

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8182 : 2009

ISO 9232 : 2003

Xuất bản lần 1

**SỮA CHUA – NHẬN BIẾT CÁC VI SINH VẬT ĐẶC TRƯNG
(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và
Streptococcus thermophilus)**

Yogurt – Identification of characteristic microorganisms

*(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*)*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8182 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 9232 : 2003;

TCVN 8182 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biến soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất
lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa chua – Nhận biết các vi sinh vật đặc trưng (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*)

Yogurt – Identification of characteristic microorganisms

(*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định các phép thử đặc biệt nhận biết các vi sinh vật đặc trưng trong sữa chua bằng kỹ thuật dựa trên các đặc tính hình thái, sinh lý và nuôi cấy của chúng.

Phương pháp này có thể áp dụng cho các chủng được phân lập từ sữa chua khi có mặt và sống cả hai loại vi sinh vật đặc trưng.

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 6263 (ISO 8261), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật*.

TCVN 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn 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, dung dịch 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 8177 : 2009 (ISO 7889 : 2003), *Sữa chua – Định lượng các vi sinh vật đặc trưng – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C*.

3 Định nghĩa

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

Vi sinh vật đặc trưng trong sữa chua (characteristic microorganisms in yogurt)

Là *Lactibacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus*.

4 Nguyên tắc

4.1 Xác định các đặc trưng về sinh hóa, nuôi cấy và hình thái của *Lactibacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

4.2 Xác định các đặc trưng về sinh hóa, nuôi cấy và hình thái của *Streptococcus thermophilus*.

5 Môi trường cấy, dịch pha loãng và thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử được thuộc loại tinh khiết phân tích và nước phải là nước cất bằng thủy tinh hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có qui định khác. Nước được dùng để chuẩn bị các dung dịch enzym phải là nước cất hai lần bằng dung cụ thủy tinh. Xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6263 (ISO 8261). Đối với các vật liệu khác, xem TCVN 8177 : 2009 (ISO 7889 : 2003).

5.1 Môi trường nuôi cấy

Chỉ sử dụng môi trường nuôi cấy vừa mới chuẩn bị không được để tiếp xúc trực tiếp với ánh nắng. Nếu môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị mà chưa sử dụng ngay thì chúng phải được làm mát và được bảo quản ở từ 2 °C đến 4 °C trong không quá 1 tuần và dưới các điều kiện không làm thay đổi thành phần của môi trường, trừ khi có qui định khác. Cũng như đối với các thuốc thử, xem các điều kiện bảo quản qui định trong TCVN 6404 (ISO 7218).

5.1.1 Sữa già

5.1.1.1 Thành phần

Sữa già sấy phun, đã xử lý ở nhiệt độ thấp, không chứa các chất gây ức chế	100 g
Nước, đén	1 000 ml

5.1.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan sữa bột trong nước. Phân phối các lượng 10 ml dung dịch thu được vào các ống nghiệm 16 mm x 160 mm (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở 110 °C ± 1 °C trong 30 min hoặc ở 115 °C ± 1 °C

trong 20 min. Sau khi khử trùng và trước khi sử dụng, kiểm tra độ vô trùng bằng cách ủ các ống nghiệm này trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C trong 3 ngày.

5.1.2 Cảnh thang MRS

5.1.2.1 Thành phần

Pepton 1 (sản phẩm thủy phân tryptic của casein)	10,00 g
Chất chiết thịt	10,00 g
Chất chiết nấm men (khô)	5,00 g
Glucoza ($C_6H_{12}O_6$)	20,00 g
Tween 80 (sorbitan mono-oleat)	1,00 ml
Dikali hydro ortophosphat (K_2HPO_4)	2,00 g
Natri axetat ngâm ba phần từ nước ($CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$)	5,00 g
Diamoni xitrat [$C_6H_6O_7(NH_4)_2$]	2,00 g
Magie sulfat ngâm bảy phần từ nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,20 g
Mangan sulfat ngâm bốn phần từ nước ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,05 g
Nước, đến	1 000 ml

5.1.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên riêng rẽ trong nước sôi. Làm nguội trên nồi cách thủy (6.8) đến 50 °C. Chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là $6,5 \pm 0,2$ ở $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ bằng cách thêm thuốc thử (5.2) và kiểm tra bằng máy đo pH (6.4).

Chuyển các lượng 20 ml môi trường thu được này sang các ống nghiệm 20 mm x 200 mm (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ trong 15 min.

CHÚ THÍCH Khi sử dụng môi trường MRS có bán sẵn, của các nhà sản xuất khác nhau có thể cho các kết quả thu được khác nhau. Do đó, nếu sử dụng môi trường MRS được chuẩn bị sẵn thì cần kiểm tra lại theo môi trường được chuẩn bị theo tiêu chuẩn này.

5.1.3 Môi trường cơ bản cho các phép thử lên men

5.1.3.1 Thành phần

Sử dụng các thành phần như trong 5.1.2.1 đối với cảnh thang MRS, nhưng không dùng chất chiết thịt và glucoza.

