review. *Int. Dairy J.* **2021**, *113*, 104882. [[CrossRef](#)]
40. Dalgleish, D.G.; Law, A.J.R. pH-Induced dissociation of bovine casein micelles II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *J. Dairy Res.* **1989**, *56*, 727–735. [[CrossRef](#)]
41. Le Graët, Y.; Gaucheron, F. pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: Influence of casein concentration and ionic strength. *J. Dairy Res.* **1999**, *66*, 215–224. [[CrossRef](#)]
42. Gao, K.P.; Mitsui, T.; Fujiki, K.; Ishiguro, H.; Kondo, T. Effect of lactase preparations in asymptomatic individuals with lactase deficiency-gastric digestion of lactose and breath hydrogen analysis. *Nagoya J. Med. Sci.* **2002**, *65*, 21–28.
43. Liu, W.; Jin, Y.; Wilde, P.J.; Hou, Y.; Wang, Y.; Han, J. Mechanisms, physiology, and recent research progress of gastric emptying. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 2742–2755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kozłowska, L. Dietary phosphorus sources and the risk of mineral and bone complications in people with chronic kidney disease. *Bromat. Chem. Toksykol.–XLV* **2012**, *3*, 822–826. (In Polish)
45. Bosscher, D.; Van Caillie-Bertrand, M.M.D.; Deelstra, H. Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formulas. *Nutrition* **2001**, *17*, 614–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. van der Velde, R.Y.; Brouwers, J.R.B.J.; Geusens, P.P.; Lems, W.F.; van den Bergh, J.P.W. Calcium and vitamin D supplementation: State of the art for daily practice. *Food Nutr. Res.* **2014**, *58*, 21796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kaushik, R.; Sachdeva, B.; Arora, S.; Kapila, S.; Wadhwa, B.K. Bioavailability of vitamin D<sub>2</sub> and calcium from fortified milk. *Food Chem.* **2014**, *147*, 307–311. [[CrossRef](#)]
48. Wasserman, R.H. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 3137–3139. [[CrossRef](#)]
49. Lameris, A.L.; Nevalainen, P.I.; Reijnen, D.; Simons, E.; Eygensteyn, J.; Monnens, L.; Bindels, R.J.M.; Hoenderop, J.G.J. Segmental transport of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> along the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2015**, *308*, G206–G216. [[CrossRef](#)]
50. Szalast-Pietrzak, A.; Marzec, Z.; Kopciał, E.; Wiater, S. Effect of food products on the bioavailability of calcium from dietary supplements used in osteoporosis. *Probl. Hig. Epidemiol.* **2017**, *98*, 345–349. (In Polish)
51. Sharifi-Rad, J.; Rodrigues, C.F.; Stojanović-Radić, Z.; Dimitrijević, M.; Aleksić, A.; Neffe-Skocińska, K.; Zielińska, D.; Kołożyn-Krajewska, D.; Salehi, B.; Milton Prabu, S.; et al. Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Medicina* **2020**, *56*, 433. [[CrossRef](#)]
52. Gilman, J.; Cashman, K.D. The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2006**, *7*, 1–5.
53. Hussain, S.; Jöudu, I.; Bhat, R. Dietary Fiber from Underutilized Plant Resources—A Positive Approach for Valorization of Fruit and Vegetable Wastes. *Sustainability* **2020**, *12*, 5401. [[CrossRef](#)]
54. Bohn, L.; Josefsen, L.; Meyer, A.S.; Rasmussen, S.K. Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7547–7552. [[CrossRef](#)]
55. Yang, Q.; Liang, Q.; Balakrishnan, B.; Belobrajdic, D.P.; Feng, Q.-J.; Zhang, W. Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients* **2020**, *12*, 381. [[CrossRef](#)]
56. Aljewicz, M.; Siemianowska, E.; Cichosz, G.; Tońska, E. The effect of probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, and *Lactobacillus acidophilus* NCFM) on the availability of minerals from Dutch-type cheese. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 4824–4831. [[CrossRef](#)]
57. Knudsen, E.; Sandström, B.; Solgaard, P. Zinc, copper and magnesium absorption from a fibre-rich diet. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **1996**, *10*, 68–76. [[CrossRef](#)]
58. Abrams, S.A.; Grusak, M.A.; Stuff, J.; O'Brien, K.O. Calcium and magnesium balance in 9–14-y-old children. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *66*, 1172–1177. [[CrossRef](#)]
59. Stone, M.S.; Martyn, L.; Weaver, C.M. Potassium Intake, Bioavailability, Hypertension, and Glucose Control. *Nutrients* **2016**, *8*, 444. [[CrossRef](#)]
60. Demigne, C.; Sabboh, H.; Remesy, C.; Meneton, P. Protective Effects of High Dietary Potassium: Nutritional and Metabolic Aspects. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2903–2906. [[CrossRef](#)]
61. Bechgaard, H.; Shephard, N.W. Bioavailability of potassium from controlled-release tablets with and without water loading. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1981**, *21*, 143–147. [[CrossRef](#)]
62. Betlach, C.J.; Arnold, J.D.; Frost, R.W.; Leese, P.T.; Gonzalez, M.A. Bioavailability and pharmacokinetics of a new sustained-release potassium chloride tablet. *Pharm. Res.* **1987**, *4*, 409–411. [[CrossRef](#)]
63. ICRP. The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection. *Ann. ICRP* **2007**, *37*, 1–332.

