

TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6507-5:2013

ISO 6887-5:2010

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
CHUẨN BỊ MẪU THỬ, HUYỀN PHÙ BAN ĐẦU VÀ DUNG DỊCH
PHA LOĂNG THẬP PHÂN ĐỂ KIỂM TRA VI SINH VẬT –
PHẦN 5: CÁC NGUYÊN TẮC CỤ THỂ ĐỂ CHUẨN BỊ
MẪU SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples,
initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination –
Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 6507-5:2013 thay thế TCVN 6263:2007

TCVN 6507-5:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 6887-5:2010

TCVN 6507-5:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu biến soạn*, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ TCVN 6507 (ISO 6887), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyễn phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật* bao gồm các phần sau:

- TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999), *Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyễn phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân;*
- TCVN 6507-2:2005 (ISO 6887-2:2003), *Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt;*
- TCVN 6507-3:2005 (ISO 6887-3:2003), *Phần 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản;*
- TCVN 6507-4:2005 (ISO 6887-4:2003), *Phần 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản;*
- TCVN 6507-5:2013 (ISO 6887-5:2010), *Phần 5: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu sữa và sản phẩm sữa.*

**Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi -
Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha
loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật -
Phần 5: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu sữa và sản
phẩm sữa**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples,
initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination –*

Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các chất liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu sữa, sản phẩm sữa và các huyền phù của chúng để kiểm tra vi sinh vật khi các mẫu yêu cầu chuẩn bị khác với các phương pháp chung được quy định trong TCVN 6507-1 (ISO 6887-1). TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) đưa ra các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo để kiểm tra vi sinh vật.

Tiêu chuẩn này không bao gồm việc chuẩn bị mẫu đối với phương pháp phát hiện và định lượng trong khi các phương pháp chuẩn bị đã được quy định trong tiêu chuẩn liên quan.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm sau đây:

- a) sữa và sản phẩm sữa dạng lỏng;
- b) sản phẩm sữa bột;
- c) phomat;
- d) casein và caseinat;

- e) bơ;
- f) kem thực phẩm;
- g) bánh custard, món tráng miệng và cream ngọt;
- h) sữa lên men và cream chua;
- i) thức ăn từ sữa dành cho trẻ sơ sinh.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*

TCVN 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật*

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân*

TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Mẫu phòng thử nghiệm (laboratory sample)

Mẫu được chuẩn bị để gửi đến phòng thử nghiệm và được dùng để kiểm tra hoặc thử nghiệm.

CHÚ THÍCH: Được chấp nhận từ A.19 của ISO 7002:1986^[1].

3.2

Phản mẫu thử (test portion)

(vi sinh vật) Thể tích hoặc lượng mẫu xác định của mẫu đại diện được lấy từ mẫu phòng thử nghiệm dùng để chuẩn bị huyền phù ban đầu.

3.3

Huyền phù ban đầu (initial suspension)

Dung dịch pha loãng ban đầu (primary dilution)

Huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương thu được sau khi cân hoặc đong một lượng sản phẩm cần kiểm tra (hoặc mẫu thử được chuẩn bị từ sản phẩm) đã được trộn với một lượng dung dịch pha loãng lớn gấp chín lần, nếu cần, sử dụng máy trộn và chú ý để cho các hạt to lắng xuống, nếu có.

CHÚ THÍCH 1: Xem 8.1 về phòng ngừa thích hợp.

CHÚ THÍCH 2: Xem Điều 5 về các chất pha loãng.

3.4

Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (further decimal dilutions)

Các huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương thu được bằng cách trộn một thể tích xác định của dung dịch pha loãng ban đầu (3.3) với thể tích dung dịch pha loãng lớn gấp chín lần và bằng cách lặp lại các thao tác này với các độ pha loãng tiếp theo đã chuẩn bị cho đến khi thu được các dãy dung dịch pha loãng thập phân thích hợp để cấy vào môi trường.

4 Nguyên tắc

Chuẩn bị huyền phù ban đầu (3.3) sao cho thu được sự phân bố các vi sinh vật trong mẫu thử càng đồng đều càng tốt.

Nếu cần, chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (3.4) sao cho giảm bớt số lượng vi sinh vật có trong một đơn vị thể tích, để sau khi ủ có thể quan sát được có hay không có sự phát triển của chúng (trong trường hợp môi trường lỏng) hoặc các khuẩn lạc (trong trường hợp của đĩa thạch hoặc ống thạch), như quy định trong từng tiêu chuẩn riêng.