5.1.3.2 Chuẩn bị

Chuẩn bị thành phần cơ bản theo 5.1.2.2 đối với canh thang MRS, sử dụng các thành phần trong 5.1.3.1 và chỉnh pH sao cho sau khử trùng, pH là $6,95 \pm 0,05$ thay cho $6,5 \pm 1$ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.1.4 Môi trường nuôi cấy để sản sinh CO_2

5.1.4.1 Thành phần

Sử dụng thành phần như trong 5.1.2.2 đối với canh thang MRS, nhưng không dùng chất chiết thịt và thay 20 g glucoza bằng 50 g glucoza.

5.1.4.2 Chuẩn bị

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy như trong 5.1.2.2 đối với canh thang MRS, sử dụng các thành phần trong 5.1.4.1 và chỉnh pH sao cho sau khử trùng, pH là $6,95 \pm 0,05$ thay cho $6,5$ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Chuyển các lượng 10 ml thay cho 20 ml (như qui định trong 5.1.2.2) của môi trường thu được vào các ống nghiệm 16 mm x 160 mm (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

5.1.5 Thạch để phù

5.1.5.1 Thành phần

Thạch dùng cho phân tích vi khuẩn	20 g
Nước, đèn	1 000 ml

5.1.5.2 Chuẩn bị

Hòa tan thạch trong nước. Phân phối các lượng 10 ml dung dịch thu được vào các ống nghiệm 16 mm x 160 mm (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

5.1.6 Sữa quỳ (lilmus milk)

5.1.6.1 Thành phần

Bột quỳ	0,70 g
Sữa gầy (5.1.1), đèn	1 000 ml

5.1.6.2 Chuẩn bị

Chuẩn bị sữa quỳ như trong 5.1.1.2 đối với sữa gầy, sử dụng các thành phần như trong 5.1.6.1.

CHÚ THÍCH Bột quỳ hoặc sữa bột gầy với quỳ có bán sẵn trên thị trường.

5.1.7 Cảnh thang M17

5.1.7.1 Môi trường cơ bản

5.1.7.1.1 Thành phần

Pepton 1 (sản phẩm thủy phân tryptic của casein)	2,50 g
Pepton 2 (sản phẩm thủy phân peptic của thịt)	2,50 g
Pepton 3 (sản phẩm thủy phân papain của đậu tương)	5,00 g
Chất chiết nấm men (khô)	2,50 g
Chất chiết thịt	5,00 g
β -Glycerophosphat (muối dinatri) ($C_3H_7O_8PNa_2$)	19,00 g
Mangan sulfat ngậm bảy phân tử nước ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,25 g
Axit ascorbic ($C_6H_8O_6$)	0,50 g
Nước, đén	950 ml

5.1.7.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên riêng rẽ trong nước sôi. Làm nguội trên nồi cách thủy (6.8) đến 50 °C. Chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là $6,8 \pm 0,2$ ở $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ bằng cách thêm thuốc thử (5.2) và kiểm tra bằng máy đo pH (6.4).

Chuyển các lượng 19 ml môi trường thu được này sang các ống nghiệm 20 mm x 200 mm (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ trong 15 min.

5.1.7.2 Dung dịch lactoza

5.1.7.2.1 Thành phần

Lactoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	10 g
Nước, đén	100 ml

5.1.7.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan lactoza trong nước. Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ trong 15 min.

5.1.7.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.1.7.3.1 Thành phần

Dung dịch lactoza (5.1.7.2)	1 ml
Môi trường cơ bản (5.1.7.1)	19 ml

5.1.7.3.2 Chuẩn bị

Ngay trước khi sử dụng, cho dung dịch lactoza vào môi trường cơ bản (5.1.7.1) đựng trong các ống nghiệm. Xoay bình để trộn.

CHÚ THÍCH Khi sử dụng môi trường M 17 có bán sẵn, thi các kết quả thu được từ các môi trường do các nhà cung cấp khác nhau có thể khác nhau đáng kể. Do đó, các môi trường M17 này cần được kiểm tra dựa vào các môi trường được chuẩn bị theo tiêu chuẩn này.

5.1.8 Môi trường nuôi cấy khi có chứa NaCl 6,5 %

5.1.8.1 Thành phần

Sử dụng thành phần như trong 5.1.7.1.1 đối với canh thang M17, nhưng thay 19 g thành phần β-Glycerophosphat bằng 65 g muối natri clorua (NaCl).