64. Ceccanti, C.; Guidi, L.; D'Alessandro, C.; Cupisti, A. Potassium Bioaccessibility in Uncooked and Cooked Plant Foods: Results from a Static In Vitro Digestion Methodology. *Toxins* **2022**, *14*, 668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Picard, K. Potassium additives and bioavailability: Are we missing something in hyperkalemia management? *J. Ren. Nutr.* **2019**, *29*, 350–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. MacDonald-Clarke, C.J.; Martin, B.R.; McCabe, L.D.; McCabe, G.P.; Lachcik, P.J.; Wastney, M.; Weaver, C.M. Bioavailability of potassium from potatoes and potassium gluconate: A randomized dose response trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *104*, 346–353. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium

Nauk Przyrodniczych

z dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia ... 25.10.2024 .....

Imię i nazwisko **mgr inż. Magdalena Kowalczyk**

Jednostka **Instytut Technologii Żywności i Żywienia, Zakład Technologii Mleczarstwa**

Promotor **dr hab. inż. Agata Znamiorska-Piotrowska, prof. UR**

Promotor pomocniczy **dr inż. Małgorzata Pawlos**

#### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

I. Kowalczyk M., Znamiorska A., Buniowska M. Probiotic sheep milk ice cream with inulin and apple fiber. *Foods*, 2021, 10(3), 678.

- koncepcja badań – ustalenie wraz z promotorem receptury wytwarzania lodów
- metodyka – dobór metod do oceny mieszanek lodowych i lodów
- walidacja – walidacja metod
- przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- zasoby – wykonanie badań
- zarządzanie danymi – analiza i zestawienie wyników badań
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- finansowanie – pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu

*Magdalena Kowalczyk*

podpis

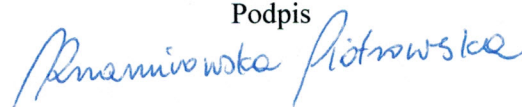
## Oświadczenia współautorów

### 1. dr hab. inż. Agata Znamiorska-Piotrowska, prof. UR

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – ustalenie wraz z doktorantką receptury wytwarzania lodów
- walidacja – walidacja metod
- analiza formalna – analiza statystyczna wyników badań
- zasoby – wykonanie badań
- zarządzanie danymi – analiza i zestawienie wyników badań
- pisanie – nadzór nad przygotowaniem pierwszej wersji manuskryptu
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna korekta manuskryptu
- opiekun naukowy
- administrator projektu
- finansowanie – pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu

Podpis



### 2. dr inż. Magdalena Buniowska-Olejniak

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- oprogramowanie – kalibracja urządzeń
- walidacja – walidacja metod
- przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- pisanie - udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- finansowanie - pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu

Podpis



Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium

Nauk Przyrodniczych

z dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia ..... 25.10.2024 .....