Nếu cần, để giới hạn phạm vi định lượng đến khoảng đã định, hoặc nếu dự đoán được số lượng vi sinh vật cao thì có thể chỉ cấy các dung dịch pha loãng cần thiết (ít nhất hai độ pha loãng liên tiếp) để thu được số đếm theo công thức tính trong TCVN 6404 (ISO 7218).

5 Dung dịch pha loãng

Trong quá trình phân tích chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử ion vô trùng, trừ khi có quy định khác.

5.1 Nguyên liệu cơ bản

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

5.2 Dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung

5.2.1 Dung dịch muối pepton

5.2.1.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1 000 ml

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nhẹ trên bếp điện (6.6) nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

5.2.2 Dung dịch Ringer nồng độ một phần tư

5.2.2.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl)	2,25 g
Kali clorua (KCl)	0,105 g
Canxi clorua (CaCl_2), dạng khan	0,06 g ^a
Natri hydrocacbonat (NaHCO_3)	0,05 g
Nước	1 000 ml

* Có thể sử dụng 0,12 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các muối trên trong nước. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,9 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

5.2.3 Dung dịch pepton

5.2.3.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	1,0 g
Nước	1 000 ml

5.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan pepton trong nước. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

5.2.4 Dung dịch đệm phosphat

5.2.4.1 Thành phần

Kali dihydroporphat (KH_2PO_4)	42,5 g
Nước	1 000 ml

5.2.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong 500 ml nước. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,2 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần. Pha loãng với phần nước còn lại đến 1 000 ml.

Bảo quản dung dịch gốc trong điều kiện lạnh.

Cho 1 ml dung dịch gốc này vào 1 000 ml nước để dùng làm dung dịch pha loãng.

5.2.5 Nước đệm pepton

5.2.5.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân các mô động vật bằng enzym	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Dinatri hydrophosphat ngậm 12 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
Kali dihydroporphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Nước	1 000 ml

* Có thể dùng 3,56 g dinatri hydrophosphat (Na_2HPO_4).

5.2.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước, đun nóng nhẹ trên bếp điện (6.6), nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

5.2.5.3 Áp dụng

Dung dịch pha loãng này đặc biệt nên dùng để phát hiện *Salmonella* spp. hoặc định lượng *Listeria monocytogenes*, nhưng cũng có thể dùng để chuẩn bị các huyền phù ban đầu cho các phép xác định khác.

5.3 Dung dịch pha loãng dùng cho các mục đích đặc biệt

Các dung dịch pha loãng này chỉ dùng để chuẩn bị các huyền phù ban đầu.

5.3.1 Dung dịch natri xitrat

5.3.1.1 Thành phần

Trinatri xitrat ngậm hai phân tử nước ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun trên bếp điện (6.6) ở nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,5 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

5.3.1.3 Sử dụng

Dung dịch này được dùng cho phomat, sữa bột sản xuất bằng phương pháp sấy trực và một số caseinat.

5.3.2 Dung dịch dikali hydrophosphat

5.3.2.1 Thành phần

Dikali hydrophosphat (K_2HPO_4)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun trên bếp điện (6.6) ở nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C, nếu cần. Đồi với bột whey chua thì chỉnh pH đồi với dung dịch pha loãng ban đầu sau khi khử trùng là $8,4 \pm 0,2$ ở 25 °C. Đồi với phomat, sữa bột sản xuất bằng phương pháp sấy trực, sữa lên men, caseinat và cream chua thì chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,5 \pm 0,2$ ở 25 °C.

5.3.2.3 Áp dụng

Dung dịch này được dùng cho phomat, sữa sản xuất bằng phương pháp sấy trực, sữa lên men, một số caseinat, bột whey chua và cream chua.

5.3.3 Dung dịch dikali hydrophosphat có chất chống tạo bọt

5.3.3.1 Dung dịch dikali hydrophosphat

5.3.3.1.1 Thành phần

Dikali hydrophosphat (K_2HPO_4)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan dikali hydrophosphat trong nước bằng cách đun trên bếp điện (6.6) ở nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C.

5.3.3.2 Dung dịch gốc chống tạo bọt

5.3.3.2.1 Thành phần

Polyetylen glycol 2000	1 g
Nước	100 ml

5.3.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan polyetylen glycol 2000 trong nước bằng cách khuấy.

