

## 五、结论

1. 原料和半成品的长期积压是产生肠毒素

的重要原因。

2. 生产上大量用流动水冲洗原料和半成品, 可将肠毒素洗掉, 避免产品带毒。

# 酵母菌引起鲜葡萄汁饮料腐败变质原因的实验探讨

青島市平度卫生防疫站 郝庆功  
青島市益民葡萄酒厂 冷启成

本文主要介绍作者对1989年5月, 某厂利用当地资源, 新生产的鲜葡萄汁饮料(汽水); 发生大量变质原因, 所进行的一系列实验探讨。通过葡萄原汁, 变质饮料和未变质饮料采集检验, 细菌培养分离, 菌落, 菌体观察, 生化、同化, 耐糖、耐盐量、低温生长、热力消毒、pH适度、CO<sub>2</sub>环境生长、产气膨胀、复原等鉴定试验, 证实鲜葡萄汁饮料腐败变质是由啤酒酵母菌污染引起(样品经山东省卫生防疫站鉴定证实)。同时对该厂饮料生产工艺流程各部位, 车间空气酵母菌染带状况进行了监测, 测知了饮料生产过程中的污染程度, 明确了本产品被酵母菌污染发生变质原因、提高了饮料制作卫生管理的认识和开展定时对设备、管道, 用具、车间空气、地面消毒的必须性。实行饮料制作卫生消毒岗位责任制及定批对饮料监测是必要的。

为了解目前饮料生产常用消毒, 防腐药物对酵母菌消毒防腐效果, 选择经济效益高, 杀菌效果好药物, 做了药物敏感试验。看出饮料生产日常消毒惯用过锰酸钾和防腐用苯甲酸钠对酵母菌均无消毒, 防腐作用, 而以1/万氯胺T和1/万漂白精溶液, 对该菌杀灭效果较好。

本文还就预防饮料的腐败变质, 加强饮料制作卫生消毒管理, 开展饮料定批监测, 提出

了措施, 此对保证产品卫生质量, 提高产品的经济效益和社会效益有一定意义。

随着我国的开放搞活, 饮料、食品工业有了较大发展, 品种增多, 质量提高, 但是由于某些单位饮料制作卫生不够, 致饮料发生腐败变质, 给单位的经济和声誉造成不应有损失。1989年5月, 某饮料厂利用当地葡萄资源, 生产的玻璃瓶装鲜葡萄汁饮料(汽水)发生了大量变质, 经采样检查、工艺流程监测、细菌培养, 分离鉴定等实验, 证实为酵母菌引起, 现将结果报告如下:

## 一、资料介绍

某厂所生产葡萄汁饮料的制作原料, 是用当地大量生产的葡萄, 经精选去杂, 压制去皮滤汁、防腐、灭菌等工艺制作原汁, 经加入一定比例蔗糖、冲入一定量的CO<sub>2</sub>和水, 及加入标准量苯甲酸钠, 二氧化硫(添加剂)用以防腐灭菌, 每玻璃瓶装无色, 澄清饮料250ml(糖度5.5~9.5%, pH: 3.4~5.6)。几批饮料产出后15日, 亦陆续发现瓶内饮料呈现乳白色、混浊的液体(饮料色、香、味发生变化), 时间延长, 则有的瓶内出现沉淀; 装有变质饮料玻璃瓶, 时因气压增大而胀裂破碎。远销外地产品因变质而返退, 经济损失达10000余元。

## 二、实验材料与方法

(一) 样品采集: 随机采取3批次呈乳白色混浊鲜葡萄汁饮料(变质) 30瓶, 未变质饮料10瓶, (无色、透明、澄清), 葡萄原汁 6 瓶, 供实验。

(二) 培养基: 1, my~20琼脂培养基: 麦芽浸膏2克, 酵母膏5克、蔗糖 20 克、蒸馏水 100ml为液体增菌培养基; 加入琼脂 2 克即为固体培养基。

