

WZBOGACANIE MLECZANEM MAGNEZU I WAPNIA MLECZNYCH NAPOJÓW FERMENTOWANYCH PRZEZ *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SSP. *LACTIS* Bb-12

Agata Znamirska[✉], Magdalena Buniowska, Piotr Kuźniar
UR w Rzeszowie, Wydział Biologiczno-Rolniczy

Streszczenie. Celem pracy było określenie możliwości wzbogacania mleczanami wapnia oraz magnezu mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 oraz określenie wpływu dodanych makroelementów na właściwości fizykochemiczne, sensoryczne, teksturę oraz liczbę komórek bakterii. Mleka wzbogacono mleczanem magnezu (30 i 50 mg Mg·100 g⁻¹) oraz mleczanem wapnia (80 i 100 mg Ca·100 g⁻¹). Inkubację zaszczipionego DVS – Bb-12 mleka prowadzono w temperaturze 37°C przez 10–13 godzin. W napojach oznaczano: pH, synerżę, teksturę i barwę. Ocenę sensoryczną wykonano metodą profilowania, a ocenę preferencji metodą szeregowania. Posiewy komórek bifidobakterii wykonywano z zastosowaniem metody płytkowej. Dodatek magnezu w dawkach 30 i 50 mg Mg·100 g⁻¹ korzystnie wpłynął na liczbę komórek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 i ograniczył synerżę napojów. Wzbogacanie mleka wapniem w ilości 80 mg Ca·100 g⁻¹ oraz 100 mg Ca·100 g⁻¹ nie wpłynęło na rozwój komórek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 i skutkowało otrzymaniem napoju o liczbie komórek bakterii zbliżonej do napoju kontrolnego. Napoje wzbogacane mleczanami magnezu (30 i 50 mg Mg·100 g⁻¹) i wapnia (80 i 100 mg Ca·100 g⁻¹) cechowały się mniejszą twardością i sprężystością.

Słowa kluczowe: *Bifidobacterium*, mleczan, wapń, magnez, mleka fermentowane

WSTĘP

Bifidobakterie są jednymi z pierwszych mikroorganizmów zasiedlających jałowy przewód pokarmowy noworodka i stanowią największą grupę mikroflory jelitowej (nawet 95% całej populacji) w okresie karmienia mlekiem matki [Favier i in. 2003]. Pomimo obserwowanych wraz z wiekiem i dietą zmian w mikroflorze jelitowej, bifidobakterie

[✉]aznam@univ.rzeszow.pl

występują również u osób dorosłych i są pod względem udziału ilościowego trzecim rodzajem (po *Bacteroides* i *Eubacterium*) i stanowią od 3 do 6% całkowitej populacji [Lay i in. 2005]. Bifidobakterie fermentując sacharydy, wytwarzają: kwas mlekowy, octowy, mrówkowy i etanol. Zakwaszenie treści jelita przez metabolity wytworzone przez bifidobakterie hamuje wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych, redukuje stężenie cholesterolu i stymuluje apoptozę komórek nowotworowych [Jędrzejczak-Krzepkowska i Bielecki 2011]. Istnieje wiele czynników mających wpływ na zdolność fermentacji i przeżywalność drobnoustrojów w produktach spożywczych. Komórki bakterii są wrażliwe na niektóre czynniki środowiskowe i wykazują różną przeżywalność w mlecznych napojach fermentowanych. Zróżnicowana przeżywalność bakterii może wynikać z odmiennej wrażliwości stosowanych szczepów bakterii probiotycznych, czasu fermentacji, warunków przechowywania, pH produktu, stężenia cukru, zawartości suchej substancji i dostępu do substancji odżywczych [Jędrzejczak-Krzepkowska i Bielecki 2011, Ziarno i in. 2011, Ziarno i Więclawski 2006].

Mleczany wapnia i magnezu są najczęściej używanymi formami chemicznymi tych metali jako suplementy diety. Mleczan wapnia jest to związek łatwo przyswajalny przez organizm człowieka, stabilizuje wartość pH żywności i obniża aktywność wody ograniczając namnażanie się mikroflory bakteryjnej [Miernik 2016]. Ponadto ma właściwości przeciwutleniające oraz należy do bezpiecznych dodatków do żywności, które można stosować bez ograniczeń dawki dziennej [FAO/WHO 2002]. Mleczan magnezu jest stosowany w farmacji i przemyśle spożywczym ze względu na wysoką rozpuszczalność w wodzie i biodostępność w porównaniu z nieorganicznymi związkami magnezu [Coudray i in. 2005].