Imię i nazwisko **mgr inż. Magdalena Kowalczyk**

Jednostka **Instytut Technologii Żywności i Żywienia, Zakład Technologii Mleczarstwa**

Promotor **dr hab. inż. Agata Znamirska-Piotrowska, prof. UR**

Promotor pomocniczy **dr inż. Małgorzata Pawlos**

### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

II. Magdalena Kowalczyk, Agata Znamirska, Małgorzata Pawlos, Magdalena Buniowska. The Use of Olkuszka Sheep Milk for the Production of Symbiotic Dairy Ice Cream. *Animals* 2022, 12, 70.

- koncepcja badań – ustalenie wraz z promotorem receptury wytwarzania lodów
- metodyka – dobór metod do oceny mieszanek lodowych i lodów
- oprogramowanie – kalibracja urządzeń
- walidacja – walidacja metod
- analiza formalna – analiza statystyczna wyników badań
- przeszukiwanie baz danych i zbior literatury
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- wizualizacja – opracowanie wyników pod kątem graficznym
- administrator projektu
- finansowanie – pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu

*Magdalena Kowalczyk*

podpis

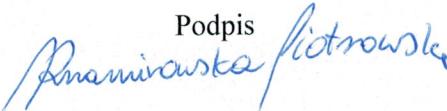
## Oświadczenia współautorów

### 1. dr hab. inż. Agata Znamirska-Piotrowska, prof. UR

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – ustalenie wraz z doktorantką receptury wytwarzania lodów
- walidacja – walidacja metod
- analiza formalna – analiza statystyczna wyników badań
- zasoby – wykonanie badań
- zarządzanie danymi – analiza i zestawienie wyników badań
- pisanie – nadzór nad przygotowaniem pierwszej wersji manuskryptu
- opiekun naukowy

Podpis



### 2. dr inż. Małgorzata Pawłowska

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- walidacja – walidacja metod
- przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu



Podpis

### 3. dr inż. Magdalena Buniowska-Olejnik

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- walidacja – walidacja metod
- przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Magdalena Buniowska-Olejnik', written over a faint, illegible stamp.

Podpis

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium

Nauk Przyrodniczych

z dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia ... 25.10.2024 .....

Imię i nazwisko **mgr inż. Magdalena Kowalczyk**

Jednostka **Instytut Technologii Żywności i Żywienia, Zakład Technologii Mleczarstwa**

Promotor **dr hab. inż. Agata Znamirowska-Piotrowska, prof. UR**

Promotor pomocniczy **dr inż. Małgorzata Pawlos**

### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

III. Magdalena Kowalczyk, Agata Znamirowska-Piotrowska, Magdalena Buniowska-Olejnik, Małgorzata Pawlos. Sheep Milk Symbiotic Ice Cream: Effect of Inulin and Apple Fiber on the Survival of Five Probiotic Bacterial Strains during Simulated In Vitro Digestion Conditions. *Nutrients* 2022, 14, 4454.

- koncepcja badań – ustalenie wraz z promotorem procedury symulowanego trawienia i oznaczania przeżywalności komórek probiotyku
- metodyka – dobór metod do oznaczania przeżywalności komórek probiotyku
- oprogramowanie – kalibracja urządzeń
- walidacja – walidacja metody trawienia *in vitro*
- analiza formalna – analiza statystyczna wyników badań
- przeszukiwanie baz danych i zbiór literatury
- zasoby – wykonanie badań
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- administrator projektu
- finansowanie – pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu

*Magdalena Kowalczyk*

Podpis

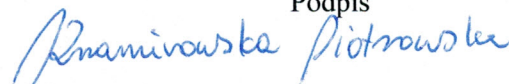
## Oświadczenia współautorów

### 1. dr hab. inż. Agata Znamirska-Piotrowska, prof. UR

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – ustalenie wraz z doktorantką procedury symulowanego trawienia i oznaczania przeżywalności komórek probiotyku
- metodyka – dobór metod do oznaczania przeżywalności komórek probiotyku
- oprogramowanie – kalibracja urządzeń
- walidacja – walidacja metody trawienia *in vitro*
- analiza formalna – analiza statystyczna wyników badań
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- opiekun naukowy

