

TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9635:2013

ISO 29981:2010

Xuất bản lần 1

**SẢN PHẨM SỮA – ĐỊNH LƯỢNG VI KHUẨN BIFIDUS
GIẢ ĐỊNH – KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 37 °C**

*Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria –
Colony-count technique at 37 °C*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9635:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 29981:2010/IDF 220:2010;

TCVN 9635:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo Lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sản phẩm sữa – Định lượng vi khuẩn bifidus giả định – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C

*Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria –
Colony count technique at 37 °C*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng có chọn lọc vi khuẩn bifidus giả định trong các sản phẩm sữa bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C trong điều kiện yếm khí.

Phương pháp này có thể áp dụng cho các sản phẩm sữa như sữa lên men và sữa không lên men, sữa bột, thức ăn theo công thức dành cho trẻ sơ sinh và các giống khởi động khi có mặt các vi sinh vật này, có thể tồn tại độc lập và kết hợp với các vi khuẩn lactic khác. (Về các tiêu chí chất lượng của sản phẩm sữa, ví dụ: xem TCVN 7030:2009 (CODEX STAN 243:2003^[6]).

Các vi khuẩn bifidus được sử dụng trong các sản phẩm sữa thường thuộc các loài sau (ví dụ, xem Tài liệu tham khảo [7], [8], [16]):

- a) *Bifidobacterium adolescentis*;
- b) *B. animalis* subsp. *animalis*;
- c) *B. animalis* subsp. *lactis*;
- d) *B. bifidum*;
- e) *B. breve*;
- f) *B. infantis*;
- g) *B. longum*.

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 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, 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 6507-5 (ISO 6887-5), *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 đối với mẫu sữa và sản phẩm sữa*

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*

TCVN 8177 (ISO 7889), *Sữa chua – Định lượng các vi sinh vật đặc trưng – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C*

TCVN 9330-1 (ISO 14461-1), *Sữa và sản phẩm sữa – Kiểm soát chất lượng trong phòng thử nghiệm vi sinh vật – Phần 1: Đánh giá năng lực thực hiện đếm khuẩn lạc*

TCVN 9330-2 (ISO 14461-2), *Sữa và sản phẩm sữa – Kiểm soát chất lượng trong phòng thử nghiệm vi sinh vật – Phần 2: Xác định độ tin cậy số đếm khuẩn lạc của các đĩa song song và các bước pha loãng liên tiếp*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Vi khuẩn bifidus (bifidobacteria)

Vi sinh vật yếm khí tạo ra các khuẩn lạc có hình dạng hạt đậu hoặc hình tròn, màu trắng nhạt, một phần hình sao hoặc ba thùy, đường kính từ 1 mm đến 4 mm trên môi trường muối liti transgalactosyl oligosaccharid-mupirocin (TOS-MUP), theo các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Kháng sinh, muối liti mupirocin (MUP), ức chế sự phát triển của phần lớn các vi khuẩn lactic thường dùng trong các sản phẩm sữa lên men và không lên men.

Vi tính chọn lọc của kháng sinh MUP đã được chứng minh khi bổ sung vào môi trường, thông thường các vi khuẩn yogurt điển hình (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), các giống ưa nhiệt trung bình (ví dụ: *Lactococcus lactis*), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* và *Lactobacillus rhamnosus* không phát triển trên môi trường quy định.

Đặc tính này đã được thử nghiệm bằng một số lượng đại diện của các chủng đối chứng và chủng phân lập.

Ngoài ra, thạch TOS làm tăng sự phát triển của vi khuẩn bifidus được sử dụng trong các sản phẩm sữa (xem Tài liệu tham khảo [7]).

CHÚ THÍCH 1: Kiểm tra bằng kính hiển vi vật kính dầu có độ phóng đại 100 lần có rọi sáng pha tương phản cho thấy có dạng hình que với các hình thù khác nhau, thường cong và thô, phân nhánh, sắp xếp đơn chiếc hoặc cặp đôi hình chữ V, theo chuỗi, dưới dạng các tế bào song song hoặc đôi khi có dạng hình hoa thị thể hiện dạng cầu khuẩn phồng.