Celem pracy było określenie możliwości wzbogacania mleczanami wapnia oraz magnezu mleka fermentowanego przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 oraz określenie wpływu dodanych makroelementów na właściwości fizykochemiczne, sensoryczne, teksturę oraz liczbę komórek bifidobakterii.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do produkcji napojów było mleko krowie pasteryzowane, mikrofiltrowane o zawartości tłuszczu 2% (OSM Piątnica, Polska), mleczan wapnia 5-wodny cz.d.a. (Chempur, Polska) oraz jednowodny L-mleczan magnezu cz.d.a. (Sigma-Aldrich, Hiszpania).

Mleka wzbogacono mleczanem magnezu w dawkach 30 i 50 mg Mg na 100·g⁻¹ mleka oraz mleczanem wapnia w ilości 80 mg i 100 mg Ca·100 g⁻¹ mleka. Wykonano również próbę kontrolną bez dodatku wapnia i magnezu. Dawki wapnia i magnezu obliczono na podstawie masy cząsteczkowej mleczanów. Następnie mleka homogenizowano (40°C, 20 MPa), oznaczono pH i dodawano 0,02% startera DVS – Bb-12 o składzie: *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen, Dania). Wymieszane mleko rozlewano do opakowań o pojemności 100 ml z pokrywką i kodowano. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 10–13 godzin. Warunkiem jej zakończenia było uzyskanie pH 4,8 we wszystkich grupach. Czas fermentacji poszczególnych grup wynosił: kontrolna – 10 godzin, wzbogacona 30 mg Mg – 11 godzin, wzbogacona 50 mg magnezu

– 12,5 godziny, wzbogacona 80 i 100 mg Ca – 13 godzin. Następnie uzyskane napoje schładzano do 5°C i przechowywano w tej temperaturze.

Próbki do analiz pobierano w 7. dniu przechowywania, licząc czas od uzyskania w napojach temperatury 5°C. W napojach oznaczano ($n = 10$, dla każdej grupy): pH z użyciem pH-metru Toledo FiveEasy TM (Mettler Toledo, Szwajcaria), synerezę metodą wirówkową [Zhao i in. 2018], teksturę zmodyfikowanym testem TPA (teksturometrem Brookfield CT3, Brookfield AMETEK, USA) w którym przyrząd wykonuje dwukrotny test penetracyjny z automatycznym pomiarem wysokości próbki. Test wykonywano przy ustawieniach: siła 0,1 N, prędkość głowicy $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, dystans 15 mm, średnica próbki 35 mm, sonda TA3/100, średnica elementu pomiarowego 25,3 mm (Brookfield AMETEK, USA). Określano następujące składowe tekstury ($n = 10$, dla każdej grupy): twardość, adhezyjność, kohezynność i sprężystość. Posiewy bifidobakterii wykonywano z zastosowaniem metody płytkowej ($n = 10$, dla każdej grupy). Inkubację posiewów w podłożu MRS Agar (Biocorp, Poland) wykonano w temperaturze 37°C przez 72 godziny w warunkach beztlenowych [Lima i in. 2009]. Do utrzymania warunków beztlenowych użyto eksykatora próżniowego oraz GENbox anaer (Biomerieux, Polska), a do kontroli warunków wskaźnika Anaer indicator (Biomerieux, Polska). Wyniki podano w $\log \text{ jtk}\cdot\text{g}^{-1}$.

Barwę napojów mierzono instrumentalnie (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta, Japonia; $n = 10$, dla każdej grupy) w systemie CIE LAB ($L^*a^*b^*$) [Achanti i in. 2007]. Ocenę sensoryczną wykonano metodą profilowania i przeprowadził ją przeszkolony 20-osobowy zespół ($n = 20$, dla każdej grupy). Oceniano próbki w skali 9-stopniowej ze skalą liniową ustrukturuowaną i z określeniami brzegowymi: lewy koniec skali oznaczał cechę najmniej wyczuwalną, najmniej charakterystyczną, a prawy – cechę najintensywniejszą, najbardziej charakterystyczną. Oceniano: konsystencję, barwę, smak mleczno-kremowy, smak kwaśny, smak słodki, smak obcy, zapach kwaśny i obcy, a także zapach dodatków [PN-ISO 4121:1998, PN-ISO 11035:1999]. Ocenę preferencji przeprowadzono metodą szeregowania – od najlepszej „1” do najgorszej „5”.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie w programie Statistica 12. Przeprowadzono jednoczynnikową wariancji, a istotność różnic między wartościami średnimi szacowano testem Tukeya, przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

