

# Trvanlivost nízkokalorických nápojů ve vztahu k využívání umělých sladidel kvasinkami

663.8 547.58:582.282.232

RNDr. LIBUŠE ŠVORCOVÁ, CSc., Výzkumný ústav balneologický v Mariánských Lázních

V nedávné době byly zavedeny do obchodu nízkokalorické nápoje DIA citron a DIA oranž, vyráběné v so-dovkárnách po celé ČSR. Tyto nápoje obsahují 20 g/l sorbitu, 20 g/l fruktózy a 100 mg/l sacharinu. Jejich sta-bilita je zajišťována sorbanem draselným.

Ke zjištění konzervační účinnosti sorbanů, vlivu ky-seliny askorbové a kyseliny citrónové připravili jsme s uvedenými sirupy nápoje s minerální vodou a různým obsahem sacharinu, kyseliny citrónové s kyselinou as-korbovou i bez ní.

Trvanlivost se ověřovala skladovacími pokusy takto připravených nápojů, plněných na provozních linkách a skladovaných za teploty  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  po dobu 66 dní.

Účelem práce bylo rovněž sledovat schopnost někte-rých mikroorganismů, v tomto případě kvasinek, využí-vat sladidla sorbit, fruktózu a sacharin, neboť se před-pokládalo, že by mohl sacharin působit inhibičně.

## Použitá metodika

Sledoval se celkový počet psychrofilů, mezofilů koli-formních a slizotvorných mikrobů, kvasinek a plísni. Kvasinky byly pěstovány na sladidlovém agaru při teplotě  $25^\circ\text{C}$  po dobu 4 až 5 dní. Vzorky se očkovoaly v růz-ných časových intervalech, z každé láhve na dvě plotny po dobu 60 dní. V tabulkách je uveden průměr ze šesti stanovení.

Z nápojů plněných v plněnách byly izolovány některé kmeny kvasinek, byly biochemicky určeny a jejich růst byl sledován ve zvláštním laboratorním pokusu mikro-skopicky a kultivačně. K pokusu byly použity kmeny: *Saccharomyces heterogenicus*, *S. fragilis*, *Saccharomy-codes*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis pinus* i směsná kultura těchto kvasinek. Kultura těchto druhů 72 h stará byla naočkována do živného roztoku s 20, 40 a 60 g/l fruktózy a sorbitu a do roztoku se 40, 100 a 140 mg/l sacharinu. Zmnožování kvasinek bylo rovněž sledováno v prostém živném roztoku. Buňky byly počítány přímo po centrifugaci v Cyrusově komůrce II. po 1, 3, 6, 24, 72 a 96 hodinách. Současně se očkova-l 1 ml vzorku na sladidlový agar. Naočkované plotny se inkubovaly 4 až 5 dní při teplotě  $25^\circ\text{C}$ .

## Diskuse

Výsledky skladovacího pokusu nízkokalorických ná-pojů jsou uvedeny v tab. 1 a 2. V uvedených výsledcích je patrný výrazný rozdíl mezi vzorky plněnými do ste-tilních lahví a vzorky plněnými v plněnách. V lahvích mytých v myčce pravděpodobně zůstávají zbytky orga-nických látek, netěsnými uzávěry zřejmě proniká do-vnitř kyslík a tak vzniká v těchto lahvích vhodnější prostředí pro rozmnožování kvasinek než v lahvích ste-tilních, vzduchotěsně uzavřených. Ve sterilních lahvích zůstával počet zárodků po dobu skladování nízký, mírné zmnožení se projevilo pouze v nápoji DIA LIMO. V nápojích bez konzervačního prostředku i bez kyseliny askorbové se kvasinky rozmnožovaly i ve sterilních lahvích.

