



410770S-2025

安 琪 酵 母 (睢 县) 有 限
公 司 企 业 标 准

Q / A Q J M 2 4 6 1 S - 2 0 2 5

威 士 忌 酵 母

2 0 2 5 - 0 3 - 1 2 发 布
2 0 2 5 - 0 3 - 1 2 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、附录E为规范性附录。

本文件由安琪酵母（睢县）有限公司提出并归口。

本文件起草单位：安琪酵母（睢县）有限公司。

本文件主要起草人：常煦、刘代武、全明旭、司明星。

H N

Q B

威士忌酵母

1 范围

本标准规定了威士忌酵母的分类、术语和定义、要求，描述了相应的检验方法、检验规则等要求。

本标准适用于以甘蔗糖蜜、食用玉米淀粉、葡萄糖浆为原料，添加加工助剂（硫酸铵、氨水、磷酸二氢铵），经通风发酵培养成酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）可食用菌种，再经过脱水、添加食品添加剂山梨醇酐单硬脂酸酯（司盘60），干燥、包装制得的产品，适用于单一麦芽、混合麦芽或谷物的威士忌发酵酿造，起到产酒产香的作用。

根据产品使用用途的不同，主要将其分为单一/混合麦芽威士忌酵母、谷物威士忌酵母。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1 发酵酒度

麦精经过高温灭菌后，经过酵母进行发酵，在一定时间、温度条件下，发酵醪液中的实际乙醇体积含量，即为发酵酒度。

2.2 威士忌酵母

以酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）为菌种，添加食品添加剂（山梨醇酐单硬脂酸酯）等，经对酵母菌株进行发酵培养后，再通过分离、过滤、干燥等工艺，获得的适用于威士忌酒发酵酿造的活性干酵母。

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 山梨醇酐单硬脂酸酯（司盘60）应符合GB 13481的规定。
- 3.1.3 甘蔗糖蜜应符合QB/T 2684的规定。
- 3.1.4 食用玉米淀粉应符合GB/T 8885和GB 31637的规定。
- 3.1.5 硫酸铵应符合GB 29206的规定。
- 3.1.6 氨水应符合GB 29201的规定。
- 3.1.7 磷酸二氢铵应符合GB 1886.330的规定。
- 3.1.8 葡萄糖浆应符合GB/T20885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
----	----	------

色泽	乳白色至深棕色	取适量样品置于清洁、干燥的玻璃器皿中，在自然光线下，观察其色泽及状态。
气味	有酵母特有的气味，无腐败，无异臭	
状态	条状、块状、颗粒、粉状或乳状	
杂质	无正常视力可见杂质	

3.3 理化指标

理化指标应符合表 2 的要求。

表2 理化指标

项 目	要 求		检验方法
	单一/混合麦芽 威士忌酵母	谷物威士忌酵 母	
发酵酒度（单一/混合麦芽威士忌酵母）/（%Vol） \geq	8	-	附录 A
发酵酒度（谷物威士忌酵母）/（%Vol） \geq	-	15	附录 B
水分/（%） \leq	5.5		GB 5009.3
铅*（以 Pb 计）/（mg/kg） \leq	0.9		GB 5009.12
总砷（以 As 计）/（mg/kg） \leq	1.5		GB 5009.11
酵母活细胞数/（亿个/g） \geq	150		GB 7300.501 附录 B 第二法
活细胞率/（%） \geq	70		GB/T 20886.1 附录 D

注：*该指标严于食品安全国家标准 GB 31639 的规定。

3.4 微生物限量

应符合表 3 的要求。

表3 微生物限量

项 目	采样方案 ^a 及限量				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数/（CFU/g）	3	0	50000	100000	附录 C
乳酸菌/（CFU/g）	3	0	50000	100000	附录 D
野生酵母/（CFU/g）	3	0	5000	10000	附录 E
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
单核细胞增生李斯特氏菌/（25g）	不得检出				GB 4789.30

a 样品的采样及处理按 GB 4789.1 执行。

3.5 生产加工过程及卫生要求

应符合 GB 31612 和 GB14881 的规定。

3.6 净含量及允许短缺量

应符合《定量包装商品计量监督管理办法》(国家市场监督管理总局令 2023 年第 70 号) 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

