



412017S-2021



安琪酵母（睢县）有限公司企业标准

Q/YB 2019S-2021

---

# 啤酒高活性干酵母

2021-08-27 发布

2021-08-27 实施

---

安琪酵母（睢县）有限公司 发布

## 前 言

本标准中附录A、附录B、附录C、附录D为规范性附录。

本标准由安琪酵母（睢县）有限公司提出。

本标准主要起草单位：安琪酵母（睢县）有限公司。

本标准主要起草人：李志军、刘代武、刘广新、高祥、司明星。

H N  
Q B

# 啤酒高活性干酵母

## 1 范围

本标准规定了啤酒高活性干酵母的分类、术语和定义、要求、检验方法、检验规则等。

本标准适用于以甘蔗糖蜜或食用玉米淀粉为原料，添加加工助剂（硫酸铵、氨水、磷酸二氢铵、啤酒花浸膏），经通风发酵培养酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、葡萄汁酵母（*S.uvarum*）、贝酵母（*S.bayanus*）可食用菌种，经脱水、添加山梨醇酐单硬脂酸酯(司盘 60)食品添加剂，干燥、包装制得的啤酒高活性干酵母。本产品适用于以麦芽和谷物为原料进行啤酒发酵。

根据酵母菌株的不同特性分为分散型啤酒酵母和絮凝型啤酒酵母。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 2.1 分散型啤酒酵母

啤酒酵母活菌体在一定量的温水充分溶解后，在显微镜下观察，酵母活菌体以单细胞的状态存在于悬浮液中的一类啤酒酵母。

### 2.2 絮凝型啤酒酵母

啤酒酵母活菌体在一定量的温水充分溶解后，在显微镜下观察，部分酵母活菌体以细胞团的状态存在于悬浮液中的一类啤酒酵母。

## 3 要求

### 3.1 原辅料要求

- 3.1.1 生产用水应符合 GB 5749 的规定。
- 3.1.2 甘蔗糖蜜应符合 QB/T 2684 的规定。
- 3.1.3 食用玉米淀粉应符合 GB/T 8885 和 GB 31637 的规定。
- 3.1.4 硫酸铵应符合 GB 29206 的规定。
- 3.1.5 氨水应符合 GB 29201 的规定。
- 3.1.6 磷酸二氢铵应符合 GB 1886.330 的规定。
- 3.1.7 啤酒花浸膏应符合 GB/T 20369 的规定。
- 3.1.8 山梨醇酐单硬脂酸酯（司盘 60）应符合 GB 13481 的规定。

### 3.2 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

| 项目 | 要 求               | 检验方法                                         |
|----|-------------------|----------------------------------------------|
| 性状 | 颗粒状               | 取适量样品，在自然光下用肉眼观察性状、色泽、杂质，闻其气味，然后以温开水漱口，品其滋味。 |
| 色泽 | 淡黄色至黄棕色           |                                              |
| 气味 | 具有酵母的特有气味，无腐败，无异嗅 |                                              |

|    |            |  |
|----|------------|--|
| 滋味 | 本产品特殊的滋味   |  |
| 杂质 | 无正常视力可见外来物 |  |

### 3.3 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

| 项    目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 指    标 |     | 检验方法 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 分散性    | 絮凝性 |      |
| 鉴别试验                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 符合     |     | 附录A  |
| 水分，% <span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                </span> |        |     |      |

### 3.4 微生物限量

微生物限量应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

| 项 目                    | 采样方案 <sup>a</sup> 及限量 |   |      |      | 检验方法            |
|------------------------|-----------------------|---|------|------|-----------------|
|                        | n                     | c | m    | M    |                 |
| 菌落总数，CFU/g             | 6                     | 0 | 5000 | 5000 | 附录D             |
| 野生酵母，CFU/g             | 6                     | 0 | 1000 | 1000 | 附录C             |
| 大肠菌群，MPN/g             | 6                     | 0 | 3    | 3    | GB 4789.3MPN计数法 |
| 沙门氏菌，/25g              | 不得检出                  |   |      |      | GB 4789.4       |
| 金黄色葡萄球菌，/25g           | 不得检出                  |   |      |      | GB 4789.10      |
| a 样品的采样及处理按GB 4789.1执行 |                       |   |      |      |                 |