Ze vzorků plněných v provozu (tab. 1) měly větší trvanlivost nápoje s nízkým pH 2,9, tj. s dávkou 4 g/l kyseliny citrónové (DIA-CITRON), než nápoje s vyšším pH 3,7, tj. s 1 g/l kyseliny citrónové (DIA-ORANŽ). Při tomto pH se kvasinky mírně množily, i když nápoj obsahoval konzervační prostředek — sorban draselný

Tabulka 1. Výskyt kvasinek v nízkokalorických nápo-jích, plněných do nesterilních lahví

Den skladování	DIA — ORANŽ 1g/l kys. citrónové	DIA — ORANŽ 4g/l kys. citrónové	DIA — CITRON 4g/l kys. citrónové	Kyselina askorbová 100 mg/l				Bez kys. askorb. DIA LIM 2 g/l kys. citrónové
				DIA POMO 60mg/l sacharinu	DIA POMO 100 mg/l sacharinu	DIA LIMO 2g/l kys. citrónové	DIA LIM 2 g/l kys. citrónové	
1	7	10	5	2	2	6	1 400	
6	1 400	0	0	3	3	51	60 000	
9	1 700	0	0	56	110	900	40 000	
13	0	11	2	0	90	1 600	15 000	
16	400	280	1	660	900	4 000		
23	27	70	0	110	43	230		
34	300	22	150	260	110	1 700		
51	110	10	0	1 600	600	9 000	5 600	
66	270	1	2	1 000	1 200	3 800	1 500	
pH	3,7	2,9	2,9	2,9	3,0	3,4	3,4	
rf	6,0	6,0	5,4	6,0	6,0	6,5	5,0	

Tabulka 2. Výskyt kvasinek v nízkokalorických nápo-jích — plněno do sterilních lahví

Den skladová-ní	DIA — ORANŽ 1g/l kys. citrónové	DIA — ORANŽ 4g/l kys. citrónové	DIA — CITRON 4g/l kys. citr.	Kyselina askorbová 100 mg/l				Bez kys. askorb. DIA LIM 4 g/l kys. citrónové
				DIA POMO 60 mg/l sacharinu	DIA POMO 100 mg/l sacharinu	DIA LIMO 4 g/l kys. citrónové	DIA LIM 4 g/l kys. citrónové	
1	6	2	1	5	1	0	10 000	
6	0	1	1	2	0	2	14 000	
9	150	1	23	5	2	1 000	3 800	
13	21	0	0	1	270	1 700	1 600	
16	37	3	7	7	1	278		
23	0	0	0	0	1	700		
34	8	2	1	1	4	360		
51	1	2	1	2	190	300	2 400	
66	3	1	1	0	1	220	1 500	
pH	3,7	2,9	2,9	3,1	3,2	3,8	3,7	
rf	6,8	6,4	5,5	5,0	5,0	5,0	5,0	

(20 mg/l). V nápojích s kyselinou askorbovou — DIA-POMO a DIA LIMO se kvasinky mírně množily ke konci skladování při pH pod 3, při pH 3,4 [2 g/l kys. citrónové] se silněji množily již 13. den.

V nápoji DIA LIMO (tab. 1) s pH 3,4 vytvořily kva-sinky výskytovou křivku s dvěma maximy, a to počtem 4000 16. den inkubace a počtem 9000 v ml 51. den inkubace. Šlo zřejmě o rozdílné druhy kvasinek. Jejich určení nebylo provedeno. Ve stejně připraveném nápoji rovněž s obsahem kyseliny askorbové, avšak uchovaném ve sterilních lahvích, byl zjištěn maximální počet kvasinek 1000 v ml 9. den inkubace.

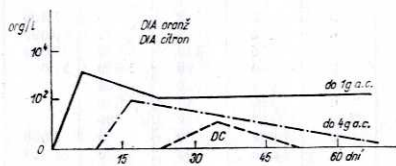
Ve vzorcích stejně připravených, se stejným obsahem kyseliny citrónové, avšak bez kyseliny askorbové, se množily kvasinky již od prvního dne a dosáhly ma-xima ve sterilních lahvích (tab. 2) již 6. den inkubace množstvím 14 000 buněk v 1 ml, tj. o řád více než za přítomnosti kyseliny askorbové. Ve vzorcích plněných

v plněné byl zjištěn ve stejném nápoji maximální počet buněk 60 000 v 1 ml rovněž 6. den inkubace (tab. 1). Ve stejném vzorku s kyselinou askorbovou bylo též den zjištěno 51 buněk, tj. o 3 řády méně.