CHÚ THÍCH 2: Các vi khuẩn bifidus là loại sinh dưỡng hóa học âm tính với catalase, không bền với axit, không sinh bào tử, gram dương, không di động, sinh axit axetic và axit lactic. Glucose bị phân hủy hoàn toàn và đặc trưng bởi sự chuyển hướng fructose-6-phosphat trong đó fructose-6-phosphat phosphoketolase (F6PPK, EC 4.1.2.22) tách fructose-6-phosphat thành axetyl phosphat và erythrose-4-phosphat.

CHÚ THÍCH 3: Nhiệt độ phát triển tối ưu là từ 37 °C đến 41 °C. Về chi tiết, xem Tài liệu tham khảo [9].

4.2 Cấy các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu đã đồng hóa vào thạch TOS có chứa MUP dùng kỹ thuật đổ đĩa, sau đó ủ yếm khí ở 37 °C trong 72 h.

4.3 Đếm các khuẩn lạc thu được.

CHÚ THÍCH: Cách khác, các khuẩn lạc phân lập đã chọn từ đĩa có thể được khẳng định bằng các phép thử thích hợp (ví dụ: phép thử F6PPK, xem Tài liệu tham khảo [14], [15]).

4.4 Tính số lượng vi khuẩn bifidus trên 1 g mẫu từ số lượng khuẩn lạc thu được trên các đĩa ở các mức pha loãng để cho kết quả có nghĩa.

5 Thuốc thử, dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước sử dụng là nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Nguyên liệu cơ bản

Xem TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1) và TCVN 6507-5 (ISO 6887-5).

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) về việc chuẩn bị các dịch pha loãng.

Để đảm bảo tính tương đương của các kết quả về đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) quy định, cần tuân thủ các yêu cầu sau:

- Sử dụng các dung dịch Ringer nồng độ một phần bốn, hoặc dịch pha loãng thích hợp bất kỳ khác được quy định trong TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) và được chứng minh là cho kết quả tương đương.
- Tiệt trùng một lượng lớn và sử dụng một lượng vô trùng vừa đủ đã được chia nhỏ.
- Đưa dịch pha loãng về nhiệt độ phòng. Chuyển dịch pha loãng bằng cách nhỏ giọt mà không để lẫn không khí.
- Độ không đảm bảo đo về thể tích được sử dụng phải phù hợp với các yêu cầu nêu trong TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

5.3 Môi trường nuôi cấy (môi trường TOS-MUP)

Sử dụng môi trường nuôi cấy muối liti transgalactosylat oligosaccharid-mupirocin (TOS-MUP) vừa mới chuẩn bị được bảo quản tránh ánh sáng trực tiếp của mặt trời.

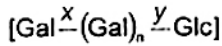
5.3.1 Môi trường cơ bản (môi trường thạch TOS-propionat, xem Tài liệu tham khảo [10])

5.3.1.1 Thành phần

Pepton trypticase	10,0 g
Chất chiết nấm men	1,0 g
Kali dihydrophosphat (KH_2PO_4)	3,0 g
Dikali hydrophosphat (K_2HPO_4)	4,8 g
Amoni sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	3,0 g
Magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
(<i>R</i>)-Cystein-HCl-H ₂ O	0,5 g
Natri propionat	15,0 g
TOS (xem 5.3.1.2)	10,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	950 ml

5.3.1.2 Hỗn hợp oligosaccharid transgalactosylat

Hỗn hợp TOS thu được bằng cách thủy phân lactose bằng β -galactosidase từ *Aspegillus oryzae*. Hỗn hợp TOS chứa các đơn vị galactose (Gal) và glucose (Glc) theo công thức:



Trong đó:

$$n = 1 \dots 4;$$

$$x = \beta\text{-}1,6 > \beta\text{-}1,4 \text{ và } \beta\text{-}1,3;$$

$$y = \beta\text{-}1,4 \gg \beta\text{-}1,3 \text{ và } \beta\text{-}1,6.$$

Hỗn hợp TOS được tinh sạch bằng sắc ký trong các điều kiện xác định (xem Tài liệu tham khảo [18], [19]). Hàm lượng đường tổng số (> 97 % khối lượng) gồm một tỉ lệ nhất định của tri-, tetra-, penta- và hexasaccharid. (Việc thay đổi tỉ lệ của oligosaccharid không được ảnh hưởng đáng kể đến khả năng của môi trường).