5.3.3.3 Chuẩn bị

Cho 1 ml dung dịch gốc chống tạo bọt (5.3.3.2) vào 1 lít dung dịch K₂HPO₄ (5.3.3.1). Điều chỉnh pH sao cho dung dịch pha loãng ban đầu của cả casein lactic và casein axit, sau khi khử trùng là 8,4 ± 0,2 ở 25 °C và casein rennet sau khi khử trùng là 7,5 ± 0,2 ở 25 °C.

5.3.3.4 Sử dụng

Dung dịch này được dùng cho casein axit, casein lactic và các casein rennet.

5.3.4 Dung dịch tripolyphosphat

5.3.4.1 Thành phần

Natri tripolyphosphat (Na ₅ O ₁₀ P ₃)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng nhẹ trên bếp điện (6.6), nếu cần. Phân phôi dung dịch tripolyphosphat với các lượng 90 ml vào các chai và khử trùng. Khi môi trường này được bảo quản ở nhiệt độ 5 °C ± 3 °C có thể bền tối đa 1 tháng.

5.3.4.3 Sử dụng

Dung dịch này được dùng để thay thế dung dịch pha loãng đối với các casein rennet khó tan.

5.3.5 Dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung với dung dịch α -amylase

5.3.5.1 Chuẩn bị

Cho 12,5 mg α -amylase (EC 3.2.1.1, xem Tài liệu tham khảo [3]) có hoạt độ riêng khoảng 400 đơn vị¹⁾ trên miligam vào 225 ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (xem 5.2). Dung dịch pha loãng này được dùng cho 25 g phần mẫu thử. Sử dụng các lượng với cùng tỷ lệ để chuẩn bị các phần mẫu thử khác (ví dụ: đối với 10 g mẫu thử thì thêm 5 mg α -amylase vào 90 ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung).

5.3.5.2 Sử dụng

Dung dịch này được dùng cho các thực phẩm có chứa tinh bột.

5.3.6 Nước đệm pepton với bromocresol purple (đỏ tía bromocresol)

5.3.6.1 Thành phần

Nước đệm pepton (xem 5.2.5)	1 000 ml
Bromocresolpurple (dung dịch cồn 4 %, ví dụ: dung dịch etanol)	0,1 ml

5.3.6.2 Chuẩn bị

Cho 0,1 ml dung dịch bromocresol purple vào 1 000 ml nước đệm pepton (5.2.5).

5.3.6.3 Sử dụng

Dung dịch này có thể được dùng cho một số sản phẩm có tính axit mà việc điều chỉnh pH có thể được thực hiện không cần sử dụng que thử pH vô trùng (xem 8.3).

Bromocresol purple có màu vàng ở pH axit, chuyển sang màu đỏ tía khi pH trên 6,8.

5.4 Phân phối và khử trùng dung dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

5.5 Thủ hiệu năng để kiểm soát chất lượng

Tiến hành kiểm soát chất lượng của tất cả các dung dịch pha loãng trong quy định trong tiêu chuẩn này theo quy định đối với dung dịch muối pepton nêu trong TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

¹⁾ Đơn vị này (thường được gọi là đơn vị quốc tế hoặc đơn vị chuẩn) được xác định là lượng enzym xúc tác chuyển hóa 1 μ mol cơ chất mỗi phút trong các điều kiện chuẩn.

Ú	45 min ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C
Chủng:	<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 ^{a,2)} hoặc WDCM 00012 ^{a,2)} <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034 ²⁾
Môi trường kiểm soát:	TSA ở 37 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h
Phương pháp kiểm soát:	Định lượng
Giới hạn:	± 50 % định lượng ở t_0

^a Các chủng do phòng thử nghiệm sử dụng (tối thiểu)

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường cho mục đích chung [xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6507-1 (ISO 6887-1)] và cụ thể như sau:

6.1 **Bộ trộn quay hoặc bộ trộn kiểu nhu động.**

6.2 **Máy trộn vortex.**

6.3 **Bi thủy tinh, đường kính khoảng 6 mm.**

6.4 **Nồi cách thuỷ, có thể duy trì được ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C và 45 °C ± 1 °C.**