出场检验项目包括：感官要求、水分、酵母活细胞数、活细胞率、菌落总数、乳酸菌、野生酵母。
型式检验按国家相关规定执行。

H N

Q B

附录 A (规范性) 发酵酒度测定

A.1 原理

麦精经过高温灭菌后,经过酵母进行发酵,在一定时间、温度条件下,发酵醪液中的实际乙醇体积含量,即为发酵酒度。

A.2 试剂和材料

- a) 固体麦精 (上海金山德乐食品配料有限公司)
- b) 消泡油 食用油

A.3 仪器设备或装置

- a) 高压蒸汽灭菌釜
- b) 恒温培养箱 控温精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- c) 电动搅拌机
- d) 精密酒精计 精度 0.2% (V/V)
- e) 蒸馏烧瓶 1000 mL、2000 mL
- f) 分析天平 感量 0.01g
- g) 白利 ($^{\circ}\text{Brix}$) 糖度计 精度 0.2°Brix
- h) 比重计 精度为 0.001

A.4 测定方法

A.4.1 麦精溶液配制

取 1 个 2 L 的玻璃烧杯,在烧杯中称取 480 g 的固体麦精,沿着烧杯壁缓慢加水使其溶解,加水至刻度 1.5 L 附近停止加水,在加水溶解过程中尽量避免泡沫产生。利用电动搅拌机设置:低转速,搅拌 10 min,使其完全溶解(若无电动搅拌机,可用玻璃棒人工搅拌),搅拌转速不易过大,避免产生泡沫。搅拌溶解后,利用糖度计测定糖度,糖度过高则补水;糖度过低则加入麦精溶解,使其糖度在 $23.3^{\circ}\text{Brix}(20^{\circ}\text{C})$ 。

A.4.2 分装,灭菌

取 3 个洁净、干燥 1000 mL 三角瓶(本次实验设置三组平行)。将麦精溶液分装至三角瓶中,每个三角瓶分装 400 g 麦精溶液。分装结束后,用封口膜将其封住,送入灭菌锅进行灭菌。灭菌锅条件设置为: 115°C 15 min,排气等级: 1。排气设置不宜过高,以免溶液喷出。灭菌结束后,拿出使其自然冷却,尽量减少瓶壁水珠。

(若灭菌锅无法控制排气,三角瓶规格可使用 2000 mL,在灭菌过程中避免其喷出。)

A.4.3 接种,发酵

称量 0.4 g 干酵母,等待麦精溶液冷却至 30°C 以下后,打开封口膜将酵母加入麦精溶液中,盖上封口膜。在加入过程中需要注意干酵母不能撒在三角瓶壁上,加入之后不能立马摇晃,等待干酵母吸水溶解后(大约 10-30min)再摇晃均匀。摇晃均匀之后放入 30°C 培养箱中发酵 5 天。在发酵过程中,发酵前三天,需要每天缓慢摇晃三角瓶 1 次。

A. 4. 4 蒸馏

将发酵醪液摇匀，用 100 mL 量筒量取 100 mL，倒入 1000 mL 蒸馏烧瓶中。在用量筒量取 100 mL 自来水入蒸馏烧瓶中，加入消泡油 2-3 滴，进行蒸馏。用 100 mL 容量瓶（外加冷水浴）接收馏出液。当馏出液接近刻度线时（馏出液达到 95 mL 以上），停止蒸馏，取下。待温度平衡至室温后，定容至 100 mL 刻度线。

A. 4. 5 测量酒精度

将定容后的馏出液全部倒入一洁净、干燥的 100 mL 量筒中，静置数分钟，待酒中气泡消失后，放入清洁擦干的精密酒精计，轻轻按一下。静置后，水平观测与弯月面相切的刻度示值，同时插入温度计记录温度。根据测得的温度和酒精计示值，按《酒精计温度浓度换算表》，换算成 20 °C 时的酒精度。