WYNIKI I DISKUSJA

W tabeli 1 przedstawiono wpływ wzbogacania mleczanem wapnia i magnezu na wartość pH mleka przed fermentacją. Poprzez fortyfikację mleka mleczanami istotnie obniżono wartość pH mleka we wszystkich grupach wzbogaconych w wapń i magnez w porównaniu do mleka kontrolnego ($p \leq 0,05$). Dodatek magnezu w ilości 30 i 50 mg obniżył wartość pH o 0,37–0,38 jednostki. Nie stwierdzono istotnych różnic w kwasowości czynnej mleka między grupą wzbogaconą w 30 Mg i 50 mg Mg·100 g⁻¹ mleka. Z kolei w grupie wzbogaconej w 100 mg Ca·100 g⁻¹ pH zmniejszyło się o 0,67 jednostki w porównaniu do wartości pH w mleku bez dodatków. Różnice w wartościach pH mleka wynikające z zastosowania różnych dawek wapnia były nieistotne. Ziarno i inni [2004] także wykazali, że związki wapniowe rozpuszczalne w wodzie (mleczan, glukonian, laktoglukonian, chlorek) powodowały obniżenie pH i wzrost kwasowości miareczkowej śmietanki.

Tabela 1. Kwasowość czynna mleka z mleczanami magnezu i wapnia

Table 1. Acidity of milk with magnesium and calcium lactates

Kwasowość Acidity	Kontrolna Control	Dodatek magnezu Magnesium addition [mg Mg·100 g ⁻¹]		Dodatek wapnia Calcium addition [mg Ca·100 g ⁻¹]	
	0	30	50	80	100
pH	6,57 ^c ±0,01	6,20 ^b ±0,02	6,19 ^b ±0,01	5,98 ^a ±0,05	5,90 ^a ±0,03

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe – Table shows mean values ± standard deviations; ^{a,b,c} wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) – mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

Wielu autorów [Ilangovan i in. 2001, Naik i in. 2006, Thomas i Rice 2014] podkreśla istotne znaczenie jonów wapnia i magnezu w zapewnieniu homeostazy kationowej komórek bakterii. Jony wapnia uczestniczą w synergicznych interakcjach z enzymami odpowiedzialnymi za mocowanie białek powierzchniowych do ściany komórkowej, wpływając w ten sposób na zdolność adhezyjną komórek bakterii [Ilangovan i in. 2001, Naik i in. 2006]. Z kolei jony magnezu odgrywają rolę w syntezie peptydoglikanów, zwiększaniu wytrzymałości ścian komórkowych i zapobieganiu lizie komórek [Thomas i Rice 2014].

Fortyfikacja magnezem miała istotny wpływ na liczbę komórek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 w napojach (tab. 2). Największą liczbą komórek bakterii charakteryzowały się napoje wzbogacone w 30 mg Mg i liczba ta była istotnie wyższa (o 0,26 log jtk·g⁻¹) od próby kontrolnej ($p \leq 0,05$). Zwiększenie dawki fortyfikacji Mg do 50 mg także korzystnie wpłynęło na wzrost komórek szczepu Bb-12 w porównaniu do próby kontrolnej. Jednak wykazano mniej komórek *Bifidobacterium* w napojach z 50 mg magnezu niż w napojach z niższą dawką magnezu. Zgodnie z wytycznymi FAO/WHO [2002] minimalna liczba bakterii probiotycznych w produkcie gwarantująca osiągnięcie efektu terapeutycznego wynosi 6 log jtk·g⁻¹. Zawartość żywych komórek w napojach fortyfikowanych magnezem przekraczała tę liczbę o 2–3 log jtk·g⁻¹, co oznacza że napoje te spełniły kryterium stawiane produktom probiotycznym.

Tabela 2. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 w napojach fermentowanychTable 2. Number of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 in fermented beverages

Liczba bakterii Number of bacteria	Kontrolna Control	Dodatek magnezu Magnesium addition [mg Mg 100·g ⁻¹]		Dodatek wapnia Calcium addition [mg Ca100·g ⁻¹]	
	0	30	50	80	100
Bb-12 [log jtk·g ⁻¹]	8,79 ^a ±0,05	9,05 ^b ±0,13	8,91 ^b ±0,12	8,88 ^{ab} ±0,10	8,73 ^a ±0,12

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe – Table shows mean values ± standard deviations; ^{a,b,c} wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) – mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$.

W napojach wzbogaconych w 80 mg Ca·100 g⁻¹ liczba komórek bakterii probiotycznych była wyższa niż w kontrolnych, jednak różnice te nie były istotne. Zwiększenie dawki wzbogacenia do 100 mg Ca w napojach skutkowało liczbą komórek *Bifidobacterium* (8,73 log jtk·g⁻¹) zbliżoną do liczby ich komórek oznaczonej w napojach kontrolnych (8,79 log jtk·g⁻¹). Oznaczona liczba komórek bakterii probiotycznych w napojach fortyfikowanych wapniem pozwala na stwierdzenie, że spełniają kryterium stawiane produktom probiotycznym.