5.3.1.3 Chuẩn bị

Hoà các thành phần trên trong 950 ml nước trong khi làm nóng cẩn thận (ví dụ: dùng bếp điện hoặc nồi cách thủy) và khuấy trộn để hòa tan hoàn toàn.

Phân phối các phần 190 ml vào các lọ dung tích 250 ml. Chỉnh pH (6.6), nếu cần, sao cho sau khi hấp áp lực pH, cuối cùng là $6,3 \pm 0,2$ ở 25°C .

Hấp áp lực môi trường cơ bản 15 min ở 115°C .

Nếu môi trường chưa sử dụng ngay thì làm nguội môi trường cơ bản đã chuẩn bị, trừ khi có quy định khác. Bảo quản môi trường này ở nhiệt độ từ 2°C đến 4°C tối đa trong 1 tuần trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần của môi trường.

Môi trường TOS rất nhạy với nhiệt độ, do đó việc xử lý quá nhiệt có thể không ảnh hưởng đến đặc tính của môi trường. Môi trường TOS hoàn chỉnh có sẵn trên thị trường và có thành phần phù hợp với yêu cầu trong tiêu chuẩn này. Tuy nhiên, nếu môi trường này do phòng thử nghiệm tự pha chế thì các kết quả có thể khác nhau giữa các đợt chuẩn bị. Do đó, môi trường cần được đánh giá để đảm bảo rằng đặc tính phát triển của vi khuẩn bifidus, được thể hiện bằng CFU là ở mức tương đương [xem thêm TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1)].

5.3.2 Dung dịch bổ sung MUP (xem Tài liệu tham khảo [11])

Ngay trước khi sử dụng, ví dụ: hòa tan 50 mg MUP trong 50 ml nước hoặc trong một lượng khác theo cùng tỉ lệ. Lọc để khử trùng dung dịch thu được qua màng lọc (cỡ lỗ 0,22 μm) như quy định trong 5.3.3.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

Ngay trước khi sử dụng, làm tan chảy các lượng 190 ml môi trường cơ bản đã chuẩn bị (5.3.1) dưới hơi nước hoặc cách tương đương. Làm nguội trong nồi cách thủy (6.5) đến $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dùng xyranh có bộ lọc vô trùng với màng lọc cỡ lỗ 0,22 μm (6.11) để thêm 10 ml dung dịch bổ sung MUP (5.3.2) vào mỗi phần môi trường cơ bản ngay trước khi rót. Trộn cẩn thận tránh lẫn bọt khí.

Đặt môi trường hoàn chỉnh trở lại nồi cách thủy (6.5) để ở $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến khi sẵn sàng để rót.

Môi trường TOS-MUP hoàn chỉnh phải có nồng độ MUP cuối cùng là 50 mg/l.

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 phải được thực hiện phù hợp với yêu cầu trong TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1) và TCVN 6507-5 (ISO 6887-5). Các dụng cụ thủy tinh phải bền với việc khử trùng nhiều lần.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] để chuẩn bị các mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo quy định trong TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) và cụ thể như sau:

6.1 Thiết bị ủ, bình ủ thông thường hoặc tủ yếm khí

6.1.1 Tủ ấm, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.2 Bình nuôi cấy yếm khí hoặc bình yếm khí, có khả năng cung cấp môi trường yếm khí có chứa từ 10 % đến 20 % cacbon dioxit, khoảng từ 70 % đến 90 % nitơ và khoảng 10 % hydro (tùy chọn), tính theo thể tích. Hỗn hợp khí này không chứa nhiều hơn 1 % thể tích oxy.

Có thể sử dụng các hệ thống xúc tác nhiệt độ thấp thích hợp khác và đã chứng minh là an toàn.

6.1.3 Tủ ấm yếm khí, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, có khả năng cung cấp môi trường yếm khí (xem 6.1.2).