5.1.8.2 Chuẩn bị

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy như trong 5.1.7.1.2 đối với canh thang M17, nhưng phân phối các lượng 10 ml thay cho 19 ml (như trong 5.1.7.1.2) môi trường thu được vào các ống nghiệm 16 mm x 160 mm (6.5). Khử trùng bằng hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

5.2 Thuốc thử để điều chỉnh pH

5.2.1 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

5.2.2 Axit clohydric loãng, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

5.3 Thuốc nhuộm, dung dịch xanh metylen trong etanol, 6 g/l.

5.4 Thuốc thử phản ứng catalaza, hydro peroxit (H_2O_2), 1,5 % (thể tích).

6 Thiết bị, dụng cụ

Khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, với dịch pha loãng, với dung dịch hoặc môi trường nuôi cấy phù hợp với yêu cầu của TCVN 6263 (ISO 8261). Các dụng cụ thủy tinh phải bén với việc khử trùng nhiều lần.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh (xem TCVN 6404 (ISO 7218) và cụ thể như sau:

6.1 Tủ ấm, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2 Máy xoay trộn ống nghiệm, ví dụ: máy trộn Vortex.

6.3 Thau kính phóng đại, phóng đại được từ 8 lần đến 10 lần.

6.4 Máy đo pH, có bù nhiệt, có độ chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

6.5 Ống nghiệm, có nắp đậy hoặc nút bằng cao su, kích thước 16 mm x 160 mm và 20 mm x 200 mm, để đựng môi trường nuôi cấy.

6.6 Pipet chia độ, dùng cho vi sinh vật, được khử trùng và hiệu chuẩn toàn dải đo, có thể phân phối được $1\text{ ml} \pm 0,02\text{ ml}$ và $10\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$ [xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1)].

Trước khi khử trùng có thể sử dụng pipet làm bằng hợp chất nhân tạo thay cho pipet thuỷ tinh.

6.7 Đũa thủy tinh.

6.8 Nồi cách thuỷ, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, từ 44°C đến 47°C , $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và ở $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và có thể ở nhiệt độ sôi.

7 Cách tiến hành

7.1 Phân lập khuẩn lạc

Chọn các khuẩn lạc từ các đĩa được dùng để đếm, thu được trong TCVN 8177 : 2009 (ISO 7889 2003), bằng cách sử dụng thau kính phóng đại (6.3), nếu cần. Cấy vào canh thang qui định để thu được khuẩn lạc thuần khiết sau khi ủ. Ủ trong tủ ấm (6.1) ở 37°C trong 24 h, dưới các điều kiện không khí qui định trong TCVN 8177 : 2009 (ISO 7889 : 2003).

7.2 Các đặc trưng kiểu hình cần để nhận biết *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

7.2.1 Môi trường nuôi cấy

7.2.1.1 Sử dụng sữa gầy (5.1.1) và canh thang MRS (5.1.2) đối với các dịch cấy thông thường và các phép thử sinh lý, như sau.

7.2.1.2 Đối với các phép thử lên men, sử dụng bộ kit thử có bán sẵn thích hợp cho mục đích này với các vi sinh vật cần nghiên cứu. Tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất một cách chính xác.

CHÚ THÍCH Môi trường cơ bản đối với các phép thử lên men (5.1.3) được cung cấp cùng bộ kit thử chẩn đoán được sử dụng để chuẩn bị chất cấy khuẩn lạc.

7.2.2 Các đặc tính cần xem xét

7.2.2.1 Hình thái

Sử dụng các dịch cấy thuần khiết mới được chuẩn bị trong vòng 24 h phát triển trong sữa gầy (5.1.1) trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C trong 24 h. Nhuộm màu các dịch cấy này bằng xanh metylen (5.3) trong vài phút trước khi lấy để kiểm tra dưới kính hiển vi. Về hình dạng và cách sắp xếp tế bào, xem Bảng A.1 trong Phụ lục A. Trong các tế bào phải nhìn thấy các hạt volutin.

7.2.2.2 Phản ứng catalaza

Trộn các thể tích bằng nhau của dịch cấy canh trang MRS (xem 7.1), đã được Ủ trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C từ 18 h đến 24 h với hydro peroxit 1,5 % trong ống nghiệm (6.5) và đậy nút cao su. Đồng thời chuẩn bị canh thang kiểm chứng không được cấy.

Lật ngược ống nhẹ nhàng một lần để trộn và quan sát bọt khí oxi hình thành trong canh thang ở nhiệt độ phòng sau 20 min. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không sinh khí oxi. Phép thử là âm tính nếu có sinh khí trong ống kiểm chứng.

7.2.2.3 Phát triển trong canh thang ở 15 °C và 45 °C

Sử dụng một giọt dịch cấy của chủng thử nghiệm, đã Ủ trong canh thang MRS (xem 7.1) trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C trong 18 h đến 24 h, để cấy vào hai canh thang MRS mới (5.1.2.2). Một canh thang trước đó cần được đưa về 15 °C trên nồi cách thủy (6.8) và canh thang còn lại được đưa về 45 °C trên một nồi cách thủy khác. Ủ một canh thang trong tủ ấm (6.1) ở 15 °C và canh thang còn lại ở 45 °C đến 7 ngày. Quan sát độ đục của *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không phát triển ở 15 °C và có phát triển ở 45 °C cho thấy đục.

7.2.2.4 Sinh khí CO₂

Cấy vào 10 ml môi trường nuôi cấy (5.1.4) 0,1 ml chủng cấy canh thang MRS của chủng thử nghiệm (xem 7.1) đã được Ủ trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C từ 18 h đến 24 h. Không để dịch cấy bị nhiễm bẩn phía trên canh thang bên trong ống nghiệm. Phủ trên bề mặt canh thang bằng một lớp thạch phủ (5.1.5) dày khoảng 1 cm đã được làm tan chảy, được làm nguội đến 47 °C ± 1 °C. Ủ 1 tuần trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C. Sự có mặt khí là bằng chứng khi lớp thạch tách khỏi lượng chứa phía dưới. Dưới các điều kiện này thì *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không sinh khí.