制法: 缓缓加热, 使各成份溶于蒸馏水中121°C15分钟灭菌备用(本培养基无需调 pH, 不可过度加热)。

2. 标本琼脂培养基: 鲜葡萄汁饮料(新配制) 50ml, 麦芽膏2克, 酵母膏0.5克, 蔗糖 10克蒸馏水加至100ml为液体增菌培养基, 加入琼脂2克为固体培养基。

制法: 以上成份溶于蒸馏水中, 置121°C 15分钟灭菌备用。

3. 糖发酵培养基: 以含2%麦芽膏汁加5%不同种糖制成。

4. 碳源、氮源培养基: 按《常见与常用真菌》配制。

5. 营养琼脂, 血琼脂(加10%脱纤维羊血), 麦糠凯琼脂、伊红美兰琼脂, 由山东省卫生防疫站供给。

(三) 实验方法: 1. 按国际检验项目检验。以无菌操作取瓶装变质饮料、未变质饮料, 葡萄原汁各0.5ml, 分别接种10ml增菌培养管中, 置28°C培养72~96小时; 同时取以

上不同饮料各一菌环, 直接划种培养基平板。并做细菌计数。常规细菌分离培养基划种同上。2. 鉴定试验: (1)菌落、菌体形态及培养特性。(2)糖发酵试验。(3)碳源, 氮源同化试验。(4)不同pH生长。(5)耐糖耐盐量试验(6)低温生长, 热力杀菌试验。(7)产气膨胀及变质试验。(8)消毒防腐药物敏感试验。酵母菌培养温度28°C常规细菌培养温度为37°C, 培养时间根据各项试验观察要求而定。

## 三、实验结果

(一) 形态与培养特性: 30份变质饮料经多次直接划种和样品增菌分离, 在my~20, 标本琼脂培养基上, 生长出了乳白色、圆形突起, 边缘整齐; 光滑(时间长者带趋折), 不透明, 中等大小的酵母菌菌落。常规培养基上, 菌落生长不良或无菌生长。葡萄原汁及未变质饮料均未分离出细菌。说明该菌在含有高糖的具有麦芽汁成份的培养基上, 生长良好。菌体经染色为G<sup>+</sup>, 卵圆形, 部份菌体多端发芽, 菌体大小多为4×3~8×5μm, 子囊孢子1~4个芽殖。在my和标本液体培养基中, 呈乳白色、混浊、无菌膜生长, 随培养时间加长, 则瓶内出现沉淀。经初步鉴定认为酵母菌。样品送山东省防疫站鉴定为啤酒酵母菌。

(二) 菌落计数: 30份变质饮料分别经细菌培养, 菌落总数多在302~567个/毫升之间, 占检验样品数76.4%, 多者可达1106个/毫升。

(三) 生化、同化试验: 结果见表1

表1 啤酒酵母菌的糖发酵和同化试验

菌号	⊕发酵试验	碳源同化试验	氮源同化试验		酵母菌 菌型
	萄乳麦蔗半棉密	萄乳麦蔗半棉密	硝	硫	
	萄芽乳子二 糖	萄芽乳子二 糖	酸 钾	酸 铵	
A. 4	⊕-⊕⊕⊕⊕-	+ - + + + + -	-	+	啤酒酵母菌
B. 14	⊕-⊕⊕⊕⊕-	+ - + + + + -	-	+	啤酒酵母菌
C. 24	⊕-⊕⊕⊕⊕-	+ - + + + + -	-	+	啤酒酵母菌

注: ⊕=表示产酸产气。+=表示产酸。-=表示不利用

(四) 耐糖耐盐量试验: 将12株酵母菌接种于含不同蔗糖量的my琼脂平板, 经培养结果该菌在40~60%糖浓度生长, 但以10~20%的糖浓度生长良好, 80%菌则出现抑制。本菌亦可在含有5% NaCl以下浓度生长, 说明该菌具有耐高糖高盐特性。

