دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

# کنترل بهداشتی نوشابه های غیر الکلی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# مقدمه :

نوشابه های غیر الکلی به نوشیدنی هایی اطلاق می شوند که فاقد الکل می باشند و به در گروه تقسیم می شوند:

نوشیدنی هایی که دارای گاز کربنیک بوده و آن هایی که فاقد گاز کربنیک می باشند.

به طور کلی نوشابه های غیر الکلی حاوی ۸۶ تا ۹۲ درصد آب، ۸ تا ۱۴ درصد مواد شیرین کننده (غذایی) و در صورت وجود دی اکسیدکربن، اسید و مواد طعم دهنده می باشند. این نوشابه ها ممکن است دارای مواد دیگری مثل رنگ های طبیعی یا مصنوعی و مواد نگهدارنده شیمیایی نیز باشند.

- نوشیدنی هایی که فاقد گاز کربنیک می باشند ممکن است حاوی آب میوه و ویتامین C باشند. وجود pH پایین در نوشابه های اسیدی بخصوص آن هایی که دارای گاز کربنیک می باشند ، امکان رشد و یا حتی بقاء بیماریزا ها، میکروارگانیسم های شاخص و مزوفیل های معمولی را ایجاد نمی کند.
- معمولا pH نوشابه های غیر الکلی به شرح زیر است.

1. کولاها ۲/۵ تا۲/۸
2. جینجرایل ۲/۷ تا ۳
3. لیمولایم ۳/۴ تا ۳/۹
4. آب پرتقال ۳ تا ۳/۵

- گاز کربنیک در نوشابه حل شده، تولید اسیدکربنیک می کند بدین جهت بدون افزودن اسید دیگری pH پایین می آید. به علاوه گازکربنیک فشار اکسیژن را کاهش داده، در نتیجه رشد کپک و مخمر در این شرایط محدود می گردد. اسیدهای خوراکی نظیر اسیدسیتریک، مالیک و فسفریک نیز که دارای فعالیت ضد میکروبی اختصاصی می باشند در نوشابه های غیر الکلی مورد استفاده قرار می گیرند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- فلورمیکروبی نوشابه های غیر الکلی:
- باکتری های مزوفیل، مخمرها و کپک ها ممکن است به تعداد کم در نوشابه های غیر الکلی موجود باشند بدون اینکه رشدی که موجب تغییر مزه و کیفیت نوشابه می گردد نمایند.
- نوشابه های بدون گازکربنیک معمولا قبل یا بعد از بسته بندی پاستوریزه می شوند، در حالی که نوشابه هایی که حاوی گازکربنیک می باشند تحت فرایند حرارتی قرار نمی گیرند.
- بعضی از نوشابه های گاز کربنیک دار ممکن است حاوی آبمیوه ای باشند که محیط مناسبی برای رشد مخمر هاست در این صورت اسید بنزوئیک به مقدار ۰/۱ درصد جهت کنترل رشد این میکروارگانیسم ها به نوشابه اضافه می شود.

START
Mix sugar granules and water in the sugar mix tank
Filter sugar and water syrup
Mix filtered sugar/water syrup with concentrate to get final syrup
Blend final syrup with carbonated water
Fill in glass bottles, seal with metal crowns and apply date code
Inspect final bottled products and store in warehouse
Release products for sale
END

- فساد نوشابه های غیر الکلی ممکن است در اثر یکی ازموارد زیر ایجاد شود:

1. عدم رعایت بهداشت در تهیه شربت و جابجا کردن و پرنمودن و بسته بندی نوشابه.
2. شستشوی ناقص و غیر کافی بطری ها.
3. آلودگی درب بطری ها
4. آلودگی مواد رنگی و مواد طعم دهنده
5. آلودگی شکر

- به طور کلی مواردی که باید در کارخانجات نوشابه سازی جهت آزمایش بهداشتی نوشابه ها از نظر میکروبیولوژی انجام گیرد ، عبارت است از:

1. بررسی میکروبیولوژی آب مصرفی:

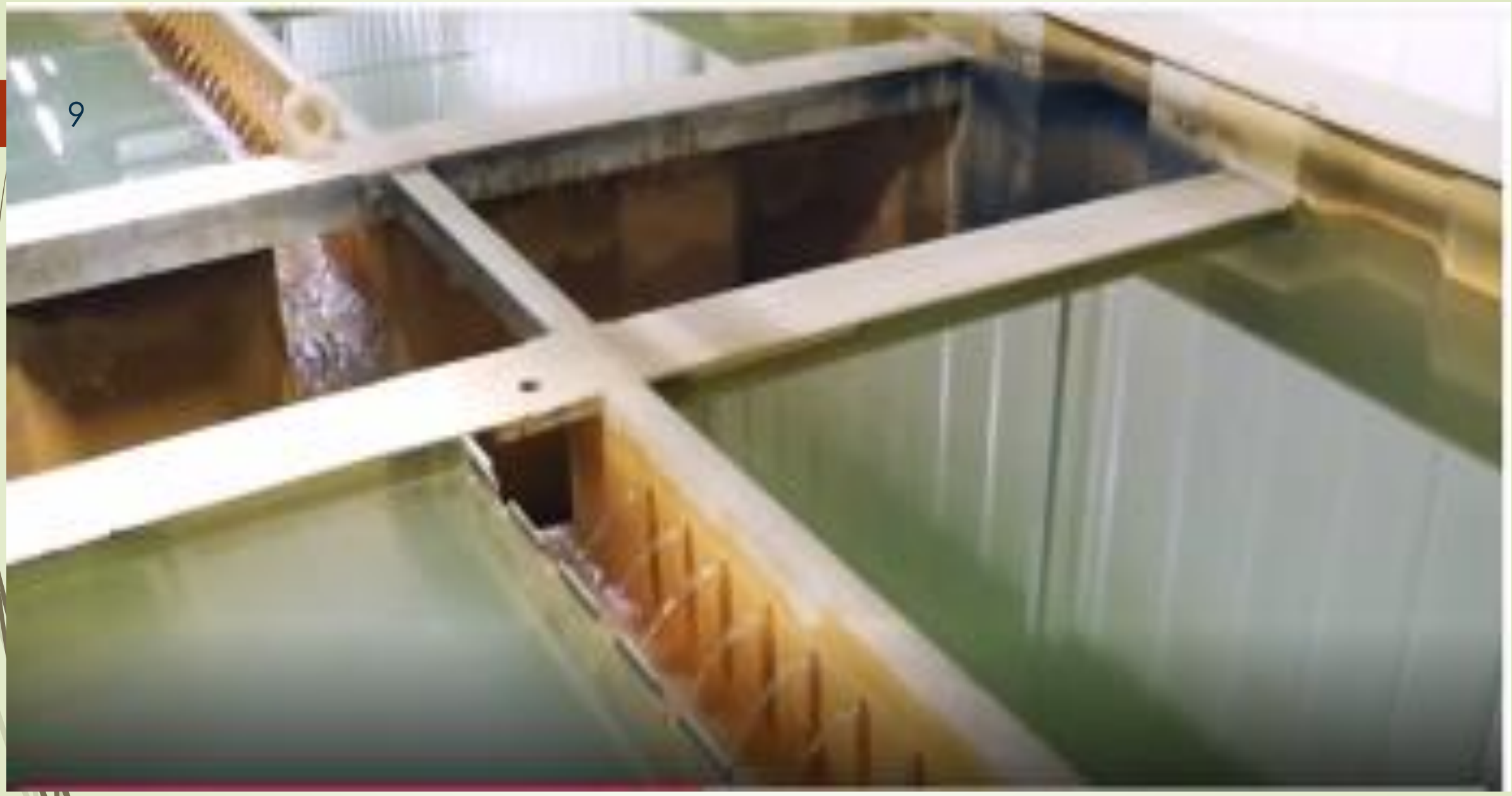
- برای کنترل میکروبی و آزمایش آب های مختلف می توان از استانداردهای مربوط استفاده نمود.

1. بررسی میکروبی شکر:

- شکر به عنوان یک شیرین کننده باید عاری از هر گونه آلودگی میکروبی باشد و از نظر میکروبیولوژی درجه مرغوبیت بستگی به شدت آلودگی دارد و باید از مصرف شکرهای که بسته بندی آن بد و ناقص است خودداری کرد و برای نمونه برداری باید مقدار ۵۰۰گرم از شکر موجود در کارخانه را به صورتی برداشت کرد کرد که نماینده کلی شکر موجود باشد. شکر مورد استفاده در نوشابه های غیر الکلی نباید حاوی بیش از ۱۰عدد مخمر ، ۱۰ عددکپک و ۲۰۰عدد باکتری در هر ۱۰گرم باشد.