6.5 **Dao trộn hoặc đũa thủy tinh.**

6.6 **Bếp điện hoặc thiết bị gia nhiệt khác, có thể làm nóng nhẹ (không dùng đầu đốt) và có thể hoạt động ở nhiệt độ quy định.**

7 Chuẩn bị mẫu

7.1 **Sản phẩm đông lạnh**

Sản phẩm được bảo quản đông lạnh cần đưa về trạng thái phù hợp để lấy mẫu; nghĩa là bảo quản ở 18 °C đến 27 °C (nhiệt độ phòng thử nghiệm) tối đa là 3 h, hoặc ở 3 °C ± 2 °C tối đa là 24 h. Sau đó các mẫu được thử nghiệm càng sớm càng tốt. Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Nếu khi chia mẫu, sản phẩm vẫn còn đông lạnh thì có thể sử dụng một ít dung dịch pha loãng (Điều 5) ở nhiệt độ phòng thử nghiệm để làm tan băng.

²⁾ Thông tin thêm về số lượng chủng nuôi cấy và các đặc điểm tiếp xúc, xem catalo về chủng đối chứng có sẵn (được đưa ra ngày 19-07-2010) trên http://www.wfcc.nig.ac.jp/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.

7.2 Sản phẩm dạng cứng và sản phẩm khô

Trộn mẫu các sản phẩm dạng cứng trong bộ trộn kiểu nhu động (6.1), đựng mẫu và dung dịch pha loãng trong hai hoặc nhiều túi vô trùng để tránh mẫu làm thủng túi và có thể làm rò rỉ mẫu.

Đối với sản phẩm cứng hoặc sản phẩm khô, không đồng hóa mẫu trong bộ trộn quay trong thời gian nhiều hơn 2,5 min một lần.

Đối với các sản phẩm cứng và khô hoặc không đồng nhất, có thể phải xay hoặc nghiền mẫu phòng thử nghiệm. Trong trường hợp này, không xay hoặc nghiền quá 1 min để tránh nhiệt độ tăng quá cao.

7.3 Sản phẩm dạng lỏng và sản phẩm không sánh đặc

Trước khi phân tích, mẫu thử cần được lắc bằng tay hoặc bằng dụng cụ cơ học để đảm bảo rằng các vi sinh vật đã phân bố đều.

7.4 Sản phẩm không đồng nhất

Đối với các sản phẩm không đồng nhất (chứa nhiều phần của các thực phẩm khác nhau) thì việc lấy mẫu cần được thực hiện bằng cách lấy các ước số của từng thành phần đại diện cho các phần trong sản phẩm ban đầu.

Cũng có thể đồng hóa toàn bộ mẫu phòng thử nghiệm để lấy được mẫu thử đồng đều hơn.

Có thể cần phải xay hoặc nghiền mẫu phòng thử nghiệm. Trong trường hợp này, không xay hoặc nghiền quá 1 min để tránh nhiệt độ tăng quá cao.

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

Mọi việc chuẩn bị và các thao tác bằng tay cần được thực hiện với kỹ thuật vô trùng tốt và dùng dụng cụ vô trùng để tránh nhiễm vi sinh vật từ các nguồn bên ngoài vào mẫu. Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Nêu rõ quy trình đã sử dụng để phân tích trong báo cáo thử nghiệm nếu khác với quy trình mô tả trong tiêu chuẩn này.

8.2 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi thành phần trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể nào liên quan đến sản phẩm cần phân tích thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

8.3 Trường hợp chung đối với các sản phẩm có tính axit

Khi sử dụng huyền phù của các sản phẩm có tính axit thì cần đảm bảo pH được đưa về trung tính. Việc sử dụng dung dịch pha loãng với chất chỉ thị pH bổ sung (5.3.6) có thể tránh được việc dùng dụng cụ thử pH vô trùng; thêm natri hydroxit (NaOH) cho đến khi chất chỉ thị bắt đầu đổi màu.

Đối với việc sử dụng các dung dịch đậm pha loãng thì việc bổ sung NaOH là cần thiết để tăng khả năng đậm của thành phần kiềm. Nồng độ NaOH được bổ sung phụ thuộc vào độ axit của sản phẩm. Nồng độ thích hợp nhất (ví dụ, 0,1 mol/l hoặc 1 mol/l) là nồng độ gần với tỷ lệ 1 thể tích dung dịch NaOH : 9 thể tích dung dịch pha loãng.