Výskyt kvasinek v nápojích DIA ORANŽ s 1 g/l kyseliny citrónové (DO 1 g a. c.), 4 g/l kyseliny citrónové (DO 4 g a. c.) i nápoje DIA CITRON (DC) je patrný z obr. 1, výskyt kvasinek v nápojích DIA POMO z obr. 2, a to DIA LIMO s 2 g/l kyseliny citrónové (DVL s a. s.) a DIA POMO (DVP a. c.) s 100 mg/l kyseliny askorbové. DVL je křivka nápoje DIA ORANŽ s 1 g kyseliny citrónové v litru.

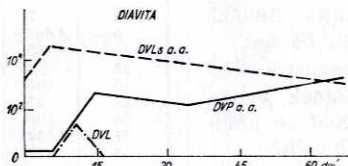
K ověření, do jaké míry ovlivňují různé druhy kvasinek kažení nápojů, i k ověření, zda tyto kmeny využívají umělá sladidla, kultivovali jsme kmeny izolované z prostředí plnění i slazených minerálních vod v živném roztoku prostém i obohaceném různými dávkami cukru, sorbitu, fruktózy i sacharinu.

Počet buněk v prostém živném roztoku anorganických solí zůstal po dobu 24 h (obr. 3—6) téměř stejný. V roztocích fruktózy a sorbitu se již v této době rozmnožovaly kvasinky rodů *Saccharomyces* a *Saccharomycodes* (obr. 3). Jejich výskytové křivky dosáhly maxima již 2. — 4. den inkubace při 25 °C počtem 2 až  $3 \cdot 10^6$  buněk v 1 ml. Kvasinky rodu *Saccharomyces* počaly tvořit již 4. den mikrokolonie, obsahující větší počet buněk, než nebylo možno spočítat. Kvasinky dobře fermentující cukry se množily v roztocích sorbitu a fruktózy po krátké lag-fázi, kvasinky špatně fermentující cukry měly ve všech roztocích poměrně dlouhou lag-fázi, křivka logaritmické fáze byla pozvolnější, maximálně dosažené množství buněk bylo však u všech dávek cukrů i všech kmenů téměř stejné, tj.  $1,5 - 3 \cdot 10^6$  buněk v 1 ml (obr. 4—6). Podobný průběh měly i výskytové křivky kvasinek v roztocích sacharinu (obr. 11 a 12), měly však delší lag-fázi, pozvolnější fázi logaritmickou, maximální počet buněk byl asi o půl řádu



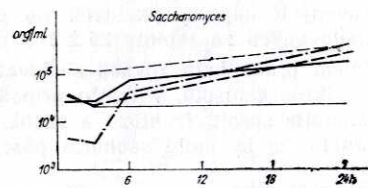
Obr. 1. Zmnožování kvasinek v nápojích DIA-CITRON a DIA-ORANŽ s minerální vodou a sorbanem draselným. Láhve byly plněny v provozu

— DIA-ORANŽ s 1 g/l kyseliny citrónové, pH 3,7 (DO 1 g a. c.)  
- - - DIA-ORANŽ se 4 g/l kyseliny citrónové, pH 2,9 (DO 4 g a. c.)  
- - - DIA-CITRON se 4 g/l kyseliny citrónové, pH 2,9 (DC)

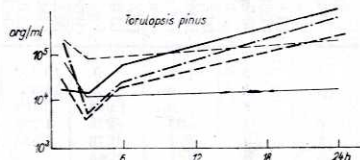


Obr. 2. Zmnožování kvasinek v nápojích DIA a DIA-ORANŽ s minerální vodou. Nápoje DIA obohacené kyselinou askorbovou, DIA-ORANŽ se sorbanem draselným