1. مواد رنگی و چاشنی ها :

- علاوه بر شکر خشک در نوشابه های غیر الکلی مقدار موارد رنگی، چاشنی ها و غیر اضافه می کنند. این موارد نیز باید کاملا عاری از آلودگی باشد.



1. بطری های شسته شده :

- برای نمونه برداری متداول است که حداقل ۵ بطری انتخاب شود و بهتر است که هر ۵ دقیقه یک بار بعداز خارج شدن بطری ها از دستگاه نمونه برداری شود در صورتی که آزمایش در همان زمان امکان پذیر نباشد بایستی درب بطری را با سر بطری استریل بسته شود و در یخچال در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد قرار گیرد ولی در هر حال آزمایش میکروبی نباید بیش از ۴ ساعت بعد از نمونه برداری انجام شود.

1. کنترل میکروبی سر بطری ها :

- در این آزمایش باید دقت شود سر بطری ها به خصوص قسمت های که در ارتباط با نوشابه ها است باید عاری از میکروب های عامل فساد باشد و برای نمونه برداری باید از تعداد درب بطری های موجود ۱۰ تا۱۰۰ عدد درب بطری را با پنس استریل برداشته و مورد آزمایش قرار داد.

- تغییر فلور میکروبی در فرایند فاسد:
- اگر باکتری های اسید دوست و خصوصا مخمر هایی که توانایی تحمل گاز کربنیک را دارند به تعداد کافی در نوشابه های غیر الکلی موجود باشند، امکان دارد که نسبت به محیط سازگاری حاصل کرده، تکثیر یابند که در این صورت رسوب قابل رویت یا کدورت ایجاد می کنند. در این حالت مزه و طعم نوشابه تغییر کرده، این تغییر قابل تشخیص است. بنابراین شخص آزمایش کننده باید به این نکات توجه نماید.
- طبق تجربیات انجام شده، ۹۰ درصد از مواد فساد نوشابه های غیر الکلی به علت وجود تعداد زیاد مخمر است که بیش از همه *ساکارومیسس* و سپس *تورولوپسیس* و *پی چیا* را می توان نام برد. به میزان کمتر مشاهده گردید که باکتری های اسیددوست که معمولا *لاکتوباسیل* ، *لوکونوستوک* و یا *استوباکتر*می باشند ایجاد فساد همراه با کدورت و رسوب یا تغییر طعم می نمایند.
- در نوشابه هایی که حاوی گاز کربنیک می باشند کپک ها به ندرت مسئله ساز می باشند. در این فراورده ها مخمرها حالت دسته ای یا خوشه ای پیداکرده، به ظاهر شبیه کپک ها می باشند. شخص آزمایش کننده باید ابتدا از نمونه ی نوشابه کشت داده و سپس قضاوت نهایی را انجام دهد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- تفسیر نتایج :
- یک نوشابه غیر الکلی را زمانی می توان از نظر میکروبیولوژی فاسد محسوب کرد که علاوه بر کدورت، رسوب و تغییر طعم، از نظر کشت میکروبی نیز حاوی بیش از ۵۰ عدد سلول مخمر و یا ۲۰۰ عدد باکتری در هر میلی لیتر باشد.
- شمارش کپک اگر بیش از ۱ عدد در هر میلی لیتر باشد، نشان دهنده آلودگی اجزا متشکله ترکیب نوشابه یه عدم رعایت بهداشت در مرحله فرایند می باشد.

# مواد و وسایل مورد نیاز:

1. بطری شسته شده نوشابه
2. درب بطری نوشابه
3. بطری حاوی نوشابه
4. ارلن دهان گشاد استریل
5. لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل
6. پنس و الکل
7. دانه های شیشه ای استریل (پرل)
8. پی پت استریل

1. پتری دیش استریل
2. محیط کشت آگار مغذی
3. محیط کشت PDA
4. بن ماری
5. درب بطری بازکن
6. پنبه الکلی

# روش آزمایش:



## ۱- آزمایش بطری شسته شده

برای انجام آزمایش یک بطری نوشابه را انتخاب کرده و سپس مقدار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل را به آن اضافه کرده و به کمک پنس استریل تعدادی دانه شیشه ای استریل (دانه های پرل) را جهت کمک به حرکت مکانیکی به داخل بطری می اندازیم و درب بطری را به وسیله یک عدد درب که قسمت داخلی آن با عبور دادن از روی شعله چراغ گاز استریل شده است می بندیم و آن گاه با قرار دادن انگشت خود بر روی درب ، بطری را چندبار تکان می دهیم تا آب مقطر اضافه شده با تمام سطح داخلی بطری تماس پیدا کند.