7.2.2.5 Lên men các loại đường

Để chuẩn bị dịch cấy và đọc kết quả, cần thực hiện các hướng dẫn về bộ kit thử chẩn đoán.

7.2.2.6 Xác định các chất đồng phân đối ảnh (đồng phân quang học) axit lactic trong dịch cấy của sữa

7.2.2.6.1 Yêu cầu chung

Khi sử dụng các bộ kit thử chẩn đoán có bán sẵn, cần tuân theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

7.2.2.6.2 Chuẩn bị

Cây truyền liên tiếp hai lần dịch cấy thuần khiết của chủng thử nghiệm trong sữa già đã hấp áp lực (5.1.1) bằng cách ủ trong tủ ấm (6.7) để ở 37 °C cho đến khi dịch cấy kết thành khối (khoảng 16 h). Kiểm tra dịch cấy bằng kính hiển vi về độ thuần khiết sử dụng các đốm đã nhuộm xanh metylen (5.3) [xem 9.2 của TCVN 8177 : 2009 (ISO 7889 : 2003)]. Cây truyền lần thứ ba trong sữa già đã hấp áp lực (5.1.1), sử dụng 0,1 ml chất cấy. Ủ tiếp 48 h trong tủ ấm (6.7) để ở 37 °C. Sau khi kiểm tra bằng kính hiển vi về độ thuần khiết, đồng hóa lượng chua trong ống nghiệm bằng đũa thủy tinh (8.7). Dưới các điều kiện này, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tạo ra trên 95 % axit D(-) lactic. Do đó, nên xác định hàm lượng axit lactic và chất đồng phân đối ảnh lactat trong các dịch cấy mẫu theo phương pháp trong Phụ lục B.

7.2.2.6.3 Phương pháp tính

Tính hàm lượng axit D(-) lactic của mẫu, theo công thức sau:

$$w_{D(-)} = \frac{C_{D(-)}}{C_{D(-)} + C_{L(+)}} \times 100\%$$

trong đó

$w_{D(-)}$ là phần trăm khối lượng của dạng D(-) trong hàm lượng axit lactic tổng số của mẫu;

$C_{D(-)}$ là phần khối lượng của axit D(-) lactic, tính bằng phần trăm (%);

$C_{L(+)}$ là phần khối lượng của axit L(+) lactic, tính bằng phần trăm (%).

7.2.2.6.4 Biểu thị kết quả

Biểu thị các kết quả thu được đến hai chữ số thập phân.

7.3 Các đặc trưng kiểu hình yêu cầu để nhận biết *S. thermophilus*

7.3.1 Môi trường nuôi cấy

Đối với các dịch cấy thông thường và các phép thử sinh lý, thi sử dụng sữa quỳ (5.1.6.2) và canh thang M 17 (5.1.7.1.2).

7.3.2 Các đặc trưng cần được xem xét

7.3.2.1 Hình thái

TCVN 8182 : 2009

Sử dụng các dịch cây sữa quỳ vừa mới chuẩn bị (5.1.6.2). Nhuộm tiêu bản dịch cây bằng xanh metylen (5.3) trong vài phút trước khi được kiểm tra dưới kính hiển vi. Đối với hình dạng và cách bố trí tế bào, xem Bảng A.2.

7.3.2.2 Phản ứng catalaza

Xem 7.2.2.2.

Dưới các điều kiện này các *S. thermophilus* sẽ không sinh oxi. Xem Bảng A.2.

7.3.2.3 Phát triển trong sữa quỳ ở 10 °C và 45 °C

Cấy vào các ống nghiệm chứa sữa quỳ (5.1.6.2) một giọt dịch cây canh thang M 17 (xem 7.1) của các chủng cản thử nghiệm đã được ủ qua đêm trong tủ âm (6.1) ở 37 °C. Giữ các ống nghiệm có liên quan trong tủ âm ở 10 °C và các ống nghiệm khác để trong các tủ âm khác ở 45 °C đến 7 ngày. Ở nhiệt độ 10 °C ± 1 °C *S. thermophilus* sẽ không đổi màu sữa quỳ, nhưng ở 45 °C ± 1 °C thì thay đổi theo mẫu Acr (7.3.2.4) (xem Bảng A.2).

7.3.2.4 Phản ứng trong sữa quỳ (Acr = axit hóa, ngưng tụ, khử)

Sữa quỳ được axit hóa bởi *S. thermophilus* thành màu hồng và sau đó đóng tụ. Sau khi đóng tụ vẫn giữ màu hồng do quỳ khử chậm và phần lớn không hoàn toàn với vòng phía trên có màu đậm hơn (xem Bảng A.2).