A. 5 结果的允许差

每个样品作了三个平行试验，测定值相对误差 $\leq 5\%$ ，若酒度误差值偏差过大则需要重新实验。

附 录 B
(规范性)
发酵酒度的测定

B.1 原理

酵母在特定条件下分解淀粉质原料进行高浓度酒精发酵获得的超高浓度酒精的方法。

B.2 试剂和材料

- a)黄玉米粉：（符合 GB/T 10463-2008，专用河南濮阳县英伦黄金玉米面，物料号 10000138）；
- b)耐高温淀粉酶：诺维信利可来耐高温 α -淀粉酶 Supra35, 000~40, 000 U/mL；
- c)糖化酶：苏宏葡糖淀粉酶（高效加强复配 Ferment 型）140, 000~150,000 U/mL；
- d)尿素：海南省海洋石油福岛有限公司出品的含抗结剂尿素。
- e)七水硫酸镁：分析纯
- f)酵母抽提物 FM888：安琪
- g)消泡剂：大豆油。
- h)1.5%稀硫酸：取 1.5ml 浓硫酸，采用去离子水稀释溶解定容至 100ml，所获得的稀硫酸浓度。
注：淀粉酶、糖化酶要求每 2 月更换一次。

B.3 仪器设备或装置

- a)不锈钢桶蒸锅 30 L~50 L；
- b)电磁炉 2000 W 以上
- c)三角瓶 500 mL；（型号一致）
- d)恒温摇床培养箱 控温精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ；
- e)精密酒精计 精度 0.2% (V/V)；
- f)容量瓶 100 mL；
- g)蒸馏烧瓶 1000 mL；
- h)量筒 100 mL；
- i)分析天平 $d=0.01\text{g}$ ；
- j)分析天平 $d=0.1\text{mg}$ ；
- k)移液枪 20~200 μL ；
- l)移液枪 100~1000 μL ；
- m)试色机 ECO-18 ；
- n)小烧杯 200 mL。
- o)封口膜
- p)橡皮筋

B.4 测定方法**B.4.1 液化方法****B.4.1.1 水浴蒸煮液化法**

先将不锈钢桶装自来水，置于电磁炉上加热；称量每个洁净干燥三角瓶重量并记录。称取玉米粉淀粉 80.00 g，移入洁净干燥的 500 mL 三角瓶中，加入 1.5%稀硫酸 0.2ml，加淀粉酶 0.38 mL，加七水硫

酸镁 0.80 g, 加酵母抽提物 FM888, 1.20 g, 加 40℃ 自来水 174~175 g, 搅匀, 放置水浴锅后, 不加盖, 5 分钟搅动一次, 之后再 5 分钟搅动一次, 之后 5 分钟再搅动一次, 加盖煮沸, 60 分钟后, 用长铁勺打搅醪液, 清理内壁, 之后加盖煮沸 30 分钟, 取出。用冷却水水浴速冷至 30-33℃, 擦干三角瓶外壁。

注: 比如含 80% 淀粉的玉米粉, 取 100g; 含 78% 淀粉的玉米粉取 $80/77 \times 100 = 104\text{g}$ 。

B. 4. 1. 2 试色机液化法

开机及程序设定

1. 开启总开关, 静待 3 分钟; 开启“HEAT”至“ON”; 开启“COOLING”至“ AUTO”;
2. 点击“编辑”进入编辑程序, 点击“密码”, 输入“7777”, 点击“ENTER”;
3. 点击“程序号”下第一行, 输入 1, 按“ENTER”;
4. 点击“Step”下第一行, 点击右侧↑, 按“ENTER”; 点击△T 下第一行, 输入 3, 按“ENTER”; 点击℃下第一行, 输入 101, 按“ENTER”;
5. 点击“Step”下第二行, 点击右侧时钟, 按“ENTER”; 点击℃下第二行, 输入 90, 按“ENTER”;
6. 点击“Step”下第三行, 点击右侧↓, 按“ENTER”; 点击△T 下第三行, 输入 3, 按“ENTER”; 点击℃下第三行, 输入 40, 按“ENTER”;
7. 点击“Step”下第四行, 点击右侧“END”, 按“ENTER”;