Ziarno i Więclawski [2006] w badaniach stwierdzają, że na dynamikę rozwoju bakterii fermentacji mlekowej duży wpływ wywierała ilość mleczanu wapnia użytego do wzbogacenia. Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek magnezu w dawkach 30 i 50 mg·100 g⁻¹ stymulował wzrost komórek szczepu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. Fortyfikacja napojów wapniem w dawkach 80 i 100 mg·100 g⁻¹ nie wpłynęła negatywnie na rozwój komórek *Bifidobacterium*, gdyż liczba komórek bakterii nie różniła się istotnie od liczebności *Bifidobacterium* w próbie kontrolnej.

Wyniki pomiarów synerезy, barwy i pH napojów fermentowanych przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 zamieszczono w tabeli 3. W napoju kontrolnym oznaczono synerезę na wysokim poziomie 67,07%. W badaniach Gustawa [2011] zastosowanie kultury probiotycznej ABT-1 również skutkowało wyższą synerезą napojów w porównaniu z jogurtami otrzymanymi z użyciem tradycyjnej kultury jogurtowej.

Wzbogacanie napojów mleczanem magnezu istotnie ograniczało synerезę napojów i wraz ze zwiększaniem dawki magnezu ilość wydzielanej serwatki zmniejszała się ($p \leq 0,05$). W badaniach Achanta i innych [2007] synerезa jogurtów wzbogaconych żelazem, selenem i magnezem była istotnie niższa niż w jogurtach kontrolnych, co oznaczało, że jogurty fortyfikowane selenem, magnezem i żelazem mają lepsze zdolności do zatrzymywania wody. Fortyfikacja mleczanem magnezu (35 mg Mg·100 g⁻¹) jogurtów typu greckiego w badaniach Znamirowskiej i innych [2015] powodowała zmniejszenie synerезy o 4–6%.

Zastosowanie do wzbogacania mleczanu wapnia skutkowało otrzymaniem żeli kwasowych o dużym poziomie synerезy, wynikającej m.in. z zastosowania 5-wodnego mleczanu wapnia. Wzbogacanie 5-wodnym mleczanem wiąże się z wprowadzeniem dodatkowych cząsteczek wody, które mogły wydzielić się w postaci wycieku. Dodatek wapnia w ilości 80 mg·100 g⁻¹ zwiększył synerезę o 5,29%, a dawka 100 mg Ca·100 g⁻¹ o 7,70% w porównaniu do ilości wydzielonej serwatki w napojach kontrolnych. W innych badaniach wykazano, że dodatek wapnia w formie cytrynianu ogranicza wyciek serwatki o ok. 2–3% w porównaniu do jogurtów niewzbogaconych [Szajnar i in. 2014].

Parametr L* określający jasność przyjął najwyższą wartość 95,17 dla napojów kontrolnych. Istotnie ciemniejszą barwą charakteryzowały się napoje wzbogacone w magnez i wapń ($p \leq 0,05$). Wraz ze zwiększaniem dawki wzbogacenia tymi makroelementami, stwierdzono coraz ciemniejszą barwę napojów fermentowanych przez *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. Wartości a* i b* oznaczone dla napojów fortyfikowanych mleczanami świadczyły o przesunięciu skali barw w przestrzeni w stronę zielonego i żółtego koloru w porównaniu do kontrolnych. Według Szajnar i innych [2017] wzbogacenie jogurtów magnezem w formie chlorku, L-pidolanu i octanu nadawało ciemniejszy kolor w porównaniu do barwy jogurtów, które nie zostały wzbogacone. Z kolei wzbogacanie jogurtów diglicynianem magnezu nie powodowało istotnego pociemnienia produktu

[Znamirowska i in. 2016]. W przytoczonych badaniach stwierdzono, że oznaczone kolorymetrycznie składowe barwy fortyfikowanych napojów mogą być uzależnione od dawki i rodzaju związku użytego do wzbogacania. Wobec powyższego, w kompleksowej ocenie barwy wzbogaconych napojów ważną rolę odgrywać będzie ocena sensoryczna.

Tabela 3. Syneresa, barwa i pH napojów fermentowanych

Table 3. Syneresis, colour and pH values of fermented beverages

Właściwości Properties	Kontrolna Control	Dodatek magnezu Magnesium addition [mg Mg·100 g ⁻¹]		Dodatek wapnia Calcium addition [mg Ca·100 g ⁻¹]	
	0	30	50	80	100
Syneresa Syneresis [%]	67,07 ^c ±1,01	64,77 ^b ±1,04	56,43 ^a ±1,38	72,36 ^d ±1,17	74,77 ^d ±1,21
pH	4,42 ^a ±0,07	4,55 ^a ±0,08	4,68 ^b ±0,04	4,75 ^c ±0,12	4,79 ^c ±0,20
L*	95,17 ^d ±0,42	93,02 ^c ±0,60	88,47 ^b ±1,07	88,90 ^b ±0,70	85,58 ^a ±1,86
a*	-4,07 ^a ±0,08	-4,38 ^b ±0,08	-5,01 ^c ±0,22	-4,99 ^c ±0,09	-7,04 ^d ±0,30
b*	13,47 ^a ±0,12	14,37 ^b ±0,31	15,66 ^c ±0,51	16,18 ^c ±0,18	18,17 ^d ±0,23

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe – Table shows mean values ± standard deviations; ^{a,b,c} wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) – mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0,05$.