### 3.5 净含量及允许短缺量

净含量及允许短缺量应符合JJF 1070的规定。

### 3.6 生产加工过程的卫生要求

应符合 GB 14881 的规定。

### 3.7 其它要求

食品添加剂的使用应符合 GB 2760 的规定；污染物限量应符合 GB 2762 的规定。

## 4 检验

出厂检验项目包括：感官要求、水分、酵母活细胞数、菌落总数、野生酵母、大肠菌群、净含量及允许短缺量。型式检验按国家相关规定执行。

## 附 录 A

## (规范性附录)

## 啤酒酵母类别鉴定方法

## A.1 原理

显微镜下观察一定浓度的水溶液,有的视野全部为单细胞,有的视野中含有细胞团。根据含有细胞团视野的数量,判定啤酒酵母类型。

## A.2 试剂和溶液

无菌生理盐水:称取氯化钠0.85g,加水溶解,并定容至100mL,在0.1mpa下灭菌20分钟。

## A.3 仪器和设备

- a) 显微镜 放大倍数 500 以上;
- b) 血球计数板 XB-K-25;
- c) 血球计数板专用盖玻片 20mm\*20mm;
- d) 试管 18mm\*200mm;
- e) 容量瓶 100mL;
- f) 分析天平 感量 0.01g;
- g) 恒温箱 控温精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

## A.4 操作步骤

## A.4.1 酵母活化

精确称取样品0.05g(精确至0.0002g)于100mL小烧杯中,用约50mL38–40℃生理盐水溶解,置于32℃恒温水浴中活化1h。摇匀,转入100mL容量瓶中,然后用32℃左右生理盐水冲洗小烧杯数次,直至洗净,并将洗液全部转入容量瓶中,定容至刻度。将活化液振荡均匀,备用。

## A.4.2 制片

将泡在75%酒精中的血球计数板取出,自然晾干或者微热烘干,用专用盖玻片盖好,然后用0.1mL刻度吸管吸取染色后溶液,在血球计数板和盖玻片结合处,从0刻度处往下放0.02mL染色后的菌液,让菌液自然渗透入计数室。菌液不得有气泡,静置1min后,用显微镜观察。

## A.4.3 观察

用10×接物镜和16×接目镜找出方格后,换用40×接物镜,调整微调至视野最清晰,观察视野内酵母细胞的分散、抱团情况。

## A.5 计算

连续随机观察若干( $\geq 10$ )个视野,视野中有抱团现象(无论多少)即记录为抱团视野,否则记录为分散视野。

$$X = \frac{M}{M + N} * 100\%$$

X——抱团视野的比值;

M——抱团视野的数量；

N——分散视野的数量；

当 $X \leq 20\%$ 时，判定该酵母为分散型啤酒酵母；当 $X > 20\%$ 时，判定该酵母为絮凝型啤酒酵母。

#### A.6 结果的允许差

取平行测定结果的算术平均值为测定结果，平行测定结果的最大差值不得超过其算术平均值的 5%。

H N

Q B

## 附 录 B

## (规范性附录)

## 酵母活细胞数的测定（平板计数法）

## B.1 适用范围

适用于啤酒活性干酵母酵母活细胞数的测定。

## B.2 试剂和溶液

a) 孟加拉红培养基(rose bengal chloramphenicol agar)

b) 0.85%生理盐水（或磷酸缓冲溶液）：按比例配制成 0.85%的生理盐水（或磷酸缓冲溶液），分装三角瓶（每三角瓶 100ml）和试管（每管 9ml）若干。121℃灭菌 20 分钟。

## B.3 仪器设备或装置

a) 90mm 平皿若干；

b) 1ml 刻度吸管若干；

c) 100ml 小烧杯；

d) 150ml 三角瓶；

e) 28℃±1℃培养箱

f) 拍击式均质器：MASTICATOR BASIC，每个均质袋最大容量：400ml（样本+稀释液），每个均质袋最小容量：80ml（样本+稀释液）。

## B.4 操作步骤

B.4.1 按需要将盛装生理盐水的三角瓶和试管在恒温培养箱（水浴锅）内升温到40℃备用。

B.4.2 用无菌滤纸精确称取样品1g（精确至0.01g），倒入均质袋中，加入100mL稀释液（磷酸盐缓冲液或生理盐水）。

B.4.3 用拍击式质器均质拍打90秒，该溶液稀释倍数为 $10^2$ 。

B.4.4 继续用稀释液稀释至稀释倍数到 $10^8$ ，用1ml无菌吸管吸取 $10^7$ 和 $10^8$ 稀释倍数稀释液，加到空白的培养皿中，倾倒孟加拉红培养基，轻轻摇动平皿，使样品液与培养基混匀。每个梯度做两个平行样。