8.4 Thực phẩm có hàm lượng chất béo cao (hàm lượng chất béo trên 20 % khối lượng)

Việc sử dụng dung dịch pha loãng với sorbitan monooleat [polysorbat 80³⁾] đã được bổ sung từ 1 g/l đến 10 g/l ước chừng theo hàm lượng chất béo (ví dụ: với hàm lượng chất béo 40 % thì bổ sung 4 g/l) có thể làm tăng nhũ hoá trong quá trình tạo huyền phù.

9 Cách tiến hành cụ thể

9.1 Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng

Trộn mẫu thử thật kỹ sao cho các vi sinh vật phân bố càng đều càng tốt bằng cách đảo chiều lọ chứa mẫu liên tục 25 lần. Tránh tạo bọt hoặc để bọt tan hết. Khoảng thời gian từ khi trộn đến khi lấy phần mẫu để thử không được quá 3 min.

Dùng pipet vô trùng lấy ít nhất 1 ml mẫu thử cho vào chín lần thể tích dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung. Lắc đều dung dịch pha loãng ban đầu này [ví dụ, lắc bằng tay 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong 7 s hoặc sử dụng máy lắc vortex (6.2) lắc từ 5 s đến 10 s] để thu được dung dịch pha loãng 10⁻¹.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.2 Sữa bột, whey bột ngọt, whey bột chua, buttermilk bột và lactose

Trộn kỹ lượng chứa trong lọ kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục.

Nếu mẫu thử đựng trong lọ kín còn nguyên, quá dày, khó lắc trộn thì nên chuyển sang lọ chứa lớn hơn rồi trộn đều. Mở nắp lọ chứa, dùng dao trộn lấy phần mẫu thử yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đậy ngay nắp lọ.

³⁾ Tween 80 là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này.

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình thuỷ tinh vô trùng (ví dụ như cốc có mỏ) và đỗ bột vào lọ pha loãng có chứa dung dịch pha loãng thích hợp (5.2) dùng cho mục đích chung. Đối với whey bột chua, sử dụng dung dịch dikali hydrophosphat (5.3.2) ở pH $8,4 \pm 0,2$ hoặc đối với sữa bột sấy màng thì sử dụng dung dịch natri xitrat (5.3.1) hoặc dikali hydrophosphat (5.3.2) ở pH $7,5 \pm 0,2$.

Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào lọ chứa dung dịch pha loãng.

CHÚ THÍCH Để hoà tan tốt hơn, đặc biệt đối với sữa sấy màng, nên sử dụng bì thuỷ tinh (6.3). Nếu sử dụng thì phải cho vào lọ trước khi khử trùng.

Để hoà tan mẫu thử, xoay từ từ lọ để làm ướt bột và sau đó lắc lọ 25 lần, với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 7 s. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.1) để thay cho việc lắc.

Để yên mẫu trong 5 min, thỉnh thoảng lắc.

Dung dịch pha loãng có thể được làm ấm trước đến 45°C nếu không thu được huyền phù đồng nhất sau khi trộn. Phần này được nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.3 Phomát và phomát chế biến

Cân 10 g mẫu thử trong đĩa và chuyển vào cốc đựng của máy trộn quay hoặc túi đựng của máy trộn kiểu nhu động (6.1). Cách khác, cân trực tiếp 10 g mẫu thử trong vật chứa.

Cho 90 ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (5.2) hoặc dung dịch pha loãng dùng cho phomat là 90 ml dung dịch natri xitrat (5.3.1) hoặc dung dịch dikali hydrophosphat (5.3.2) ở pH $7,5 \pm 0,2$.

Trộn cho đến khi phomat phân tán đều.

Để cho bột tan hết.

Dung dịch pha loãng có thể được làm ấm trước đến 45°C , nếu không thu được huyền phù đồng nhất sau khi trộn. Phần này được nêu rõ trong báo cáo thử nghiệm.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.4 Casein axit, casein lactic, casein rennet và caseinat

9.4.1 Trường hợp chung

Trộn kỹ lượng chứa bên trong vật chứa kín bằng cách lắc và đảo chiều vật chứa.