W napojach fermentowanych w zależności od dawki i zastosowanego makroelementu pH przyjmowało wartości od 4,42 (kontrolna) do 4,79 (napój 100 mg Ca). Wykazano istotnie wyższe wartości pH w napojach wzbogaconych w 50 mg Mg·100 g⁻¹, 80 i 100 mg Ca·100 g⁻¹ niż w próbie kontrolnej ($p \leq 0,05$). Wartość pH wzbogaconych napojów była wyższa od napojów niefortyfikowanych, co bezpośrednio wpływało na zdolność do tworzenia skrzepu i jego zwięzłość. Podobnych spostrzeżeń dokonali Ziarno i Więclawski [2006], którzy wykazali, że dodatek mleczanu wapnia do mleka przerobowego sprawił, iż wartość pH mleka po fermentacji była większa niż mleka bez tego dodatku i fermentowanego w tych samych warunkach czasowo-temperaturowych. Koutina i inni [2016] wzbogacając mleko chlorkiem wapnia, stwierdzili, że przy pH 5,2–4,6 większość dodanego wapnia pozostawało w fazie wodnej mleka, podczas gdy przy pH większym niż 5,2 wapń był przyłączany także do miceli. Ponadto przy pH 5,2 i mniejszym koloidalny fosforan wapnia został całkowicie rozpuszczony, a większość dodanego wapnia pozostała w fazie wodnej, powodując mniej rearanżacji w tworzeniu sieci żelowej. W konsekwencji przy pH mniejszym niż 5,6 silniejszy wpływ na tworzenie i twardość żelu kwasowego wywierało pH niż dodatek wapnia.

Analiza składowych tekstury napojów wzbogaconych w wapń wykazała, że cechowały się one istotnie niższymi wartościami twardości i sprężystości od napojów kontrolnych (tab. 4). Należy nadmienić, że w napojach tych oznaczono wyższe wartości pH niż w kontrolnych, co potwierdza wnioskowanie Koutina i innych [2016].

Ziarno i Więclawski [2006] zauważyli osłabienie zwięzłości i stabilności skrzepu powstałego podczas inkubacji 100 ml mleka zawierającego dodatek 4 g mleczanu wapnia. Z kolei fortyfikacja cytrynianem triwapniowym jogurtów w badaniach Szajnar i innych [2014] nie wpływała znacząco na twardość, adhezyjność i sprężystość.

Tabela 4. Tekstura napojów fermentowanych

Table 4. Texture parameters of fermented beverages

Parametry tekstury Texture parameters	Kontrolna Control	Dodatek magnezu Magnesium addition [mg Mg·100 g ⁻¹]		Dodatek wapnia Calcium addition [mg Ca·100 g ⁻¹]	
	0	30	50	80	100
Twardość Hardness [N]	3,82 ^d ±0,45	0,54 ^b ±0,05	0,93 ^c ±0,08	0,30 ^a ±0,04	0,32 ^a ±0,04
Adhezyjność Adhesiveness [mJ]	0,16 ^{ab} ±0,09	0,30 ^a ±0,12	0,12 ^b ±0,04	0,16 ^{ab} ±0,09	0,22 ^a ±0,13
Kohezyjność Cohesiveness	0,53 ^a ±0,11	0,62 ^a ±0,12	0,92 ^b ±0,04	0,90 ^b ±0,10	0,89 ^b ±0,05
Sprężystość Springiness [mm]	14,71 ^b ±0,30	12,22 ^a ±1,05	14,45 ^b ±0,33	13,50 ^a ±0,86	13,81 ^a ±0,46

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe – Table shows mean values ± standard deviations; ^{a,b,c} wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) – mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0,05$.

Twardość napojów fortyfikowanych magnezem była istotnie mniejsza niż kontrolnych ($p \leq 0,05$). W innych badaniach również wykazano, że wzbogacanie jogurtów związkami magnezu, takimi jak: mleczan, chlorek, octan, L-pidolan, zmniejsza twardość i adhezyjność żelu jogurtowego [Szajnar i in. 2017]. Wzbogacanie jogurtów diglicyanem magnezu zmieniło istotnie ich adhezyjność, a nie wpłynęło na twardość i kohezyjność [Znamirowska i in. 2016].

Kohezyjność badanych napojów przyjmowała większe wartości w napojach fortyfikowanych mleczanami niż kontrolnych, odwrotnie niż w przypadku sprężystości.