B.4.5 将接种完毕的平皿放入到28℃±1℃培养箱中，培养5天后读数。

## B.5 计算

选取菌落生长清晰的平板（要求菌落生长不成片，能够计数）进行计数。通常选择菌落数在10~150之间的平皿进行计数，菌落计数和计算规则参考GB4789.2。

## B.6 报告

每克（毫升）样品所含酵母菌数以CFU/g(mL)表示。

## 附 录 C

## (规范性附录)

## 野生酵母的检测方法

## C.1 适用范围

适用于了酵母及酵母深加工产品中野生酵母的测定。

## C.2 培养基和试剂

## C.2.1 野生酵母培养基

C.2.1.1 成分与配比：葡萄糖：50.0g；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>：5.0g；KNO<sub>3</sub>：4.0g；肌醇：2.0mg

水合赖氨酸：4.0g；琼脂：28.0g；尼克酸：100ug；硫胺素：100ug；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O：1.0g；核黄素：100ug；吡哆醇（VB<sub>6</sub>）：100ug；泛酸：100ug；生物素：100ug。

注1：由于上述培养基中添加的维生素量太小，不好称量，可将维生素先配制成浓缩的溶液，具体方法是：称取肌醇 2.0g、尼克酸 100mg、硫胺素 100mg、核黄素 100mg、吡哆醇（VB<sub>6</sub>）100mg、泛酸 100mg、生物素 100mg，全部溶解后，定容稀释至 1 升。

注2：上述维生素中，硫胺素、核黄素难溶于水，可将其称好后加入少量水，然后滴加 1~2 滴无水乙醇，搅拌溶解。仍不溶解时，可以将其放在 80℃水浴锅中边加热边搅动，直至溶解。将其它维生素称好后，用少量水全部溶解，和硫胺素、核黄素溶液混合，定容至 1L，即为浓缩的维生素溶液。

注3：在配制野生酵母培养基时，每升培养基中加上述浓缩的维生素溶液 1ml 即可，不再另外单独称取各种维生素。浓缩的维生素溶液在 4℃冰箱中冷藏保存。

C.2.1.2 制法：将上述药品溶解于大约800mL的蒸馏水中，在pH下调节PH=5.7，加水至1升，灭菌。

## C.2.2 0.85%灭菌生理盐水

## C.3 仪器设备或装置

- a) 温箱：30±1℃。
- b) 冰箱：0~4℃。
- c) 天平，称准至 0.1g。
- d) 电炉
- e) 灭菌吸管：1ml（具 0.01 刻度）、10ml（具 0.1 刻度）。
- f) 灭菌玻璃珠：直径约 5mm。
- g) 灭菌平皿：直径为 90mm。
- h) 灭菌试管，16mm×160mm。
- i) 放大镜 4×。
- j) 酒精灯。
- k) 试管架。
- l) 灭菌镊子。

## C.4 操作步骤

### C.4.1 平板制作

野生酵母培养基灭菌后，冷却50℃左右，按每毫升20单位青霉素和40单位链霉素加入培养基中，混匀，倾倒入无菌的平板内，每个平板15~20ml。放冷，使完全凝固。倒好的平板一次用不完的，可放入冰箱冷藏，保藏时间不得超过一周。

### C.4.2 酵母及酵母抽提物样品：

C.4.2.1 以无菌操作方法称取1克待检样品，倒入盛有9ml生理盐水的试管中，充分振荡溶解，混匀，制成1:10的稀释液。

C.4.2.2 吸取1:10的稀释液1ml注入盛有9ml无菌生理盐水的试管中，混匀成1:100的稀释液，按同法依次10倍递增稀释成1:1000、1:10000、1:100000稀释液等备用，吸取不同浓度的稀释液时必须更换吸管。