(五) 低温生长、热力杀菌试验: 啤酒酵母在my~20和标本琼脂培养基上, 置8~12°C较低温度环境中, 7~9天先后有该菌长出, 说明该菌在较低温度下可生长繁殖。而在65°C 30min, 70°C 10min则无菌生长。

(六) 酵母菌在5% CO<sub>2</sub>环境中的生长试验: 酵母菌接种my~20、标本琼脂培养基后, 置5% CO<sub>2</sub>环境, 结果该菌在培养基上均能生长, 说明饮料冲入CO<sub>2</sub>气体, 并不能影响酵母菌的生长繁殖。

(七) 产气膨胀及复原试验: 将30样酵母菌分别接种10mlmy和标本液体培养管中, 每管接种72小时培养物0.5ml, 然后培养管液面以上用固体石蜡封口、置28°C培养观察7天, 各管均因酵母菌在生长繁殖过程中, 产生的气体, 程度不同的将封口的固体石蜡冲出, 出现膨胀。接种未变质饮料管则无产气膨胀。取10瓶未变质饮料每瓶接种酵母菌液体培养物3ml (10亿/毫升), 2瓶接种无菌增菌液为对照, 经培养72小时后, 饮料出现乳白色、混浊、并出现沉淀物, 复种标本琼脂培养基, 复原出了酵母菌。对照瓶饮料则无变化和该菌检出。

(八) 酵母菌生长的适宜pH, 标本液体培养液 (重用1N NaOH校正pH 1~10培养管, 将酵母菌分别接种不同pH管培养, 啤酒酵母以pH2.5~6.5生长为宜,

(九) 饮料生产工艺流程及车间空气酵母菌监测结果表2。

表2看出饮料生产车间空气及生产工序各部位均有酵母菌染带。

(十) 消毒防腐药物敏感试验: 为选择对酵母菌有杀灭作用的药物 (对其它腐败菌亦有杀灭作用), 确保饮料卫生质量, 对饮料生产

表2. 饮料制作工序各部位及车间空气酵母菌监测结果

采样部位	管道	配料	冲罐	洗刷	包装	车间空气 (沉降法m <sup>3</sup> )
采样份数	4	4	6	5	6	6
阳性份数	2	3	4	1	1	4
阳性率%	50.0	75.0	66.67	20.0	16.67	66.67

常用消毒防腐 (添加剂) 药物, 做了药敏试验, 结果见表3。

表3. 啤酒酵母菌对消毒防腐药物敏感试验结果

药物名称	药 物 浓 度					
	1 100	1 1000	1 2000	1 5000	1 万	1 5万
过锰酸钾	—	—	—	—	—	—
苯甲酸钠	✓	—	—	—	—	—
二氧化硫	✓	—	—	—	—	—
过氧乙酸	✓	✓	—	—	—	—
新洁尔灭	✓	✓	—	—	—	—
洗必太	✓	✓	✓	✓	—	—
漂白精片	✓	✓	✓	✓	✓	✓
氯胺T	✓	✓	✓	✓	✓	✓

注: ✓=表示药物敏感。—=表示具有抗药。

∴=消毒及防腐药物敏感试验用试管法。

(酵母菌对14种临床治疗用抗菌素无一敏感。(纸片法))

#### 四、饮料变质原因及预防变质措施

(一) 近年来, 国内外学者对酵母菌引起含糖高的食品饮料的腐变败质, 已引起重视, 其研究也逐渐增多。国外有人报道酵母菌可引起蜂蜜, 软心巧克力等食品的变质<sup>[1]</sup>, 国内也有人报道酵母菌引起菠萝罐头的腐败<sup>[2]</sup>, 亦可引起低酒度的小香槟变质<sup>[3]</sup>。本次鲜葡萄汁饮料的腐败变质, 通过变质饮料的细菌分离, 菌落菌体观察、耐糖耐盐量、低温生长热力杀菌、生化、同化, pH适度、产气膨胀、复原等鉴定试验, 证实本次饮料变质是由啤酒酵母菌引起。