W ocenie sensorycznej najbardziej były preferowane napoje z magnezem, zwłaszcza dawką 30 mg Mg·100 g⁻¹ (tab. 5). O takim wyniku zdecydowały przede wszystkim noty za smaki intensywny mleczno-kremowy, umiarkowany kwaśny, niewyczuwalny i obcy. W napojach wzbogaconych 50 mg Mg·100 g⁻¹ istotnie zmniejszyła się wyczuwalność smaku kwaśnego na korzyść zwiększenia intensywności smaku słodkiego, w porównaniu z napojem kontrolnym i wzbogaconym 30 mg Mg·100 g⁻¹ ($p \leq 0,05$).

W napojach fortyfikowanych wapniem stwierdzono mniej charakterystyczną konsystencję oraz intensywniejszy smak i zapach obcy, niż w kontrolnych, i z dodatkiem magnezu. Ponadto dodatek wapnia spowodował obniżenie intensywności smaku mleczno-kremowego i kwaśnego w napojach. To właśnie te wyróżniki jakości przyczyniły się do niższej akceptowalności napojów wzbogaconych w wapń. Noty przyznane za barwę napojów wzbogaconych wapniem i magnezem były niższe niż kontrolnych, jednak różnice te były nieistotne. W tym przypadku wykazane instrumentalnie zmiany w parametrach barwy nie były aż tak duże, aby zostać dostrzeżone przez panelistów.

Singh i inni [2007] stwierdzili, że niektóre związki wapnia nadają nieprzyjemny zapach i zabarwienie oraz piaszczystą konsystencję. W badaniach tych sacharynian wapnia nadawał mleku gorzki smak, węglan osadzał się na dnie, chlorek silnie zakwaszał mleko, nadając również kwaśny smak. Mleczan i glukonian wapnia były najbardziej neutralne oraz nie miały negatywnego wpływu na smak i zapach mleka w dawce 50 mg·100 ml⁻¹

Tabela 5. Wyniki oceny sensorycznej napojów fermentowanych

Table 5. Sensory analysis of fermented beverages

Właściwości Attributes	Kontrolna Control	Dodatek magnezu Magnesium addition [mg Mg·100 g ⁻¹]		Dodatek wapnia Calcium addition [mg Ca·100 g ⁻¹]	
	0	30	50	80	100
Preferencje Preferences	2,56 ^b ±0,90	1,45 ^a ±0,58	1,96 ^a ±0,38	2,86 ^{bc} ±0,69	4,13 ^c ±0,79
Konsystencja Consistency	8,71 ^c ±0,49	7,64 ^b ±1,07	7,71 ^b ±0,49	6,20 ^a ±0,58	6,29 ^a ±0,49
Barwa Colour	8,87 ^a ±0,53	8,86 ^a ±0,38	8,57 ^a ±0,53	8,57 ^a ±0,79	8,57 ^a ±0,79
Smak mleczno-kremowy Milky-cream flavor	4,20 ^c ±0,50	5,00 ^c ±0,50	5,00 ^c ±0,50	3,00 ^a ±0,65	2,29 ^a ±0,76
Smak kwaśny Sour taste	6,50 ^d ±0,50	5,00 ^c ±0,20	3,00 ^b ±0,30	2,00 ^a ±0,30	2,00 ^a ±0,20
Smak słodki Sweet taste	2,00 ^a ±0,50	2,00 ^a ±0,50	2,86 ^b ±0,38	2,60 ^b ±0,36	2,89 ^b ±0,76
Smak obcy Off-flavours taste	1,00 ^a ±0,00	1,00 ^a ±0,00	1,86 ^b ±0,38	2,00 ^b ±0,24	2,86 ^b ±0,38
Zapach kwaśny Sour smell	3,57 ^a ±0,30	3,27 ^a ±0,23	3,14 ^a ±0,77	3,20 ^a ±0,83	3,23 ^a ±0,90
Zapach obcy Off-flavours smell	1,00 ^a ±0,00	1,19 ^b ±0,15	1,29 ^b ±0,23	1,86 ^c ±0,28	1,86 ^c ±0,18

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe – Table shows mean values ± standard deviations; ^{a,b,c} wartości średnie w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$) – mean values in rows denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0,05$.

[Jungbunzlauer 2002, Singh i in. 2007]. Badania Ziarno i innych [2009] wykazały, że mieszanka cytrynianu wapnia z wodorooasparaginianem magnezu i białkami serwatkowymi nadawała maślanie korzystniejsze cechy sensoryczne niż mieszanka cytrynianu wapnia, glukonianu magnezu i białek serwatkowych. Przyniesione badania wskazują, że ze względu na kształtowanie cech sensorycznych produktów tylko niektóre związki wapnia i magnezu można zastosować do fortyfikacji przetworów mlecznych.