以上是程序控制参数, 意思是: 液化温度 101℃, 维持 90 分钟; 降温至 40℃ 结束。期间升降温速度是每分钟 3℃。

称量每个洁净干燥三角瓶重量并记录。称取玉米粉淀粉 80.00g, 移入洁净干燥的离心筒中, 加 0.38mL 淀粉酶液, 0.2mL 1.5% 稀硫酸, 加七水硫酸镁 0.80g, 加酵母抽提物 FM888, 1.20 g, 加 40℃ 自来水 174~175 g, 用药勺或玻璃棒搅拌均匀, (一定要搅匀, 没有沉淀, 否则液化不好) 盖紧离心筒盖。

打开试色机离心室柜门, 轻按“MOTOR INCHING”, 调节好旋转轴位置, 将离心筒按压至旋转轴上, 均匀放置 (试验样少, 垂直均匀放一圈; 试验样多, 2 个平行再均匀放置), 关闭柜门。

按压运行按钮, 检查运行程序是否是程序 1。液化机报警后开柜门轻按“MOTOR INCHING”, 调节好旋转轴位置, 戴手套将离心筒从旋转轴上逐个旋转取出, 倒入已称重的 500mL 三角瓶中。

B. 4. 2 接种

酒酵母接种: 向每个三角瓶加入尿素 1.00g (可以稀释后添加), 再加糖化酶 0.33mL; 半小时后, 保持温度 $32 \pm 1^\circ\text{C}$, 最后加干酵母 0.0800g; 用长取样勺清理瓶壁, 在分析天平上根据重量差补水至 188g (瓶初重+玉米粉重+185+3g), 采用封口膜封口, 用 1 根橡皮筋缠 3 圈。称重。

注: 1、补水严格按照“瓶初重+玉米粉重+185+3g”计算, 保证初始淀粉浓度的一致性。补水多出的 3g 为硫酸镁、尿素、抽提物重量。

B. 4. 3 发酵

将三角瓶置于转速 170rpm, 温度 32℃ 的恒温摇床中培养 70-72 小时; 取出, 称重;

B. 4. 4 蒸馏

发酵结束后, 摇匀, 用 100 mL 量筒取 100 mL 发酵醪倒入 1000 mL 蒸馏烧瓶中, 加自来水 100-150 mL 入蒸馏烧瓶中, 加入消泡剂 2 滴, 进行蒸馏。用 100 mL 容量瓶 (外加冷水浴, 控制馏出液温度 25℃ 以下) 接收馏出液。当馏出液至约 95 mL 时, 停止蒸馏, 取下, 定容至 100 mL, 摇匀。

B. 4. 5 测量酒精度

将定容的馏出液全部倒入一洁净、干燥的 100 mL 量筒中，静置数分钟，待酒中气泡消失后，放入清洁擦干的精密酒精计，再轻轻按一下。静置后，水平观测与弯月面相切处的刻度示值，同时插入温度计记录温度。根据测得的温度和酒精计示值，按《酒精计温度浓度换算表》，换算成 20℃时的酒精度，保留小数点有效位数 1 位。再重复检测 1 次，取 2 次的高值。

B.5 结果的允许差

每个样品作了三个平行试验，测定值相对误差 $\leq 5\%$ ，若酒度误差值偏差过大则需要重新实验。

H N

Q B

附录 C
(规范性)
菌落总数的测定

C.1 范围

本标准适用于含活性酵母菌样品的菌落总数检测。

C.2 术语

菌落总数是指检样经过处理，在一定条件下(如培养基、培养温度和时间等)培养后，所得每 mL(g) 检样中所形成的微生物菌落的总数。

C.3 原理

待测样品经适当稀释之后，其中的微生物充分分散成单个细胞，取一定量的稀释样液接种平板上，经过培养，由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落，即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞；统计菌落数量，根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出待检样品中的菌数。

C.4 仪器、培养基和试剂

- a) 仪器和材料同 GB4789.2 设备和材料。
b) 培养基试剂同 GB4789.2 培养基和试剂。
c) 0.1%放线菌酮溶液(任选一种):