7.3.2.5 Phát triển khi có mặt của natri clorua

Cấy vào các ống nghiệm chứa môi trường nuôi cây (5.1.8.2) với một giọt dịch cây canh thang M 17 (xem 7.1) của các chủng cản thử nghiệm đã được ủ qua đêm trong tủ âm ở 37 °C. Giữ các ống nghiệm đến 7 ngày trong tủ âm (6.2) ở 37 °C. Dưới các điều kiện này, không xuất hiện đục với *S. thermophilus* (xem Bảng A.2).

7.3.2.6 Sử dụng đường

Bảng A.1 cho thấy phần lớn các loại đường có giá trị để phân biệt *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* với các loài khác thuộc nhóm phân loài của lactobacilli lên men đồng hình bắt buộc. Kiểm tra dài thử nghiệm có bán sẵn đã được nuôi cây về các phản ứng với đường theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

8 Biểu thị kết quả

8.1 So sánh các kết quả thử nghiệm thu được trong 7.2 với các thuộc tính cơ bản của *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* như trong Bảng A.1.

8.2 So sánh các kết quả thử nghiệm thu được trong 7.3 với các thuộc tính cơ bản của *S. thermophilus* như trong Bảng A.2.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Qui định)

Các bảng thuộc tính cơ bản

**Bảng A.1 – Các thuộc tính cơ bản của *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,
L. delbrueckii subsp. *Lactis*, *L. helveticus* và *L. acidophilus***

Thuộc tính	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. acidophilus</i>
Hình thái học	Hình que có đầu tròn. Thay đổi theo thời gian, môi trường, chủng. Nhiều cá thể đổi màu trong các tế bào của chủng cây được nhuộm xanh metylen lâu ngày.	Nhu đổi với <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Hiện tượng nhiều hình thái của các dịch cây lâu ngày không được đánh dấu là <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> và <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i> . Không có các cá thể đổi màu.	Hình que có các đầu tròn, đơn lẻ hoặc ghép thành cặp hoặc chuỗi ngắn. Không có các cá thể đổi màu.
Phản ứng catalaza	-	-	-	-
Sinh CO ₂ từ glucoza	-	-	-	-
Phát triển ở 15 °C ± 1 °C	-	-	-	-
Phát triển ở 45 °C ± 1 °C	+	+	+	+
Các đường đã lên men				
Fructoza	+	+	+/-	+
Galactoza	-	+/-	+	+
Glucoza	+	+	+	+
Lactoza	+	+	+	+
Maltoza	-	+	+/-	+
Mannoza	+/-	+	+/-	+
Sacaroza	-	+	-	+
Trehaloza	-	+	+/-	+/-
Gluconat	-	-	-	-
Xellobioza	-	-	-	+
Esculin	-	-	-	+
Chất đồng phản đối ánh axit lactic	D(-)	D(-)	DL	DL
+ = phản ứng dương tính đối với 90 % hoặc nhiều hơn các chủng.				
- = phản ứng âm tính đối với 90 % hoặc nhiều hơn các chủng.				
+/- = phản ứng thay đổi, yếu, chậm hoặc âm tính.				
Các mẫu lên men đường này liên quan đến các kết quả có thể đạt được với kit thử chẩn đoán có bán sẵn để nhận biết vi khuẩn axit lactic. Xem Phụ lục B.				

Bảng A.2 – Các thuộc tính cơ bản của *S. thermophilus*

Thuộc tính	Vẻ bên ngoài	Chú ý
Hình thái học	Các tế bào hình cầu hoặc hình trứng kết thành cặp hoặc thành chuỗi dài, nhiều hình thái khỏe trong các tế bào lâu ngày	
Phản ứng catalaza	-	
Phát triển ở $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	-	Lactococci mọc ở 10°C .
Phát triển ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$	+	Lactococci không mọc ở 45°C . Nhóm D streptococci mọc ở 10°C và 45°C .
Phản ứng trên sữa quy		
– axit hóa nhanh	A	Lactococci và nhóm D streptococci phản ứng RAC.
– ngưng tụ	C	
– rất chậm và thường không hoàn toàn		
Khử quy	R	
Phát triển khi có mặt NaCl (6,5 %)	-	<i>S. thermophilus</i> rất nhạy với NaCl Nhóm D streptococci có thể mọc khi có mặt NaCl 6,5 %.

+ = phản ứng dương tính đối với 90 % hoặc nhiều hơn các chủng.
- = luôn phản ứng âm tính.

Phụ lục B

(Qui định)

Dịch cấy sữa vi khuẩn axit lactic – Xác định hàm lượng axit lactic và chất đồng phân đối ảnh lactat

B.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này qui định phương pháp enzym để xác định các chất đồng phân đối ảnh (đồng phân quang học) của axit lactic và các lactat. Phương pháp này có thể áp dụng cho các chủng sữa gầy của lactobacilli được phân lập từ sữa chua.

CHÚ THÍCH Phương pháp này được soạn thảo dựa trên các kết quả của phép thử vòng, khi thay các phép thử sinh hóa riêng lẻ (B.4.6 đến B.4.9) bằng tổ hợp phép thử thích hợp có bán sẵn.