WNIOSKI

1. Dodatek magnezu w dawkach 30 mg i 50 mg Mg·100 g⁻¹ korzystnie wpłynął na liczbę komórek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 i ograniczył synerżę napojów.
2. Wzbogacanie mleka wapniem w ilości 80 mg Ca·100 g⁻¹ oraz 100 mg Ca·100 g⁻¹ nie wpłynęło na rozwój komórek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 i skutkowało otrzymaniem napoju o liczbie komórek bakterii zbliżonej do napoju kontrolnego.
3. Napoje wzbogacane mleczanami magnezu (30 mg i 50 mg Mg·100 g⁻¹) i wapnia (80 mg i 100 mg Ca·100 g⁻¹) cechowały się mniejszą twardością i sprężystością.
4. Najbardziej preferowanymi przez konsumentów były napoje wzbogacone magnezem w dawce 30 mg Mg·100 g⁻¹.

LITERATURA

- Achanta K., Aryana K.J., Boeneke C.A., 2007. Fat-free plain set yogurts fortified with various minerals. *LWT – Food Sci. Technol.* 40, 424–429.
- Coudray C., Rambeau M., Feillet-Coudray C., Gueux E., Tressol J.C., Mazur A., Rayssiguier Y., 2005. Study of magnesium bioavailability from ten organic and inorganic Mg salts in Mg-depleted rats Using a stable isotope approach. *Magnes. Res.* 18, 215–23.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Heart Organization) 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario.
- Favier C.F., de Vos W.M., Akkermans A.D., 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* 9, 219–229.
- Gustaw W., 2011. Właściwości fizykochemiczne jogurtów otrzymanych z dodatkiem prebiotyków. *ZPPNR* 569, 113–120.
- Ilangovan U., Ton-That H., Iwahara J., Schneewind O., Clubb R.T., 2001. Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *PNAS* 98(11), 6056–6061.
- Jędrzejczak-Krzepkowska M., Bielecki S., 2011. Bifidobakterie i stymulujące ich wzrost fruktany typu inuliny. *Post. Bioch.* 57(4), 392–399.
- Jungbunzlauer S., 2002. The challenges of calcium fortification in beverages. *Int. Food Ingrid.* 3, 45–48.
- Koutina G., Christensen M., Bakman M., Andersen U., Skibsted L.H., 2016. Calcium induced skim-milk gelation during heating as affected by pH. *Dairy Sci. Technol.* 96(1), 79–93.
- Lay C., Rigottier-Gois L., Holmstrom K., Rajilic M., Vaughan E.E., de Vos W.M., Collins M.D., Thiel R., Namsolleck P., Blaut M., Dore J., 2005. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl. Environ. Microbiol* 71, 4153–4155.
- Lima K.G., Kruger M.F., Behrens J., Destro M.T., Landgraf M., Franco B.D., 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 Sci. Technol.* 42, 491–495.
- Miernik M., 2016. Magnez, wapń, żelazo – jak mądrze je suplementować. *Świat Przemysłu Farmaceutycznego* 2, 94–98.
- Naik M.T., Suree N., Ilangovan U., Liew C.K., Thieu W., Campbell D.O., Clemens J.J., Jung M.E., Clubb R.T., 2006. *Staphylococcus aureus* Sortase A transpeptidase. Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop. *J. Biol. Chem.* 281(3), 1817–1826.
- PN-ISO 4121:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Ocena produktów żywnościowych przy użyciu metod skalowania.
- PN-ISO 11035:1999. Identyfikacja i wybór deskryptorów do ustalania profilu sensorycznego z użyciem metod wielowymiarowych.
- Singh G., Arora S., Sharma G.S., Sindhu J.S., Kansal V.K., Sangwan R.B., 2007. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT – Food Sci. Technol.* 40(4), 625–631.
- Szajnar K., Znamirowska A., Kalicka D., Kuźniar P., 2017. Fortification of yoghurts with various magnesium compounds. *J. Elem.* 22(2), 559–568.
- Szajnar K., Znamirowska A., Pawlos M., Kalicka D., 2014. Właściwości fizykochemiczne i profil teksturometryczny jogurtów wzbogaconych cytrynianem wapnia. *Bromat. Chem. Toksykol.* 4, 946–952.