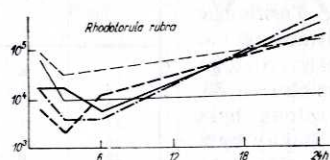
— DIA LIMO se 2 g/l kyseliny citrónové, pH 3,4 (DVL a. a.), provozní plnění,  
— DIA POMO se 4 g/l kyseliny citrónové, pH 2,9—3,0 (DVP a. a.) plněno v provozu.  
— DIA-ORANŽ s 1 g/l kyseliny citrónové pH 3,7 (DVL) ve sterilních láhvích.



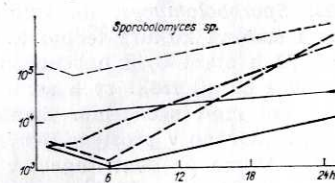
Obr. 3. Zmnožování kvasinek rodu *Saccharomyces* v živném roztoku prostém i s různými dávkami sorbitu, fruktózy a sacharinu



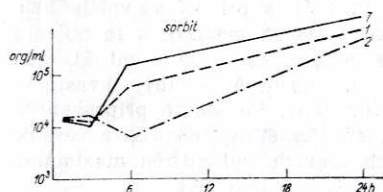
Obr. 4. Zmnožování kvasinek *Torulopsis pinus* v prostém živném roztoku (slabá čára) a v roztocích s dávkami 20, 40 a 60 g/l sorbitu, fruktózy a 40, 100 a 140 mg/l sacharinu (průměrný počet buněk ze všech provedených pokusů)



Obr. 5. Zmnožování kvasinek *Rhodotorula rubra* v prostém živném roztoku (slabá čára) a v roztocích s dávkami 20, 40, 60 g/l sorbitu, fruktózy a 40, 100 a 140 mg/l sacharinu (průměrný počet buněk ze všech provedených pokusů)

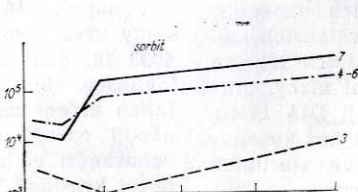


Obr. 6. Zmnožování kvasinek rodu *Sporobolomyces* sp. v prostém živném roztoku (slabá čára) a v roztocích s dávkami 20, 40, 60 g/l sorbitu, fruktózy a 40, 100 a 140 mg/l sacharinu (průměrný počet buněk ze všech provedených pokusů)



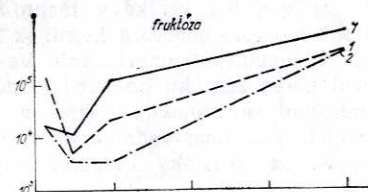
Obr. 7. Zmnožování kvasinek v roztocích různých sladidel: průměrný počet kvasinek v 1 ml v různých roztocích sorbitu:

— směsná kultura, — — — *Torulopsis pinus*, - - - *Rhodotorula rubra*.



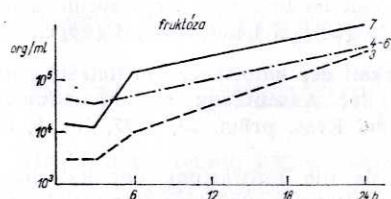
Obr. 8. Zmnožování kvasinek v různých roztocích sorbitu (průměrný počet v 1 ml):

— směsná kultura, r. *Sporobolomyces* — — — r. *Saccharomyces* - - -



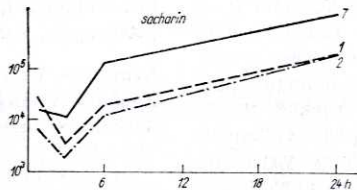
Obr. 9. Zmnožování kvasinek v různých roztocích fruktózy (průměrný počet v 1 ml):

— směsná kultura, — — — *Torulopsis pinus*, - - - *Rhodotorula rubra*.