بعد از این که عمل تکان دادن را انجام دادیم درب بطری را بازکرده و به کمک پی پت استریل مقدار ۱ میلی لیتر از مایع داخل بطری به داخل پتری دیش استریل اضافه نموده و با رعایت شرایط آسپتیک محیط کشت آگار مغذی را که بعداز ذوب شدن در داخل بن ماری جوش سرد شده و دارای درجه حرارتی بین ۴۵ تا ۵۰ درجه ی سانتی گراد است به داخل پتری دیش اضافه نموده. و سپس پتری دیش را به علامت 8 به روش پور پلیت در روی میز آزمایشگاه به آرامی حرکت می دهیم تا محیط کشت اضافه شده با مایع مورد آزمایش به خوبی مخلوط شود

- برای رشد قارچ ها از محیط کشت (PDA)استفاده می شود. بدین منظور مقدار ۱ میلی لیتر از مایع داخل بطری را روی محیط کشت (PDA) بریزید و با میله ی شیشه ای سرکج نمونه را کاملا پخش کنید.
- پتری دیش حاوی محیط کشت آگار مغذی را جهت جداسازی و تشخیص باکتری های مختلف به مدت ۳الی۵ روز به داخل گرمخانه (اتو) با درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد قرار دهید.
- همچنین محیط کشت PDA را جهت جداسازی و تشخیص مخمرها و کپک ها به مدت ۵ روز در حرارت ۲۲ درجه ی سانتی گراد(معمولا دمای آزمایشگاه) قرار دهید و بعد از سپری شدن مدت زمان لازم کلنی باکتری ها و یا قارچ ها را بر روی محیط فوق شمارش کنید.

## ۲- آزمایش درب بطری

- نظر به این که تنها قسمت داخلی درب بطری با نوشابه تماس پیدا کند، لذا این آزمایش تنها بر اساس کنترل بهداشتی و میکروبی این ناحیه به کار گرفته خواهد شد و از این رو ابتدا به کمک پنس استریل قسمت فلزی خارجی درب بطری را که احتمال دارد باعث به وجود آمدن خطا در آزمایش شود را با عبور دادن از روی شعله چراغ گاز استریل می کنید.
- ولی باید دقت داشته باشید که حرارت دادن درب بطری به حدی نباشد که قسمت داخلی آن نیز حرارت ببیند و باعث از بین رفتن میکروارگانیسم های احتمالی موجود در آن بشود.

- بعداز انجام این کار پنج سر بطری را به داخل یک ارلن استریل منتقل کنید و سپس مقدار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل را به ارلن فوق اضافه کرده و ارلن را چندبار تکان دهید تا آب مقطر اضافه شده با درب بطری های مورد آزمایش تماس پیدا کند.
- بعداز آن به کمک پی پت استریل مقدار یک میلی لیتر از مایع داخل ارلن را به داخل یک پتری دیش استریل منتقل کنید و مانند آزمایش قبل محیط کشت آگار مغذی را به آن اضافه کرده و با روش پورپلیت مخلوط کنید
- مشابه روش آزمایش قبل برای محیط کشت PDA انجام دهید و آنگاه محیط های کشت فوق را مطابق روش قبل به ترتیب در داخل گرمخانه (اتو) و در دمای آزمایشگاه قرار دهید و اقدام به شمارش باکتری ها و قارچ های رشد پیدا کرده بر روی محیط نمایید.