- Thomas K.J., Rice C.V., 2014. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall. *BioMetals* 27(6), 1361–1370.
- Vyas H.K., Tong P.S., 2004. Impact of source and level of calcium fortification on the heat stability of reconstituted skim milk powder. *J. Dairy Sci.* 87, 1177–1180.
- Ziarno M., 2008. Wzbogacanie mleka spożywczego solami wapnia i magnezu. *Przeegl. Mlecz.* 2, 4–10.
- Ziarno M., Nowak A., Pluta A., 2004. Możliwości zastosowania soli wapniowych do wzbogacania cottage cheese w wapń. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 3(1), 103–112.
- Ziarno M., Więclawski S., 2006. Wpływ dodatku mleczanu wapnia na rozwój bakterii fermentacji mlekowej w bulionie MRS i w mleku. *ŻNTJ* 4(49), 110–119.
- Ziarno M., Zaręba D., Piskorz J., 2009. Wzbogacanie maślanki w wapń, magnez oraz białka serwatkowe. *ŻNTJ* 2(63), 14–27.
- Ziarno M., Zaręba D., Ścibisz I., 2011. Przeżywalność probiotycznych fermentacji mlekowej w modelowych jogurtach owocowych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 3, 645–649.
- Znamirowska A., Kalicka D., Szajnar K., Pawlos M., Rożek P., 2015. Wpływ rodzaju kultur starterych i fortyfikacji magnezem na jakość jogurtów typu greckiego. W: *Technologiczne kształtowanie jakości żywności*. K. Wójciak, Z. Dolatowski (red.). Wyd. Nauk. PTTŻ, Kraków, 365–378.
- Znamirowska A., Szajnar K., Pawlos M., Kalicka D., 2016. Ocena możliwości zastosowania chelatu aminokwasowego magnezu do wzbogacenia jogurtu. *Żywn. Nauka. Technol. Jakość*, 4(107), 80–91.
- Zhao L.L., Wang X.L., Liu Z.P., Sun W.H., Dai Z.Y., Ren F.Z., Mao X.Y., 2018. Effect of α -lactalbumin hydrolysate-calcium complexes on the fermentation process and storage properties of yogurt. *LWT – Food Sci. Technol.* 88, 35–42.

FORTIFICATION OF FERMENTED MILK BEVERAGES BY *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SSP. *LACTIS* Bb-12 WITH MAGNESIUM AND CALCIUM LACTATE

Summary. The aim of this study was to determine the possibility of calcium and magnesium lactate enrichment of fermented milk beverages and to evaluate the effect of macroelements on the physicochemical, sensory and texture properties as well as the number of bacteria.

The milk was fortified with magnesium in the amount of 30 and 50 mg Mg·100 g⁻¹ and with calcium lactate in an amount of 80 and 100 mg Mg·100 g⁻¹, respectively. The milk was homogenized, the pH was determined and the 0.02% of DVS probiotic cultures of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 were added. Incubation of milk was carried out at 37°C. Samples were analyzed at day 7 of storage. The pH, total acidity, syneresis, color parameters (L*, a*, b*), TPA texture and sensory characteristics were evaluated. To evaluate consumer acceptance and sensory profile of the samples, 20 panelists investigated randomly coded beverages samples. Viable counts of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 were determined on the MRS agar (Biocorp, Poland) at 37°C for 72 h.

Fortification of fermented beverages with magnesium and calcium lactate decreased pH of milk before fermentation. The addition of magnesium at doses of 30 and 50 mg Mg·100 g⁻¹ beneficially influenced the number of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and reduced the syneresis effect.

Moreover, the use of calcium lactate for fortification resulted in acid gels form with a high level of syneresis effect. The addition of calcium in the amount of 80 mg increased syneresis about 5.29%, and in the amount, 100 mg up to 7.70% respectively, compared to the amount of expelling liquid in the control sample.

Milk fortification with calcium in the amount of 80 and 100 mg Ca·100 g⁻¹ did not affect the number of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and resulted in similar bacteria number in control sample. Addition of magnesium and calcium lactates caused that after incubation time the pH value of enriched beverages was higher than unfortified beverages, which directly influenced the ability to form a curd and its compactness. The milk beverages fortified with magnesium (30 and 50 mg Mg·100 g⁻¹) and calcium (80 and 100 mg Ca·100 g⁻¹) were characterized by lower hardness and springiness. Beverages fortified with magnesium and calcium lactate gave significantly darker color than control ones. With the increase of the dose of these micronutrients, the darkening color of beverages fermented by *Bifidobacterium* Bb-12 was detected.

Regarding sensory analysis, the notes granted by panelists for the color of beverages fortified with calcium and magnesium were lower than the controls, however, these differences were not significant. In this case, the instrumentally indicated changes in color parameters were not so large as to be perceived by consumers. The color values a* and b* marked for fortified beverages with magnesium and calcium lactates testify to the displacement of the color scale in space towards the green and yellow color, compared to the control ones. The results of the preference test showed that the most panelists selected beverage with magnesium addition, especially in amount 30 mg, taking into account the intense milky-cream flavor, moderately sour and undetectable foreign taste. Calcium-fortified beverages characterized by less consistency and a more intense off-flavors. These two quality factors contributed to the less acceptance of calcium-enriched beverages.

Key words: *Bifidobacterium*, lactate, calcium, magnesium, fermented milk