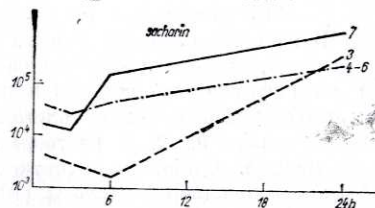
Obr. 10. Zmnožování kvasinek v různých roztocích fruktózy (průměrný počet v 1 ml):

— smíšená kultura, — — — r. Sporobolomyces, — · — · — r. Saccharomyces.



Obr. 11. Zmnožování kvasinek v různých roztocích sacharinu (průměrný počet v 1 ml):

— smíšená kultura, — — — Torulopsis, — · — · — Rhodotorula rubra.



Obr. 12. Zmnožování kvasinek v různých roztocích sacharinu (průměrný počet v 1 ml):

— smíšená kultura, — — — r. Sporobolomyces, — · — · — r. Saccharomyces.

nižší. Přesto však k růstu docházelo. V obr. 7 a 8 je uveden růst různých kmenů kvasinek v sorbitu, v obr. 9 a 10 ve fruktóze. Pro porovnání je v každém grafu uvedena křivka smíšené kultury kvasinek [7] zaočkovaná do roztoku obsahujícího 20 g/l sorbitu, 20 g/l fruktózy a 100 mg/l sacharinu.

Hodnoty uvedené v tabulkách a grafech jsou výsledky mikroskopického sledování. Výsledky kultivačních zkoušek jsou obdobné, celkový počet buněk je asi o jeden řád nižší, což je způsobeno tím, že obvykle nevyrůstá jedna kolonie z jedné buňky, nýbrž z mikrokolonie.

#### Závěr

Uvedenými pokusy bylo prokázáno, že kažení nízkokalorických nápojů způsobuje rozmnožování mikroorganismů, mezi jinými i kvasinek. Kvasinky obvykle způsobují kyselý pach a zkvašenou příchut nápoje. Při skladování nápojů slazených sorbitem, fruktózou a sacharinem bylo zjištěno, že ve sterilních a vzduchotěsně uzavřených lahvích se kvasinky nerozmnožovaly za přítomnosti kyseliny askorbové nebo při konzervaci sorbanem draselným (20 mg/l). Jestliže toto konzervans nebylo přítomno, rozmnožovaly se kvasinky již v prvních dnech skladování. Podstatně větší rozmnožování (maximální počty buněk až o 3 řády vyšší) nastávalo u nápojů plněných v provozu, a to i v lahvích, které obsahovaly sorban draselný nebo kyselinu askorbovou. Množení kvasinek částečně inhibovalo nízké pH, dosažené vyšší dávkou kyseliny citrónové.

Laboratorní experiment kultivace různých kmenů kvasinek prokázal rozmnožování v roztocích s různým množstvím sorbitu, fruktózy i sacharinu. Výskytové křivky v roztocích sacharinu měly delší lag-fázi, pozvolnější logaritmickou fázi a maximální počty buněk byl o půl řádu nižší. Zásadní rozdíl v maximálním počtu buněk nebyl pozorován při inkubaci různých kmenů ani různých dávek sladidel. Růstové křivky jednotlivých kmenů se lišily délkou lag-fáze a průběhem fáze logaritmické. Křivky dosahovaly maxima 1 — 3 · 10<sup>6</sup> buněk v 1 ml 3. až 5. dne inkubace. Kvasinky zkvašující dobře cukry se rychle množily i v roztocích sorbitu a fruktózy. Během šesti dnů pokleslo pH v roztocích až o 2, v roztoku sacharinu byl pokles pH menší.