B.2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong Phụ lục này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

B.2.1

Hàm lượng axit lactic và các chất đồng phân đối ảnh lactat trong dịch cấy sữa của *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (content of lactic acid and lactates enantiomers of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)

Phần khối lượng của các chất xác định được bằng qui trình qui định trong phụ lục này.

CHÚ THÍCH Các hàm lượng này được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

B.3 Nguyên tắc

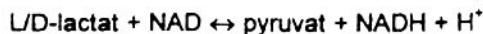
B.3.1 Các dịch cấy mẫu được chuẩn bị trong sữa gầy đã được hấp áp lực. Chuẩn bị dung dịch pha loãng thích hợp của các mẫu và cho kết tủa các protein và chất béo, sau đó lọc. Xử lý dịch lọc với các enzym và các chất sinh hóa sau đây, thêm cùng một lúc nhưng theo thứ tự sau:

a) L-lactat dehydrogenaza (L-LDH, EC 1.1.1.27) hoặc D-lactat dehydrogenaza (D-LDH, EC 1.1.1.28) trong sự có mặt của nicotinamid adenin dinucleotid (NAD) để oxi hóa lactat thành pyruvat và chuyển NAD thành dạng khử của nó (NADH);

b) glutamat-pyruvat transaminaza (GPT, EC 2.6.1.2) trong sự có mặt của L-glutamat để chuyển pyruvat về L-alanin và chuyển L-glutamat thành α -ketoglutarat.

B.3.2 Hàm lượng NADH được xác định đo phô bằng cách đọc độ hấp thụ của dung dịch thử ở 340 nm.

B.3.3 Hàm lượng axit lactic và các chất đồng phân đổi ảnh lactat được đo bằng lượng pháp với lượng NADH theo các phản ứng sau đây:



B.4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử được thuộc loại tinh khiết phân tích và nước phải là nước cất bằng thủy tinh hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có qui định khác. Nước được dùng để chuẩn bị các dung dịch enzym phải là nước cất hai lần bằng dung cụ thủy tinh. Xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6263 (ISO 8261).

B.4.1 Dung dịch kali hexaxanoferat (II) ngâm ba phần tử nước ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

Hòa tan 3,6 g kali hexaxanoferat (II) ngâm ba phần tử nước ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml (B.5.5). Thêm nước đến vạch và trộn.

B.4.2 Dung dịch kẽm sulfat

Hòa tan 7,2 g kẽm sulfat ngâm bảy phần tử nước ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) trong nước đựng trong bình định mức một vạch 100 ml (B.5.5). Thêm nước đến vạch và trộn.

B.4.3 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

Hòa tan 0,4 g natri hydroxit trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml (B.5.5). Thêm nước đến vạch và trộn.

B.4.4 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol/l}$

Hòa tan 40 g natri hydroxit (NaOH) trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml (B.5.5). Thêm nước đến vạch và trộn.

B.4.5 Dung dịch đậm đến pH 10,0: $c(\text{glyxylglyxin}) = 0,6 \text{ mol/l}$; $c(\text{L-glutamat}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Hòa tan 4,75 g glyxylglyxin và 0,88 g axit L-glutamic trong khoảng 50 ml nước trong bình nón (B.5.4). Chỉnh pH đến 10,0 bằng khoảng 4,6 ml dung dịch natri hydroxit 10 mol/l (B.4.4) và thêm nước đến 60 ml. dung dịch này có thể bền được 3 tháng khi được bảo quản ở 4 °C.

B.4.6 Dung dịch nicotinamide-adenine dinucleotide, $c(\text{NAD}) = 47 \text{ mmol/l}$

Hòa tan 420 mg NAD với 12 ml nước trong bình nón (B.5.4). Dung dịch này có thể bền 3 tuần khi được bảo quản ở 4 °C.

B.4.7 Glutamat-pyruvat transaminaza, $c(\text{GPT}) = 20 \text{ mg/ml}$

Ly tâm 2 ml huyền phù GPT trong máy ly tâm (B.5.1) với tần số quay khoảng 4000 min^{-1} trong 10 min. Hút và loại bỏ 1,0 ml phần nổi phía trên trong suốt. Huyền phù GPT thu được này có thể bền 1 năm khi được bảo quản ở 4°C .

B.4.8 Dung dịch L-lactat dehydrogenaza, $c(\text{L-LDH}) = 10 \text{ mg/ml}$

Chỉ sử dụng dung dịch L-lactat dehydrogenaza không pha loãng. Dung dịch này có thể bền 1 năm khi được bảo quản ở 4°C .

B.4.9 Dung dịch D-lactat dehydrogenaza, $c(\text{D-LDH}) = 5 \text{ mg/ml}$

Chỉ sử dụng dung dịch D-lactat dehydrogenaza không pha loãng. Dung dịch này có thể bền 1 năm khi được bảo quản ở 4°C .

B.5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể như sau:

B.5.1 Máy ly tâm, có tần số quay ở $4\,000 \text{ min}^{-1}$.

B.5.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 10 mg.

B.5.3 Ống nghiệm, có nắp đậy hoặc nút bằng cao su, kích thước $20 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$.