C.4.2.3 根据待检样中野生酵母情况的估计，选择2~3个适宜稀释液，分别在作10倍递增稀释的同时，即以吸取该稀释度的吸管移0.1ml于已经倒好的平板，用涂棒均匀涂布。每个稀释度做两个平皿。

C.4.2.4 涂布好后，静置半小时，翻转平皿，置30℃温箱内培养48±2小时后取出，计算平板内菌落数目，乘以稀释倍数（注意：涂布时吸取的体积为0.1mL，相当于一次10倍稀释，计算稀释倍数是应予以注意），即为每克样品中的野生酵母的总数。

## C.5 野生酵母菌落的判断

由于培养基含有极少量的硝基氮以外的氮源，家酵母在野生酵母培养基上也可以生长，但由于氮源不足，一般菌落较小，显著小于野生酵母菌落。野生酵母计数时，只计大菌落，不计小菌落。

野生酵母菌落与家酵母菌落的区别见附加说明。

## C.6 野生酵母菌落计数规则

一般用肉眼观察，用钢笔或蜡笔在平板上进行点数。在记下各个平板的菌落后，求出同一稀释度的各平板平均菌落数。

C.6.1 应选择平均菌落数在30~300之间的稀释度，乘以稀释倍数报告之。

C.6.2 若有两个稀释度，其生长的菌落数均在30~300之间，则视两者之比如何来决定。若其比值小于或等于2，应报告其平均数；若大于2则报告其中较小的数字。

C.6.3 若所有稀释度的平均菌落数均大于300，在有备份样品，且样品在此期间不会发生微生物增殖或死亡时，应重新加大稀释倍数复测。如已无样品可供复测或样品在此期间可能发生微生物增殖或死亡时，不予复测，此时应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

C.6.4 若所有稀释度的平均菌落数均小于30，在有备份样品，且样品在此期间不会发生微生物增殖或死亡时，应重新减少稀释倍数复测。如已无样品可供复测，或样品在此期间可能发生微生物增殖或死亡时，或稀释倍数已是最低稀释倍数时，不予复测，此时应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

C. 6. 5 若所有稀释度均无菌落生长，则以小于1乘以最低稀释倍数报告之。

C. 6. 6 若所有稀释度的平均菌落数均不在30~300之间，其中一部分大于300或小于30时，则以最接近30或300的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

## C. 7 菌落数的报告

菌落数在100以内时，按其实有数报告，大于100时，采用二位有效数字，在二位有效数字后面的数值，以四舍五入方法计算。为了缩短数字后面的零数，也可用10的指数来表示。

## C. 8 附加说明

### C. 8. 1 家酵母和野生酵母典型菌落

#### C. 8. 1. 1 家酵母和野生酵母在平板上菌落大小的区别

在经过 $48 \pm 2$ 小时培养后，野生酵母菌落较大，家酵母菌落较小。

#### C. 8. 1. 2 家酵母在显微镜下的典型形态

家酵母形态为圆形、卵圆形或椭圆形，出芽和细胞的中轴有一个比较小的夹角。而野生酵母通常是腊肠型的，经常连续出芽形成假菌丝。

## 附 录 D

## (规范性附录)

## 酵母中菌落总数检测方法

## D.1 适用范围

适用于了酵母中菌落总数的测定。

## D.2 培养基和试剂

## D.2.1 酵母中菌落培养基

D.2.1.1 成平板计数琼脂:直接使用购买的成品平板计数琼脂按标签说明配制。

D.2.1.2 在培养基灭菌前按照0.0070g/1000ml的比例添加放线菌酮,即每1L平板计数琼脂中添加7mL0.1%的放线菌酮溶液,抑制酵母的生长。

## D.2.2 试剂

D.2.2.1 75%乙醇

D.2.2.2 磷酸盐缓冲液,按下面方法配制:

D.2.2.2.1 贮存液:

|                                         |       |
|-----------------------------------------|-------|
| 磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 34.0g |
|-----------------------------------------|-------|

|     |       |
|-----|-------|
| 蒸馏水 | 500mL |
|-----|-------|

称取34.0g的磷酸二氢钾溶于500mL的蒸馏水中,用大约175mL的1mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.2,用蒸馏水稀释至1000mL后贮存于冰箱。