Podpis

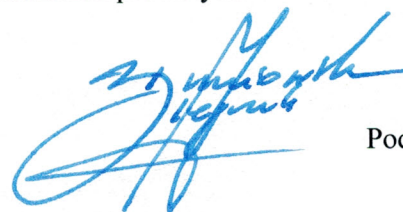


### 2. dr inż. Magdalena Buniowska-Olejniak

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodyka – dobór metod do oznaczania przeżywalności komórek probiotyku

Podpis



### 3. dr inż. Małgorzata Pawlos

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie - udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu

*Małgorzata Pawlos*  
Podpis

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium

Nauk Przyrodniczych

z dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia ..... 25.10.2024 .....

Imię i nazwisko **mgr inż. Magdalena Kowalczyk**

Jednostka **Instytut Technologii Żywności i Żywienia, Zakład Technologii Mleczarstwa**

Promotor **dr hab. inż. Agata Znamirowska-Piotrowska, prof. UR**

Promotor pomocniczy **dr inż. Małgorzata Pawlos**

#### OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

IV. Magdalena Kowalczyk, Agata Znamirowska-Piotrowska, Magdalena Buniowska-Olejnik, Grzegorz Zaguła, Małgorzata Pawlos. Bioavailability of Macroelements from Synbiotic Sheep's Milk Ice Cream. *Nutrients* 2023, 15, 14, 3230.

- koncepcja badań – ustalenie wraz z promotorem procedury symulowanego trawienia i oznaczania biodostępności makroelementów
- metodyka – dobór metod do oznaczania biodostępności makroelementów
- oprogramowanie – kalibracja urządzeń
- walidacja – walidacja metody trawienia *in vitro*
- analiza formalna (statystyczna wyników badań)
- przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- zasoby – wykonanie badań
- pisanie - przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- administrator projektu
- finansowanie – pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu

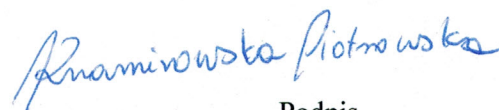
*Magdalena Kowalczyk*  
podpis

## Oświadczenia współautorów

### 1. dr hab. inż. Agata Znamiorska-Piotrowska, prof. UR

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – ustalenie wraz z doktorantką procedury symulowanego trawienia i oznaczania biodostępności makroelementów
- metodyka – dobór metod do oznaczania biodostępności makroelementów
- oprogramowanie – kalibracja urządzeń
- walidacja – walidacja metody trawienia *in vitro*
- analiza formalna – analiza statystyczna wyników badań
- pisanie – przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie – udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu
- opiekun naukowy

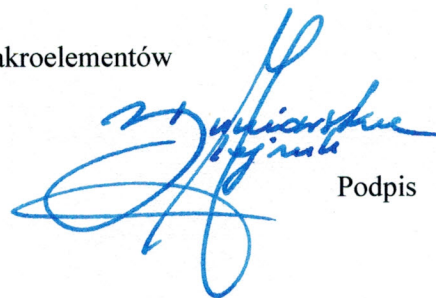


Podpis

### 2. dr inż. Magdalena Buniowska-Olejniki

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodyka – dobór metod do oznaczania biodostępności makroelementów

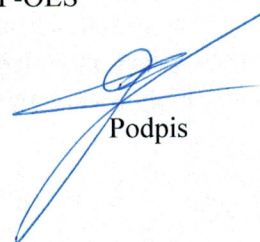


Podpis

### 3. dr hab. inż. Grzegorz Zaguła, prof. UR

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- metodyka – dostosowanie metodologii do analizy biopierwiastków metodą ICP-OES

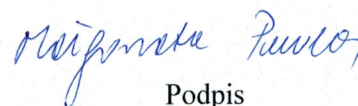


Podpis

### 4. dr inż. Małgorzata Pawlos

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Magdalenę Kowalczyk udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- pisanie - przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pisanie - udział w przygotowaniu i ostateczna wersja manuskryptu



Podpis