B.5.4 Bình nón, dung tích 25 ml, 50 ml và 150 ml.

B.5.5 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml.

B.5.6 Pipet, có thể phân phối 5 ml, 1 ml, 0,2 ml, 0,05 ml và 0,02 ml.

B.5.7 Pipet chia độ, dung tích 5 ml, có các vạch chia 0,1 ml.

B.5.8 Phễu lọc, đường kính khoảng 7 cm.

B.5.9 Giấy lọc gấp nếp, loại trung bình, đường kính khoảng 15 cm, không chứa axit lactic và lactat.

B.5.10 Đũa thủy tinh.

B.5.11 Cánh khuấy bằng chất dẻo, có thể trộn được lượng chứa trong cuvet đo phô.

B.5.12 Máy đo phô, có thể đo ở 340 nm.

B.5.13 Cuvet UV sử dụng một lần, có chiều dài đường quang 1 cm.

B.6 Chuẩn bị mẫu thử

B.6.1 Chuẩn bị các dịch cấy theo 7.2.2.6.

B.6.2 Chuẩn bị "mẫu trắng" bằng cách cấy trong ống nghiệm của sữa gầy đã hấp áp lực đã chuẩn bị theo 5.1.1 với 1 % nước tiệt trùng. Ủ trong tủ ấm (6.1) ở 37 °C trong 48 h.

B.6.3 Bảo quản dịch cấy mẫu đã chuẩn bị (B.6.1) đông lạnh hoặc đông lạnh sâu cho đến khi phân tích.

B.7 Cách tiến hành

CHÚ Ý – Tránh làm nhiễm bẩn, đặc biệt là do đồ mòn hôi vì sẽ chứa axit L(+) lactic. Chú ý không chạm vào đầu tip của pipet, đũa bằng chất dẻo, giấy lọc... Nên sử dụng găng tay bằng chất dẻo.

B.7.1 Phân mẫu thử

Cân 2,00 g dịch cấy mẫu (B.6.3), chính xác đến 10 mg trong bình định mức (B.5.5).

B.7.2 Phép thử trắng

Tiến hành phép thử trắng trên "mẫu trắng" đã chuẩn bị trong B.6.2 trên mỗi lô mới của bột sữa gầy được sử dụng. Tiến hành theo B.7.1, B.7.3 và B.7.4, sử dụng tất cả các thuốc thử nhưng không dùng phân mẫu thử.

Sử dụng công thức để tính (xem B.8).

B.7.3 Khử protein

B.7.3.1 Cho vào phân mẫu thử (B.7.1) 50 ml nước và thứ tự như sau: 5,0 ml dung dịch kali hexaxyanoferat (II) (B.4.1), 5,0 ml dung dịch kẽm sulfat (B.4.2) và 10,0 ml dung dịch natri hydroxit (B.4.3), xoay bình để trộn sau mỗi lần thêm. Pha loãng bằng nước đến vạch 100 ml và trộn. Để yên hỗn hợp trong 30 min.

B.7.3.2 Lọc qua giấy lọc (B.5.9), loại bỏ vài mililit dung dịch lọc đầu tiên. Dịch lọc màu trắng đục có thể được sử dụng để thử nghiệm.

B.7.4 Phương pháp xác định

B.7.4.1 Yêu cầu chung

Lượng axit L(+) hoặc D(-) lactic và lactat có trong cuvet (B.5.13) cần dao động trong khoảng từ 2 µg đến 20 µg. Do đó, dung dịch cần được pha loãng đủ để có được các dung dịch mẫu có nồng độ đồng phân đối ứng L(+) hoặc D(-) từ 0,02 g/l đến 0,2 g/l.

B.7.4.2 Xác định axit L(+) lactic và lactat

Dùng pipet cho vào mỗi cuvet UV dùng một lần (B.5.13) như sau:

Dung dịch đậm (B.4.5)	1,00 ml
NAD (B.4.6)	0,20 ml
GPT (B.4.7)	0,02 ml
Nước	0,90 ml

Sau đó, cứ sau một khoảng thời gian nhất định (ví dụ: 30 s), thêm 0,10 ml nước (trắng) hoặc mẫu trắng (B.6.2), hoặc dịch cấy mẫu thử (B.6.1). Dùng cánh khuấy bằng chất dẻo (B.5.11) trộn kỹ.

Đọc độ hấp thụ của từng dung dịch dựa vào không khí (A_1) sau 5 min. Bắt đầu cho phản ứng enzym bằng cách thêm 0,02 ml L-LDH (B.4.9) vào từng cuvet tại các khoảng thời gian nhất định (ví dụ 30 s). Trộn kỹ. Khi kết thúc phản ứng (sau 10 min), đọc lại độ hấp thụ của từng dung dịch (A_2).

Tính chênh lệch độ hấp thụ ($A_2 - A_1$) đối với mẫu trắng (ΔA_b), với phép thử mẫu trắng (ΔA_{sb}) (B.6.2) và mẫu thử (ΔA_s) (B.6.1).