D.2.2.2.2 稀释液:用蒸馏水稀释1.25mL贮存液至1000mL,分装于合适容器,121℃高压灭菌15min。

D.2.2.3 生理盐水:称取8.5g氯化钠,溶于1000mL蒸馏水中,121℃高压灭菌15min。

D.2.2.4 1mol/L氢氧化钠溶液:称取40g氢氧化钠溶于1000mL蒸馏水。

D.2.2.5 1mol/L盐酸溶液:移取90mL浓盐酸,用蒸馏水稀释至1000mL。

D.2.2.6 放线菌酮溶液:0.1%(CYCLOHEXIMIDE 0.1% SOLUTION):OXOID公司生产,货号为SR0222C

## D.2.3 仪器设备或装置

a) 恒温培养箱:36±1℃

b) 恒温水浴箱:46±1℃

c) 均质器

d) 振荡器

e) 无菌吸管:1mL(具有0.01mL刻度)、10mL(具有0.1mL刻度)或微量移液器及吸头

f) 无菌培养皿:直径为90 mm

g) 无菌锥形瓶:容量150 mL

h) 玻璃珠:直径为5mm左右

i) 天平:感量0.1g

- j) 冰箱:2~10℃
- k) pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸
- l) 放大镜

### D.3 操作步骤

#### D.3.1 样品制备

D.3.1.1 以无菌操作取有代表性的样品盛于灭菌容器内,如有包装,则用75%乙醇在包装开口处擦拭后取样。

#### D.3.2 样品的稀释

D.3.2.1.1 方法一:以无菌操作取5g样品,倒入装有45mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌均质杯内,于8000r/min均质1~2min,制成1:10的样品匀液。如样品均质时间超过2min,应在均质杯外加冰水冷却。

D.3.2.1.2 方法二:以无菌操作取5g样品,放入装有45mL磷酸盐缓冲液或生理盐水,以及适量玻璃珠的150mL三角瓶中。迅速振摇,将样品混匀,制成1:10的样品匀液。振摇时,幅度为30cm,7s内振摇25次,也可用机械振荡器振荡15s代替手摇。

D.3.2.2 用1mL灭菌吸管准确吸取1:10的样品匀液1mL,放入装有9mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的无菌试管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面),振摇试管使其混合均匀,制成1:100的样品匀液。从容器中吸取样品匀液和以后的稀释操作中,吸管尖不要碰着瓶口。吸入的液体应先高于所要求的刻度,然后提起吸管使其尖端离开液面并贴在容器内壁将液体调至所要求的刻度。

D.3.2.3 按照“C.3.2.2”操作程序,制成10倍系列稀释样品匀液,如 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ ……,每稀释一次,换用一次1mL的无菌吸管或吸头。

#### D.3.3 平板接种

D.3.3.1 根据对样品污染状况的估计,对于每一个样品,选用合适的2~3个适宜的连续稀释度的样品匀液(液体样品可包括原液),在进行10倍递增稀释时,每个稀释度分别用灭菌吸管吸取1mL样品匀液放入作了适宜标志的无菌平皿内。如果某一样品匀液在取出供试部分前的放置时间超过3min,应重新将样品溶液振摇均匀。同时取1mL磷酸盐缓冲液或生理盐水加入到平皿作空白对照。

D.3.3.2 及时将15~20mL冷却至46℃平板计数琼脂培养基(可放置于 $46\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴中恒温)倾注到各平皿内。立即将平皿内的样品液和琼脂培养基充分混合。混合方法是平皿倾斜和旋转,并转动平板使其混合均匀。

#### D.3.4 培养

D.3.4.1 待琼脂凝固后将平皿翻转, $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\pm 2\text{h}$ 。

D.3.4.2 如果样品中含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时,可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基(约4mL),凝固后翻转平板,按“C.3.4.1”条件进行培养。

#### D.3.5 菌落计数

D.3.5.1 可用肉眼观察，必要时用放大镜，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

D.3.5.2 选取30CFU~300CFU之间，无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30CFU的平板记录具体菌落数，大于300CFU的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落应采用两个平板的平均数。

D.3.5.3 其中一个平板有较大片菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一并的菌落分布又很均匀，可计算半个平板后乘以2，代表一个平板的菌落数。