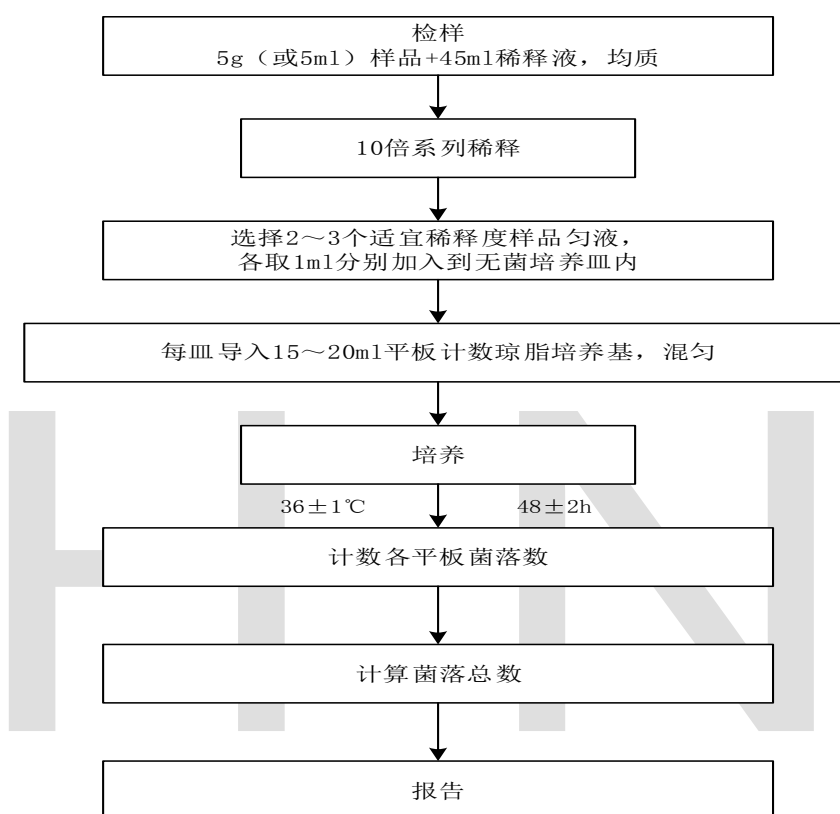
名称	货号	厂家	规格
0.1%放线菌酮溶液	SR0222C	OXOID	100 mL
	JYX234	北京陆桥	100 mL

d) 制霉菌素溶液:

名称	货号	厂家	规格
制霉菌素	N141226	阿拉丁	5MU
二甲基亚砷(分析纯)	/	西陇化工	500 mL

10 mg/mL 制霉菌素溶液的制备: 称取 0.1 g 制霉菌素, 用 10 mL 二甲基亚砷溶解, 用 0.22 μm 的膜过滤后, 分装于 1.5 mL 无菌离心管中, 每管 1 mL, 储存于 -20℃ 冰箱中保存备用。

C.5 步骤**C.5.1 检验程序:**



图A.1 菌落总数的检验程序

C.5.2 操作步骤

C.5.2.1 样品制备

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。

C.5.2.2 样品的稀释

固体或半固体样品:以无菌操作称取 5 ± 0.1 g样品,放入装有无菌的45 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的三角瓶中。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,也可用机械振荡器振荡15秒代替手摇。

液体样品:用无菌吸管吸取(或称取)5 mL(或g)样品,放入装有无菌的45 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水的150 mL三角瓶中,迅速振摇,制成1:10的样品匀液。吸取样品时,吸管插入液面下不要超过2.5 cm。不要在稀释剂中吹洗吸管。

C.5.2.3 定容

用1 mL灭菌吸管准确吸取1:10的样品匀液1 mL,放入装有9 mL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。在稀释操作中,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。按此步骤,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1 mL的无菌吸管或吸头。

C.6 接种

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个~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,每个稀释度分别用无菌吸管吸取1 mL样品匀液放入做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3分钟,应重新将样品溶液振摇均匀。同时取1 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水加入到平皿作空白对照。

及时将15 mL~20 mL冷却至48℃琼脂培养基(可放置于48±2℃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。混合方法是将平皿倾斜和旋转,并转动平板使其混合均匀。