Lấy chênh lệch độ hấp thụ của từng phép thử mẫu trắng và phép thử trắng trừ đi chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng như sau:

$$A_{L(+)} = \Delta A_s - \Delta A_b$$

$$A_{sb} = \Delta A_{sb} - \Delta A_b$$

B.7.4.3 Xác định axit D(-) lactic và lactat

Dùng pipet lấy các lượng như nhau của các thành phần theo qui trình B.7.4.2 đến khi trộn bằng cánh trộn bằng chất dẻo.

Đọc độ hấp thụ của từng dung dịch dựa vào không khí (A_1) sau 5 min. Bắt đầu cho phản ứng enzym bằng cách thêm 0,05 ml D-LDH (B.4.9) vào từng cuvet tại các khoảng thời gian nhất định (ví dụ 30 s). Trộn kỹ. Khi kết thúc phản ứng (sau 30 min), đọc lại độ hấp thụ của từng dung dịch (A_2).

Tính chênh lệch độ hấp thụ ($A_2 - A_1$) đối với mẫu trắng (ΔA_b), với phép thử mẫu trắng (ΔA_{sb}) (B.6.2) và mẫu thử (ΔA_s) (B.6.1).

Lấy chênh lệch độ hấp thụ của từng phép thử mẫu trắng và phép thử trắng trừ đi chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng như sau:

$$A_{D(-)} = \Delta A_s - \Delta A_b$$

$$A_{sb} = \Delta A_{sb} - \Delta A_b$$

B.8 Tính và biểu thị kết quả

B.8.1 Tính

Tính nồng độ, C, của axit L(+) hoặc D(-) lactic trong chủng cây, theo công thức sau:

$$C = \frac{V_1 \times M_r \times d \times 100}{m \times \varepsilon \times l_p \times V_2 \times 10000} \times A$$

Trong đó

C là hàm lượng axit L(+) hoặc D(-) lactic trên 100 g chủng cây, tính bằng gam (g);

V_1 là thể tích cuối cùng, tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích của mẫu, tính bằng mililit (ml);

M_r là khối lượng phân tử tương đối của chất cần phân tích;

A là độ hấp thụ đọc được của từng dung dịch (B.7.4.2 và B.7.4.3) dựa vào không khí;

l_p là chiều dài đường quang, tính bằng centimet (cm);

ε là hệ số hấp thụ phân tử của NADH ở 340 nm, bằng 6,3 [$\text{l.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$];

m là khối lượng phần mẫu thử (B.7.1) hoặc mẫu trắng (B.7.2), tính bằng gam (g);

d là hệ số pha loãng.

Đối với axit L(+) lactic trong mẫu:

$$C_{L(+)} = \frac{d \times 2,24 \times 90,1 \times 100}{m \times \varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 10000} \times A_{L(+)}$$

$$C_{L(+)} = \frac{d \times 20,18}{m \times \varepsilon} \times A_{L(+)}$$

Trong đó $C_{L(+)}$ là hàm lượng axit L(+) lactic, tính bằng gam trên 100 g dịch cây mẫu (B.6.1).

Đối với axit L(+) lactic trong mẫu trắng:

$$C_{sb} = \frac{d \times 20,18}{m \times \varepsilon} \times A_{sb}$$

Trong đó C_{sb} là hàm lượng axit L(+) lactic, tính bằng gam trên 100 g mẫu trắng (B.6.2).

TCVN 8182 : 2009

Lấy nồng độ của từng dịch cấy mẫu (C'_s) trừ đi nồng độ mẫu trắng (C'_{sb}) để điều chỉnh về L-lactat có mặt trong cơ chất:

$$C'_{L(+)} = C'_s - C'_{sb}$$

Tương tự, đối với axit D(-) lactic trong mẫu:

$$C_{D(-)} = \frac{d \times 2,27 \times 90,1 \times 100}{m \times \varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 10000} \times A_{D(-)}$$

$$C_{D(-)} = \frac{d \times 20,45}{m \times \varepsilon} \times A_{D(-)}$$

Trong đó $C_{D(-)}$ là hàm lượng axit D(-) lactic, tính bằng gam trên 100 g dịch cấy mẫu (B.6.1).

Khi đó, đối với axit D(-) lactic trong mẫu trắng:

$$C_{sb} = \frac{d \times 20,45}{m \times \varepsilon} \times A_{sb}$$

Trong đó C_{sb} là hàm lượng axit D(-) lactic, tính bằng gam trên 100 g mẫu trắng (B.6.2).

Lấy nồng độ của từng dịch cấy mẫu (C_s) trừ đi nồng độ mẫu trắng (C_{sb}) để điều chỉnh về D-lactat có mặt trong cơ chất:

$$C'_{D(-)} = C_s - C_{sb}$$

B.8.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị các kết quả đến hai chữ số thập phân.

B.9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- moi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng, vien dán tiêu chuẩn này;
- moi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tuỳ ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục liệu tham khảo

- [1] TCVN 6836 : 2007 (ISO 8069 : 2005), *Sữa bột – Xác định hàm lượng axit lactic và lactat*.
 - [2] TCVN 8128 -1 : 2009 (ISO 11133-1 : 2009), *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 đếm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm.*
-