Pro zachování dobré kvality nízkokalorických nápojů je nutné, aby byly plněny do lahví dobře umytých, vzduchotěsně uzavíraných za dodržování všech pravidel hygienické péče v závodech. Jejich trvanlivost pak prodlužuje kyselina askorbová, sorban draselný a nízké pH.

#### Literatura

- [1] ŠVORCOVÁ a kol.: Nízkokalorické nápoje, Záv. zpráva VÚB, 1974.
- [2] MARKVART, J.: Nízkokalorické a diabetické nápoje. Kvas. prům. 18, 1972, č. 12, s. 280—83.
- [3] ŠVORCOVÁ, L.: Změny kvality minerálních vod během skladování. Záv. zpráva VÚB 1970.

- [4] ŠVORCOVÁ, L.: Kontaminace slazených minerálních vod kvasinkami. Kvas. prům. 20, 1974, č. 10, s. 228—29.
- [5] ŠVORCOVÁ, L.: Ursachen der Vermehrung von Hefen in alkoholfreien Getränken. Die Lebensmittelind. 2, 1972, s. 101—3.

Švorcová, L.: Trvanlivost nízkokalorických nápojů ve vztahu k využívání umělých sladidel kvasinkami. Kvas. prům. 23, 1977, č. 8, s. 183—186.

V práci se zkoumalo znehodnocování nízkokalorických nápojů vlivem množování kvasinek. Tyto nápoje byly ochucovány fruktózou, sorbitem a sacharinem. Ve sterilních a vzduchotěsně uzavřených lahvích se za přítomnosti kyseliny askorbové nebo při konzervaci kyselinou sorbovou kvasinky nerozmnožovaly. Jestliže tato konzervace nebyla přítomna, docházelo k rozmnožování kvasinek již v prvních dnech skladování. Větší rozmnožování nastalo v nápojích plněných na provozní lince. Množení kvasinek částečně inhibovalo nízké pH, dosažené zvýšenou dávkou kyseliny citrónové.

Laboratorními experimenty bylo prokázáno množování kvasinek v roztocích s různým obsahem sorbitu, sacharinu a fruktózy i ve směsi všech sladidel. Zásadní rozdíl v maximálním počtu buněk nebyl pozorován. Křivky dosahovaly maxima 1 až 3 · 10<sup>6</sup> buněk v 1 ml třetího až pátého dne kultivace. V roztoku sacharinu měly křivky delší lag-fázi, pozvolnější fázi logaritmickou, maximální počty buněk byly o půl řádu nižší. Za šest dnů pokleslo pH až o 2, v roztoku sacharinu byl pokles pH menší. Trvanlivost nízkokalorických nápojů prodlužuje kyselina askorbová v množství 100 mg/l, kyselina sorbová v množství 30 mg/l a nízké pH — kolem 3.

Шворцова, Л.: Влияние потребления дрожжами синтетических сладких веществ на стойкость низкокалорийных напитков. Квас. прум. 23, 1977, № 8, стр. 183—186.

В статье приведены результаты изучения влияния потребления синтетических сладких веществ дрожжами на снижение качества низкокалорийных напитков, подслащенных такими веществами. Сравнивались напитки содержащие фруктозу, сорбит и сахарин. В стерилизованных герметически закупоренных банках с напитками, содержащими сорбиновую или аскорбиновую кислоту размножение дрожжей не имело места. Без приведенных кислот размножение начиналось практически с первых дней складирования готовых напитков. В бутылках наполненных в заводских цехах на разливочно-закупорочных линиях дрожжи размножаются более интенсивно чем при лабораторных экспериментах. Размножение до известной степени ингибируется низким значением pH, которое можно обеспечить повышенным содержанием лимонной кислоты.

Лабораторные испытания подтвердили размножение дрожжей в растворах с разным содержанием сорбита, сахараина и фруктозы, а также смеси этих веществ. Заметных различий в численности клеток между растворами, подслащенными разными веществами, не было.