注意:(1)含有活性酵母的样品,活性酵母在平板计数琼脂上也能良好生长,对于这类样品检测菌落总数时,在配制平板计数琼脂培养基时,要求在培养基灭菌前按照0.0070 g/1000 mL的比例添加放线菌酮,即每1 L平板计数琼脂中添加7 mL 0.1%的放线菌酮溶液;或者在培养基灭菌后冷却至48℃左右,每100 mL培养基中添加10 mg/mL制霉菌素溶液100 μL,来抑制酵母的生长。

C.7 培养

待琼脂凝固后将平皿翻转,36±1℃培养48±2小时。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4 mL),凝固后翻转平板,按“36±1℃培养48±2小时”条件进行培养。

C.8 计数

同GB 4789.2/6.3 菌落计数。

附录 D (规范性) 乳酸菌的测定

D.1 原理

待测样品经适当稀释之后，其中的微生物充分分散成单个细胞，取一定量的稀释样液接种平板上，经过培养，由每个单细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落，即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞；统计菌落数量，根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出待检样品中的菌数。

D.2 仪器及试剂

D.2.1 仪器和材料：

D.2.1.1 同 GB 4789.35 设备。

D.2.1.2 材料

名称	货号	厂家
厌氧罐	AG0025A	OXOID 公司
厌氧袋	AN0025A	
指示剂	BR0055B	

D.2.2 培养基及试剂

名称	货号	厂家
RAKA-RAY 琼脂培养基	CM0777	OXOID 公司或其它公司同类产品
MRS 培养基	CM0361	OXOID 公司或其它公司同类产品
0.1%放线菌酮	SR0222C	OXOID 公司或其它公司同类产品
2-苯乙醇（分析纯）	30143718	国药集团化学试剂有限公司
吐温 80（化学纯）	30189828	国药集团化学试剂有限公司

注意：放线菌酮属于剧毒药品，使用时应格外小心，不要接触到皮肤，用完后要立即洗手。

2-苯乙醇：挥发性强，对眼睛有较强的刺激作用，加量时应迅速。遇到明火可燃。

RAKA-RAY 琼脂培养基，是基于 Saha, Sondag and Middlekauff，用于检测啤酒和酿造过程中乳酸菌。在酿造过程中产生的乳酸杆菌生长时产生的废弃物严重地损坏有机体，它们的新陈代谢将严重的影响到风味。Raka-Ray 培养基使啤酒酿造者能够迅速、准确、大范围地在线监控啤酒中有机物，包括球菌。

通过加入 2.8 mL/L 的 2-苯乙醇来抑制革兰氏阴性菌，加入 7 mg 放线菌酮来抑制酵母来达到选择性。

在培养基中，添加一定量的吐温 80，比未加时得出更好的结果，包括菌落尺寸、菌落数。

D.2.3 分析步骤

D.2.3.1 培养基的配制

D. 2. 3. 1. 1 RAKA-RAY 琼脂培养基

称取 77.1 g RAKA-RAY 琼脂培养基, 溶解在 1 L 蒸馏水中, 加入 10 mL 吐温 80 和 7 mL 0.1% 的放线菌酮溶液, 121℃ 灭菌 15 分钟, 冷至 50℃~55℃, 在无菌条件下加入 2.8 mL 2-苯乙醇, 摇匀, 备用。

D. 2. 3. 1. 2 MRS 培养基

按 MRS 培养基的说明进行配置和说明。测酵母类产品时, 每 1 L 培养基中加入 7 mL 0.1% 的放线菌酮溶液后再灭菌。

D. 2. 3. 2 样品的稀释

无菌操作称取 5.0 g 样品, 加入到含有 45 mL 的无菌生理盐水(或磷酸盐缓冲液)中, 充分振荡, 混合均匀成 1: 10 的稀释液。再 10 倍倍比稀释到 1: 100, 1: 1000, 直到合适的稀释度。

根据对样品污染状况的估计, 选用 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, 每个稀释度分别用无菌吸管吸取 1 mL 样品匀液放入做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 3 分钟, 应重新将样品溶液振摇均匀。同时取 1 mL 磷酸盐缓冲液或生理盐水加入到平皿作空白对照。

及时将 15 mL~20 mL 冷却至 48℃ 琼脂培养基(可放置于 48±2℃ 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。混合方法是将平皿倾斜和旋转, 并转动平板使其混合均匀。