Cân 10 g mẫu thử cho vào túi bằng chất dẻo vô trùng của máy trộn kiểu nhu động (xem 6.1). Thêm 90 ml dung dịch pha loãng thích hợp ở nhiệt độ phòng như sau:

- a) đối với casein axit và casein lactic thì pha loãng bằng dung dịch kali hydrophosphat có chất chống tạo bọt (5.3.3) ở pH $8,4 \pm 0,2$;
- b) đối với trường hợp caseinat thì pha loãng bằng dung dịch xitrat (5.3.1) hoặc dung dịch kali hydrophosphat (5.3.2) ở pH $7,5 \pm 0,2$ hoặc dung dịch muối pepton (5.2.1);
- c) đối với casein rennet thì pha loãng bằng dung dịch kali hydrophosphat có chất chống tạo bọt (5.3.3) ở pH $7,5 \pm 0,2$.

Trộn kỹ bằng phương pháp thủ công và để yên 15 min ở nhiệt độ phòng. Trộn 2 min trong bộ trộn kiểu nhu động (6.1) sử dụng hai túi vô trùng đối với các sản phẩm dạng hạt, nếu cần. Để yên 5 min.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, theo Điều 10.

9.4.2 Trường hợp đặc biệt: casein rennet

Casein rennet có thể khó hòa tan. Có thể sử dụng quy trình thay thế cho 9.4.1.

Sử dụng dung dịch kali hydrophosphat có chất chống tạo bọt (5.3.3) làm dung dịch pha loãng cho casein rennet có thể không hiệu quả để hòa tan các hạt. Các hạt casein này có thể làm cản trở việc định lượng vi sinh vật ở 30°C . Do đó, nên sử dụng quy trình thay thế sau đây:

Nghiền nhão casein khô trước khi lấy phần mẫu thử, nếu cần. Cho khoảng 20 g mẫu thử vào vật chứa thích hợp. Nghiền bằng cách sử dụng thiết bị trộn có gắn lưỡi dao, có thể quay được ở 20 000 r/min, được lắp với thiết bị tránh làm tăng nhiệt của mẫu trong quá trình nghiền trộn⁴⁾.

Cân 5 g mẫu thử đã chuẩn bị như trên cho vào chai vô trùng 250 ml. Cho thêm các bi thuỷ tinh (6.3) để trộn và 95 ml dung dịch kali tripolyphosphat (5.3.4) đã được làm ấm đến 37°C . Để chai này lên máy trộn và trộn trong 15 min. Sau đó cho vào nồi cách thuỷ 15 min ở nhiệt độ 37°C trong khi vẫn trộn.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, theo Điều 10.

9.5 Bơ

Nếu cần phải loại lớp bề mặt của mẫu bơ thì tham khảo TCVN 6400 (ISO 707).

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình chứa. Đặt bình chứa vào nồi cách thuỷ (6.4) ở 45°C . Giữ trong nồi cách thuỷ cho đến khi tất cả mẫu thử vừa tan chảy hết.Thêm 90 ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (5.2) đã được làm ấm đến 45°C và trộn. Thao tác này rất dễ dàng khi thực hiện bằng máy trộn kiểu nhu động (6.1).

⁴⁾ Thiết bị VirTis là ví dụ về sản phẩm thích hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ẩn định sử dụng sản phẩm này.

Cách khác, chỉ sử dụng pha nước để pha loãng như sau:

Lấy 50 g mẫu thử có chứa tỷ lệ thể tích-khối lượng của nước $W\%$. Thêm $[50 - (50 \times W/100)]$ ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (5.2) đã được làm nóng trước đến 45°C trong nồi cách thuỷ (6.4). Trong các điều kiện này, 1 ml pha nước tương ứng với 1 g bơ.

CHÚ THÍCH: Đối với 50 g bơ chứa khoảng 16 % phần thể tích theo khối lượng nước, pha nước này là 8 ml chất lỏng. Thêm $[50 - (50 \times 16/100)] = 42$ ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung đã được làm nóng trước đến 45°C trong nồi cách thuỷ (6.4).

Đặt vật chứa này trong nồi cách thuỷ (6.4) ở 45°C cho đến khi bơ tan hết. Lấy vật chứa ra khỏi nồi cách thuỷ và lắc kỹ và để cho tách pha không quá 15 min. Nếu cần, dùng dao trộn hoặc đũa thuỷ tinh (6.12) để loại bỏ pha chất béo.