# ۳- آزمایش محصول نهایی

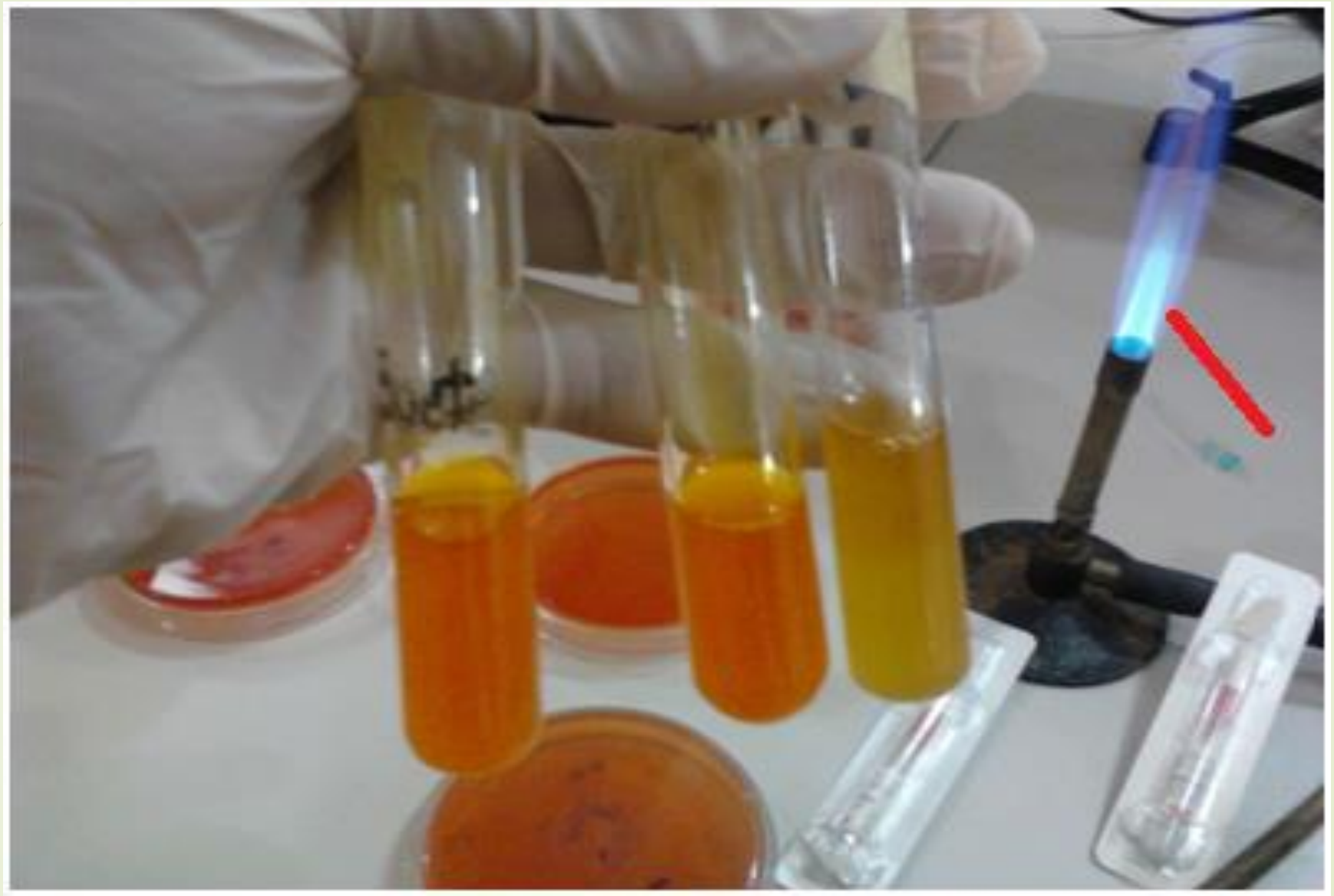


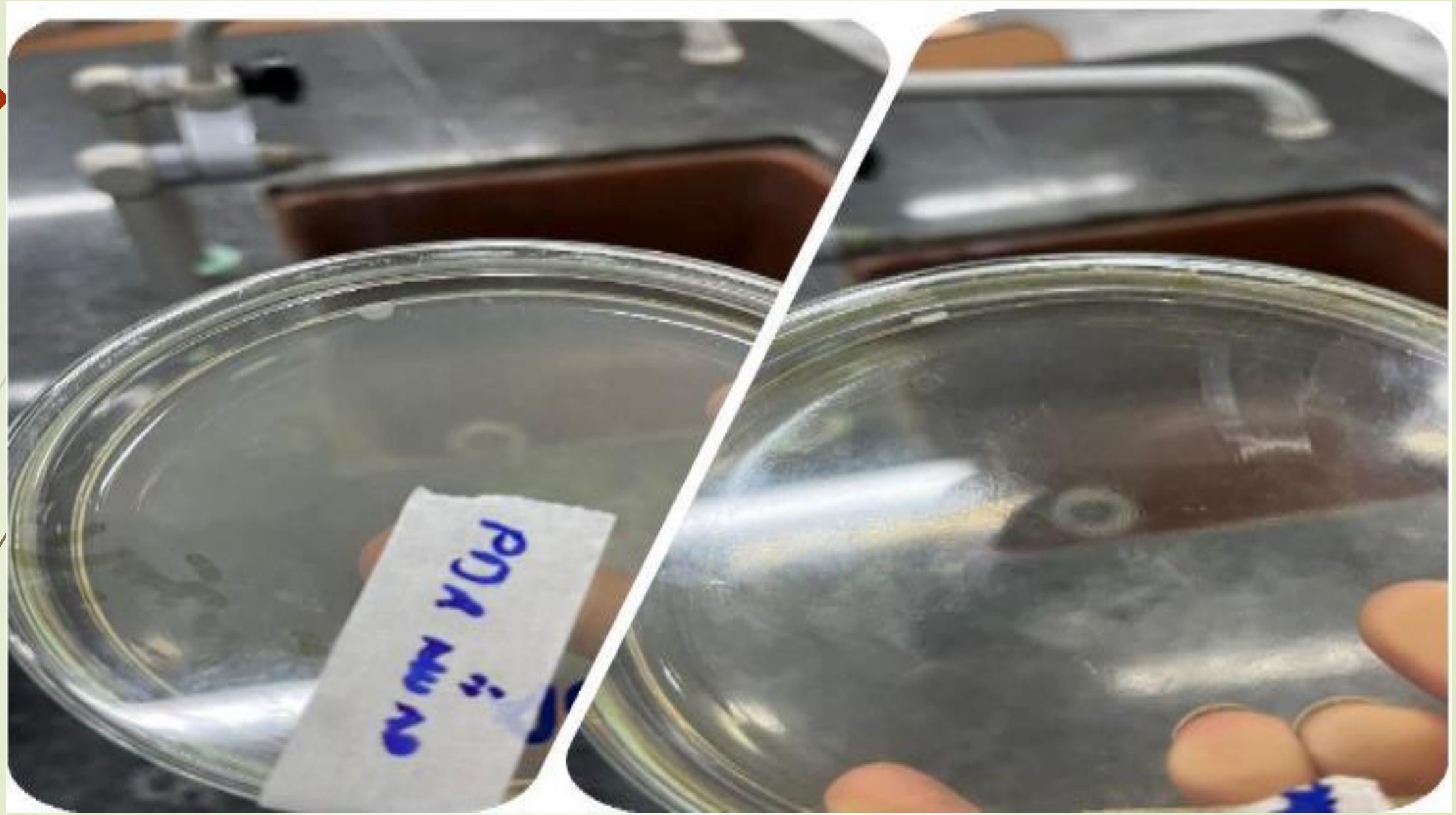
- الف - روش نمونه برداری :
- حداقل دو نمونه از بطری با قوطی های حاوی نوشابه را از محل انبار کارخانه یا انبار فروش انتخاب کنید.
- ب - روش شمارش میکروبی :
- ابتدا بعداز شستن درب قوطی و یا سر بطری و تمیز کردن آن با الکل و شعله دادن به آرامی سر بطری را به صورت سترون با درب بازکن استریل شده باز کنید و با استفاده از یک پی پت ۱۰ میلی لیتری که دارای درجه بندی ۰/۱ میلی لیتر است نمونه را از داخل بطری یا قوطی خارج کنید.
- اگر وجود گاز کربنیک در برداشت نمونه ایجاد اشکال می کند، محتویات داخل قوطی یا بطری در یک ظرف سترون مناسب بریزید و به هم بزنید تا گاز خارج شود و آنگاه به کمک پی پت مدرج مقدار ۰/۱ میلی لیتر از نوشابه را به داخل پتری دیش استریل منتقل کنید.
- مطابق با آزمایشات قبل کشت آگار مغذی را در داخل گرمخانه (اتو) قرار دهید. برای محیط کشت (PDA) نیز ۰/۱ میلی لیتر از نمونه را روی محیط کشت بریزید و با میله ی سرکج نمونه را کاملا پخش کنید و در دمای آزمایشگاهی قرار دهید. پس از مدت زمان انکوباسیون اقدام به شمارش باکتری ها و قارچ های احتمالی رشد پیدا کرده بر روی محیط های فوق ذکر کنید.