Кривая размножения достигала своего максимума, т. е.  $1-3 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл раствора в течении 3—5 дней. В растворе сахарина кривые были характеризованы более продолжительной стадией покоя, более медленной логарифмической стадией и на пол порядка меньшим максимальным числом клеток. В течении шести дней pH упало на 2. В растворе сахарина снижение было меньше. Стойкость напитков можно улучшить добавкой аскорбиновой кислоты (100 мг/л), сорбиновой кислоты (30 мг/л) и низким значением pH, т. е. примерно 3.

**Švorcová, L.: Keeping Quality of Low-caloric Beverages and its Relation to the Consumption of Synthetic Sweeteners by Yeast.** Kvas. prům. 23, 1977, No. 8, pp. 183—186.

The article deals with the deterioration of the quality of low-caloric beverages caused by the propagation of yeast. A number of experiments have been carried out with beverages sweetened with fructose, sorbitol and saccharin. In sterile, air-tight, sealed flasks no propagation of yeast was observed in beverages containing ascorbic or sorbic acid. Without the mentioned preserving substances propagation started in a few days after bottling. In bottles filled on bottling lines propagation is more intensive. Propagation can be inhibited to a certain degree by low pH resulting from higher contents of citric acid.

In laboratory experiments yeast was detected in liquids with different amounts of sorbitol, saccharin or fructose, as well as with their mixture. No significant difference could be observed in the maximum numbers of cells present in beverages containing various sweeteners. Maximum, i. e. from 1 to  $3 \cdot 10^6$  of cells per 1 ml was attained in 3 — 5 days of cultivation. In saccharin solution the lag-phase of the propagation curve was longer, the logarithmic phase was slower and maximum amount of cells by half an order lower than in liquids sweetened with sorbitol or fructose. In 6 days pH drop-

ped by 2. In saccharin solution the decrease was smaller. Keeping quality can be improved by ascorbic acid (100 mg/l), sorbic acid (30 mg/l) and low pH (appr. 3).

**Švorcová, L.: Haltbarkeit der kalorienarmen Getränke in Zusammenhang mit der Ausnützung der künstlichen Süßstoffe durch Hefen.** Kvas. prům. 23, 1977, No. 8, S. 183—186.

In der Arbeit wurde die Entwertung der kalorienarmen Getränke durch Hefenvermehrung studiert. Diese Getränke wurden unter Fruktose-, Sorbit- und Saccharosezugabe hergestellt. In sterilen und luftdicht geschlossenen Flaschen wurde bei Anwesenheit der Ascorbinsäure oder bei der Konservierung mittels Sorbinsäure keine Hefevermehrung festgestellt. In Proben, die die erwähnte Konservierungsmittel nicht enthielten, vermehrten sich die Hefen bereits während der ersten Tage der Lagerung. Intensivere Vermehrung wurde in den auf der Betriebslinie abgefüllten Getränken festgestellt. Die Vermehrung der Hefen wurde teilweise auch durch ein niedriges pH gehemmt, das durch erhöhte Zitronensäuredosierung erzielt wurde.

Durch Laborversuche wurde die Vermehrung der Hefen in Lösungen mit verschiedenem Gehalt des Sorbits, des Saccharins und der Fruktose sowie auch in dem Gemisch aller Süßmittel bewiesen. In der maximalen Zahl der Zellen wurden keine grundsätzlichen Unterschiede beobachtet. Die Kurven erreichten das Maximum 1 bis  $3 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml den dritten bis fünften Tag der Kultivation. In der Saccharinlösung zeigten die Kurven eine längere Lag-Phase und eine längere logarithmische Phase; die Zahlen der Zellen waren um eine halbe Zahlenordnung niedriger. Binnen 6 Tagen sank das pH bis um 2, in der Saccharinlösung war das Absinken des pH weniger intensiv. Die Haltbarkeit der kalorienarmen Getränke wird verlängert durch: Ascorbinsäure in der Menge von 100 mg/l, Sorbinsäure in der Menge von 30 mg/l und niedriges pH — ungefähr 3.