(二) Wal—Ker和Ayres将酵母菌作为腐败菌评述时指出, 能在高浓度糖液内生长的酵母菌称为嗜渗压酵母菌<sup>[1,4]</sup>。本次实验看出, 鲜葡萄汁饮料糖度在5.5~9.5%; pH为

3.4~5.6; 饮料生产劣变时的月平均气温17.8°C, 酵母菌在此温度下的生长繁殖力比细菌强(较低温环境下, 饮料制作环境如同食品一样, 其微生物菌群以酵母菌占优势), 饮料被污染后, 酵母菌在此适宜的环境下迅速生长繁殖, 使饮料变质(色、香、味发生变化)。因酵母菌繁殖而发酵产气, 如瓶内气压过大, 而引起饮料玻璃瓶胀碎破裂。

(三) 对饮料生产工艺流程各部位监测结果看出: 酵母菌污染存在的检出率较高, 同时说明酵母菌染带的广泛性, 严重性, 正如有关文献阐述的: 酵母菌可做为空气传播性污染物, 污染设备, 用具和饮料, 饮料制作卫生和消毒无规章制度和消毒措施, 个人卫生不注意, 是本次饮料变质的重要问题。通过药物敏感试验提示, 目前饮料生产用具, 玻璃瓶消毒用过锰酸钾, 饮料防腐用苯甲酸钠、二氧化硫等(汽水饮料添加剂)药, 对酵母菌无消毒防腐作用。以1/万的氯胺下和漂白精溶液消毒为佳(见表3)。此溶液有效消毒时间以4小时为宜。

(四) 消毒管理与治理措施, 1. 建立健全饮料制作卫生管理和按时消毒规范。实验证明, 营养丰富的葡萄汁(其它果汁如此)是细菌生长发育的良好培养基。饮料生产需求量大, 销售面广, 与人体关系密切, 因此, 要保证产品的卫生质量, 首先要建立行之有效的饮料制作卫生管理制度(某些厂尚缺乏), 应用有效灭菌药物对车间, 设备、容器(瓶子、瓶盖), 用具、按时洗刷消毒; 管道除用消毒液消毒外, 必要时用前应用开水冲洗和蒸汽消毒,

用后冲刷, 实行定时消毒岗位责任制)。2. 对饮料生产人员加强卫生宣传教育, 使人人懂得饮料制作的消毒和卫生管理, 是贯彻预防为主方针, 执行《中华人民共和国食品卫生法》, 保障人民健康的大事, 进车间前先更衣(穿工作服)、戴口罩、穿胶鞋, 用0.1~0.5%漂白粉溶液严格洗手消毒和胶鞋消毒, 形成自觉行动规范。3. 随着我国饮料生产高速发展, 对饮料制作卫生及饮料的监测提出了新课题, 既要防止常见微生物污染造成饮料腐败, 并开展饮料分批的酵母菌监测, 还要按时对饮料生产设备、容器、管道、用具、车间空气进行酵母菌(包括常见菌)检验, 以了解细菌污染状况(特别酵母污染严重单位), 此对预防生物污染引起饮料变质, 确保产品质量, 提高产品的经济效益和社会效益有一定意义。

#### 参考文献

- [1] 何晓青等译: 食品微生物检验方法提要, 人民卫生出版社, 293, 1982年。
- [2] 江希武等: 酵母菌引起菠萝罐头变质与菌株鉴定, 中国公共卫生杂志, 2: 28, 1988。
- [3] 郝庆功: 小香槟饮料酸败的嗜渗压酵母菌的分离与鉴定, 食品科学, 1: 60, 1988。
- [4] Walker, H.W. and J.C. Ayres 1970 Yeast as spoilage organisms. In A.H. Rose and J.S. Harrison, ed The Yeasts Vol. 3. Academic Press Inc New York NY.
- [5] 常见与常用真菌编写组: 常见与常用真菌, 科学出版社, 1973。
- [6] 魏景超: 真菌鉴定手册, 上海科学技术出版社, 1979。