Để tách pha, chuyển phần mẫu đã tan chảy sang ống ly tâm vô trùng (hoặc làm tan trực tiếp phần mẫu thử trong ống này) và li tâm với tần số quay để tách pha, nếu cần. Có thể cần loại bỏ pha béo (phía trên) bằng ống nghiệm vô trùng được nối với bơm chân không. Dùng pipet hút từ lớp dưới đáy.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.6 Kem thực phẩm

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình cầu hoặc túi bằng chất dẻo vô trùng của máy trộn nhu động (6.1). Thêm 90 ml dung dịch pha loãng ở nhiệt độ phòng và trộn. Mẫu sẽ tan chảy trong quá trình trộn.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.7 Bánh custard, món tráng miệng và cream ngọt ($\text{pH} > 5$)

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình cầu (6.4) có chứa các bi thuỷ tinh (6.3). Thêm 90 ml dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (5.2) ở nhiệt độ phòng và lắc cho tan đều. Cách khác, dùng máy trộn kiểu nhu động (6.1) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trong trường hợp này, không cần phải cho thêm bi thuỷ tinh vào túi.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.8 Sữa lên men và cream chua ($\text{pH} < 5$)

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình cầu có chứa các bi thuỷ tinh (6.3). Thêm 90 ml dung dịch pha loãng là nước đậm pepton (5.2.5) hoặc dung dịch dikali hydrophosphat (5.3.2) ở nhiệt độ phòng với $\text{pH } 7,5 \pm 0,2$ và lắc bằng tay cho tan đều. Cách khác, có thể sử dụng máy trộn kiểu nhu động (6.1) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trong trường hợp này, không cần phải cho thêm bi thuỷ tinh vào túi.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

9.9 Sữa bột dành cho trẻ sơ sinh

Trộn kỹ lượng chứa trong hộp kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục. Nếu mẫu thử đựng trong hộp còn nguyên chưa mờ, quá đầy khó lắc thì nên chuyển sang lọ chứa lớn hơn rồi trộn đều. Mở nắp hộp. Dùng dụng dao trộn (6.5) lấy phần mẫu thử yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đậy ngay nắp hộp.

Cân 10 g mẫu thử cho vào lọ thủy tinh vô trùng thích hợp (ví dụ: cốc có mờ). Sau đó cho mẫu bột vào chai pha loãng có chứa dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (5.2) hoặc đối với các mẫu chứa hàm lượng tinh bột cao thì sử dụng dung dịch pha loãng dùng cho mục đích đặc biệt (5.3.5).

Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào chai đựng dung dịch pha loãng quy định.

Dung dịch pha loãng có thể được làm nóng trước đến 45 °C nếu không thu được huyền phù đồng nhất sau khi trộn. Điều này phải được đề cập đến trong phần báo cáo kết quả.

Để hòa tan tốt hơn, nên dùng bi thuỷ tinh (6.3). Nếu sử dụng thì phải cho vào chai trước khi khử trùng.

Để hòa tan mẫu thử, xoay từ từ chai để làm ướt bột và sau đó lắc chai, ví dụ 25 lần, với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 7 s. Cách khác, có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.1). Để yên 5 min, thỉnh thoảng lắc. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo Điều 10.

Các mẫu có chứa hàm lượng tinh bột cao có thể gặp khó khăn vì độ sánh của dung dịch pha loãng ban đầu cao.

Sử dụng dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (5.2) với dung dịch α-amylase (5.3.5) để giảm bớt độ sánh của dung dịch ban đầu hoặc dùng lượng dung dịch pha loãng lớn gấp đôi. Lấy dung dịch pha loãng tiếp theo này cho các lần kiểm tra tiếp.

10 Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Khi chuyển dung dịch pha loãng ban đầu sánh như casein axit hoặc casein rennet (9.4) thì tráng pipet vài lần bằng dung dịch pha loãng, sử dụng dung dịch pha loãng trong ống nghiệm đã dùng cho dung dịch pha loãng thập phân.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Nếu thực hiện bước này mà không tráng pipet khi chuyển dung dịch pha loãng ban đầu sánh thì không chuyển được lượng chính xác của dung dịch pha loãng ban đầu.

Khi đã lấy 10 ml cộng với 90 ml hoặc 11 ml cộng với 99 ml thì lắc bằng tay theo quy định trong 9.1.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 7002:1986, *Agricultural food products – Layout for a standard method of sampling from a lot*
 - [2] TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm*
 - [3] WEBB, E.C. *Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. Academic Press, London, 1992. 862 p. Update available (2009-09-30) at: <http://www.chem.qmul.ac.uk/inbmb/enzyme/index.html>
-