当读数时, 菌落分散不均, 或者呈片状、链状生长时, 按覆盖法重新检测。

覆盖法: 无菌条件下分装 4 mL 体积的琼脂到小试管, 放在温水烧杯中, 烧杯置于 60℃ 水浴锅内, 使其保存熔化状态。将 1 mL 测试样品和 4 mL 熔融的琼脂混匀, 立即将其倒到含有 15 mL~20 mL Raka-Ray (或 MRS) 琼脂的平皿, 以得到一个分布较好的菌落。在厌氧条件下培养。因为琼脂层非常薄, 可以很容易地调取单个菌落做进一步的检查。此条件下培养出来的菌落分散性好, 菌落形态比较清晰, 便于记数。

注: 酒酵母类产品用 RAKA-RAY 琼脂培养基, 其它产品用 MRS 培养基。

D. 2. 3. 3 培养

厌氧罐的使用:

1. 厌氧罐使用前检查密封圈在正确的位置。
2. 调节螺丝处于关闭状态。
3. 将琼脂凝固平皿翻转放在托架上, 再将托架放入罐内。
4. 取出一个厌氧指示剂, 撕开指剂外包装抽出 10 mm, 将指示剂夹在小钢夹上; 再撕开厌氧袋, 取出反应袋, 迅速夹在罐内的大钢夹上, 立即盖上厌氧罐盖, 用 4 个钢夹固定罐盖。
5. 将密封好的厌氧罐放置到恒温培养箱中培养。厌氧指示剂将会从粉红色变为白色, 从而确定罐内为厌氧环境。一般在半小时即可达到厌氧环境。如果厌氧罐密封 3 小时后指示剂仍然呈现紫红, 没有向白色转变, 应该开盖, 更换厌氧袋重新装罐。

6. 培养时间: RAKA-RAY 琼脂培养基 28±1℃ 培养 5 天, MRS 培养基在 36±1℃ 培养 72±2 小时。

D. 2. 3. 4 计数

菌落计数: 同 GB 4789.35/6.3。

H N

Q B

附录 E
(规范性)
野生酵母的测定

E.1 范围

本标准规定了酵母及酵母深加工产品中野生酵母的测定。

E.2 术语

威尔斯对野生酵母的定义是：任何未经严密选用与控制的酵母即为野生酵母。

E.3 原理

平板菌落计数法是将待测样品经适当稀释之后，其中的微生物充分分散成单个，取一定量和稀释液接种到平板上，经过培养，由单个细胞生长繁殖而形成肉眼可见的菌落，即一个单菌落应代表原样品中的一个单细胞。统计菌落数，根据其稀释倍数和取样接种量即可换算出样品中的含菌数。

E.4 仪器及材料

- a) 温箱：30±1℃；
- b) 冰箱：0~8℃；
- 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；
- m) 0.85% 灭菌生理盐水；
- n) 商品化野生酵母培养基：参考厂家（海博生物，产品编号 HB8766，规格 250g/瓶，有效期三年）。

E.5 操作步骤

E.5.1 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，倾倒至无菌的平板内，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，保藏时间可保存 4 周。

E.5.2 酵母及酵母抽提物样品：

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。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。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。涂布好后,静置半小时,翻转平皿,置 30℃培养箱内培养 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。

E.5.3 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,只计直径大于 1mm 的菌落,不计小菌落。

E.5.4 计数

参照 GB 4789.2 6.3 计数规则。



编制说明

本标准适用于以甘蔗糖蜜、食用玉米淀粉、葡萄糖浆为原料，添加加工助剂（硫酸铵、氨水、磷酸二氢铵），经通风发酵培养成酿酒酵母（*Saccharomyces Cerevisiae*）可食用菌种，再经过脱水、添加食品添加剂山梨醇酐单硬脂酸酯（司盘60），干燥、包装制得的产品，适用于单一麦芽、混合麦芽或谷物的威士忌发酵酿造，起到产酒产香的作用。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GB 31639《食品安全国家标准 食品加工用酵母》、GB/T 20886.1《酵母产品质量要求 第1部分：食品加工用酵母》、GB/T 32099《酵母产品分类导则》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。

本标准中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

Q B