D.3.5.4 当平板上出现菌落间无明显界限的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

## D.4 结果与报告

### D.4.1 菌落总数的计算方法

D.4.1.1 若只有一个稀释度的平板上的菌落在合适范围内，计算两个平板菌落总数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每克(毫升)样品中平板菌落数。(下表，样品1)

D.4.1.2 若有两个稀释度在合适范围内，按GB4789.2-2010中7.1.2的公式（1）计算（下表，样品2）

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2) \times d}$$

式中：

N—样品中菌落数；

$\sum c$ —平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和；

$n_1$ —第一稀释度（低稀释倍数）平板个数；

$n_2$ —第二稀释度（高稀释倍数）平板个数；

d—稀释因子（第一稀释度）。

示例：

| 稀释度      | 1:100（第一稀释度） | 1:1000（第二稀释度） |
|----------|--------------|---------------|
| 菌落数（CFU） | 232, 244     | 33, 35        |

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2) \times d} = \frac{232 + 244 + 33 + 35}{(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = 24727$$

上述数据按“8.2.2”数字修约后，表示为 25000或 $2.5 \times 10^4$ 。

D.4.1.3 若所有稀释度的平板菌落数都小于30CFU，则按稀释度最低的平均菌落乘以稀释倍数计算。(下表，样品3)

D. 4. 1. 4 若所有稀释度的平板上的菌落都大于300CFU, 则对稀释度最高的平板进行计数, 其他平板可记录多不可计, 结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。(下表, 样品4)

D. 4. 1. 5 若所有稀释度(包括液体样品原液)的平板都无菌落生长, 则以小于1乘以最低稀释倍数计算。(下表, 样品5)

D. 4. 1. 6 若所有稀释度的平板菌落均不在30CFU~300CFU之间, 其中一部分小于30CFU或大于300CFU时, 则以最近30CFU或300CFU的平均菌落数乘以稀释倍数计算。(下表, 样品6)

| 样品号 | 菌落数   |        |         | 结果报告<br>CFU/g(ml)             |
|-----|-------|--------|---------|-------------------------------|
|     | 1:100 | 1:1000 | 1:10000 |                               |
| 1   | 多不可计  | 190    | 16      | 190000 ( $1.9 \times 10^5$ )  |
| 2   | 多不可计  | 224    | 35      | 240000 ( $2.4 \times 10^5$ )  |
| 3   | 18    | 2      | 0       | 1800 ( $1.8 \times 10^3$ )    |
| 4   | 多不可计  | 多不可计   | 523     | 5200000 ( $5.2 \times 10^6$ ) |
| 5   | 0     | 0      | 0       | <100 ( $<1.0 \times 10^2$ )   |
| 6   | 305   | 12     | 0       | 30500 ( $3.1 \times 10^4$ )   |

#### D. 4. 2 菌落总数的报告

D. 4. 2. 1 菌落数小于100CFU时, 按“四舍五入”原则修约, 以整数报告。

D. 4. 2. 2 大于或等于100时, 第三位数字采用“四舍五入”原则修约, 取前两位数字, 后面用0代替位数; 也可用10的指数形式来表示, 按“四舍五入”原则修约后, 采用两位有效数字。

D. 4. 2. 3 若所有平板上蔓延菌落而无法计数, 需要扩大稀释倍数重新检测, 报告具体的数字。

D. 4. 2. 4 若空白对照上有菌落长出, 则此次检测结果无效。

D. 4. 2. 5 称重取样以CFU/g为单位报告, 体积取样以CFU/mL为单位报告。

## 编制说明

本标准适用于以甘蔗糖蜜或食用玉米淀粉为原料，添加加工助剂（硫酸铵、氨水、磷酸二氢铵、啤酒花浸膏），经通风发酵培养酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、葡萄汁酵母（*S.uvarum*）、贝酵母（*S.bayanus*）可食用菌种，经脱水、添加山梨醇酐单硬脂酸酯(司盘 60)食品添加剂，干燥、包装制得的啤酒高活性干酵母。本产品适用于以麦芽和谷物为原料进行啤酒发酵。根据《中华人民共和国食品安全法》和《中华人民共和国标准化法》的有关规定，参照相关国标、行标的要求制订本企业标准，作为组织生产、质量控制和监督检查依据。

本标准铅指标严于食品安全国家标准 GB 31639 的规定。

安琪酵母（睢县）有限公司