- جهت انجام آزمایشات فوق باید دقت کنید که بعداز انجام هر مرحله از آزمایش مشخصات مورد آزمایش به شرح زیر بر پشت پتری دیش یاداشت کنید.

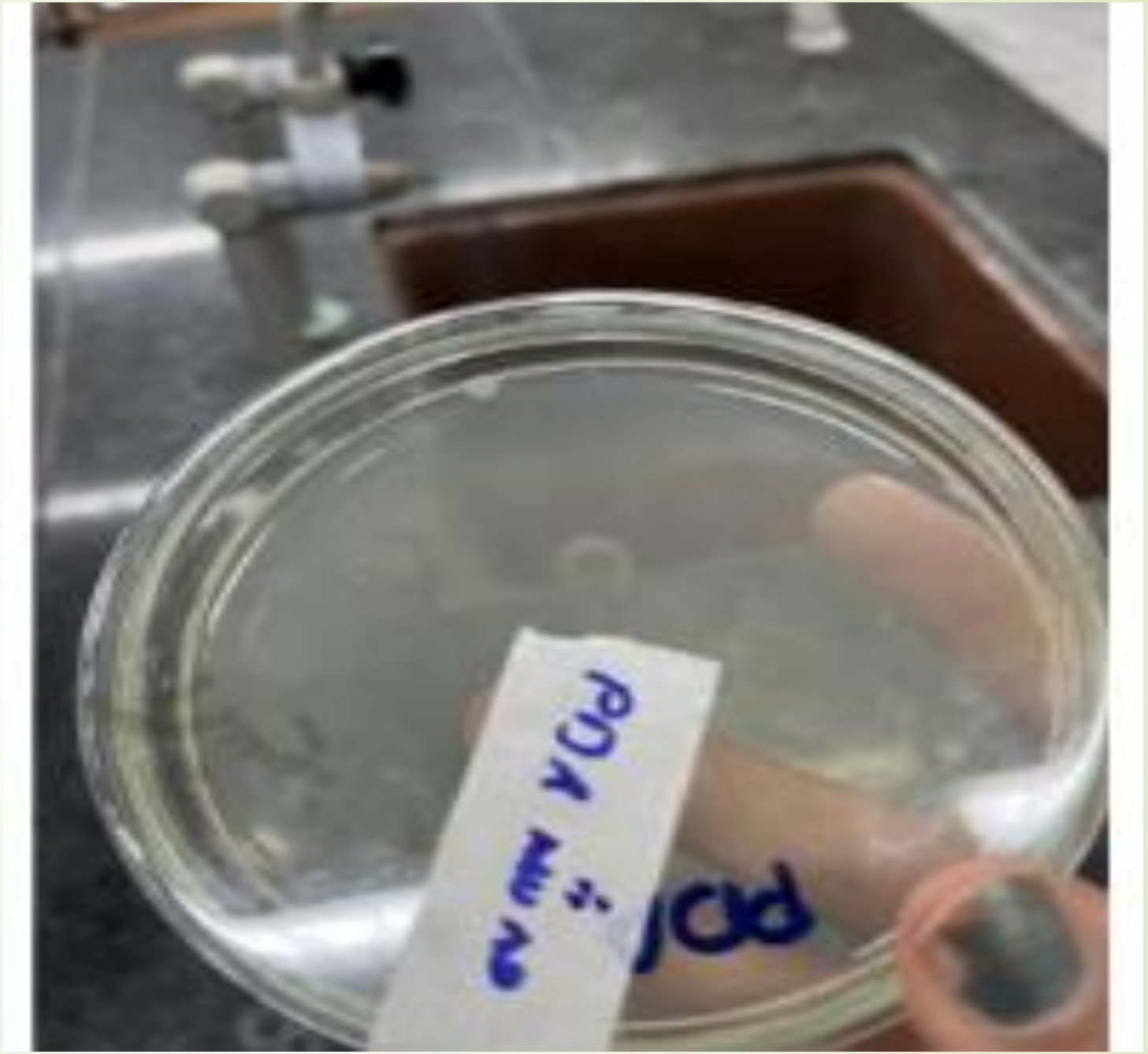
1. نام آزمایش
2. تاریخ آزمایش

تهیه کننده : سهیلا عباسی





تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

تهیه کننده : سهیلا عباسی