6.2 Máy lắc cơ học, có khả năng khuấy trộn hoặc lắc mạnh các ống nghiệm, ví dụ: máy trộn vortex.

6.3 Dụng cụ đếm khuẩn lạc, theo quy định trong TCVN 6404 (ISO 7218).

- 6.4 Thấu kính phóng đại, phóng đại được 8 lần hoặc 10 lần.
- 6.5 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ và ở $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.6 Máy đo pH, có bù nhiệt, có độ chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.7 Bình hoặc chai, dung tích 250 ml, có nắp đậy hoặc nút đậy kín thích hợp (để giữ môi trường nuôi cấy cũng như để chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu của mẫu thử).
- 6.8 Ống nghiệm, cao khoảng 150 mm và đường kính khoảng 15 mm, có nắp đậy thích hợp.
- 6.9 Pipet chia độ, dùng cho vi sinh vật, được khử trùng và hiệu chuẩn đến đỉnh, 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)], tương ứng, loại A của TCVN 7150 (ISO 835)^[20].
- 6.10 Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo trong suốt không màu, đường kính 90 mm, sâu tối thiểu 10 mm. Đáy của đĩa phải bằng phẳng để không ảnh hưởng đến việc đếm khuẩn lạc.
- 6.11 Dụng cụ khử trùng, để khử trùng bằng lọc, được trang bị xyranh 10 ml với bộ lọc vô trùng có màng lọc cỡ lỗ $0,22\text{ }\mu\text{m}$.
- 6.12 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì nhiệt độ ở $115\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, có chu trình làm nóng và làm lạnh ngắn.

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)^[1].

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

Các quy trình sau đây dựa vào các chất chuẩn tương ứng có tính đến các khuyến cáo đưa ra, ví dụ trong Tài liệu tham khảo [8], [12].

Tiến hành các quy trình quy định trong 8.2 đến 8.5 bằng cách trộn nhẹ, tránh hình thành hoặc lẫn bọt khí và không thực hiện dưới ánh sáng trực tiếp của mặt trời.

Trước khi mở vật chứa mẫu, làm sạch bề mặt xung quanh vùng sẽ được lấy mẫu để tránh làm bẩn mẫu. Lau sạch khu vực này, ví dụ: bằng etanol 70 % (thể tích) để tránh làm nhiễm bẩn sau này. Mở vật chứa một cách vô trùng.

8.2 Chuẩn bị phần mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

8.2.1 Các sản phẩm sữa bột, ví dụ: thức ăn theo công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh

Thực hiện theo các bước từ a) đến i) [xem thêm TCVN 6507-5 (ISO 6887-5)].

- a) Lắc và đảo chiều vật chứa để trộn kỹ lượng chứa bên trong.
- b) Mở bao gói, lấy ra một lượng mẫu thử cần thiết bằng thìa vô trùng và tiến hành như dưới đây. Đóng ngay bao gói. Nên sử dụng kẹp kín khí và đặt túi vào trong bình thủy tinh kín được bảo quản ở 4 °C.
- c) Cân 90 g \pm 0,1 g dịch pha loãng trong từng chai 250 ml (6.7) đã khử trùng trước. Đậy nắp chai.
- d) Làm ấm các chai 250 ml có chứa 90 g dịch pha loãng trong nồi cách thủy (6.5) ở 45 °C.
- e) Cân 10 g \pm 0,1 g mẫu thử, chính xác đến 0,05 g. Cho lượng mẫu đã cân này vào dịch pha loãng đựng trong chai ở 45 °C. Cách khác, cân 10 g mẫu thử trực tiếp trong chai có đựng dịch pha loãng ở 45 °C.
- f) Để hòa tan phần mẫu thử, xoay bình từ từ để làm ướt mẫu. Sau đó, lắc chai 10 lần với khoảng dao động 300 mm trong khoảng 7 s.
- g) Đặt các chai này trong nồi cách thủy (6.5) ở 45 °C trong 5 min, thỉnh thoảng lắc chai.
- h) Làm nguội ngay dưới vòi nước đang chảy 2 min, trong khi vẫn lắc chai. Đưa ngay về nhiệt độ phòng, ví dụ: dùng nồi cách thủy (6.5) ở 20 °C.
- i) Bắt đầu kiểm tra càng nhanh càng tốt (xem thêm 8.5).

ĐIỀU QUAN TRỌNG: Để thu được độ lặp lại có thể chấp nhận được của phương pháp, cần tuân thủ các quy trình trong các bước từ a) đến i).

8.2.2 Sản phẩm sữa chua (yogurt) hoặc tương tự yogurt bổ sung probiotic

Tiến hành theo các bước từ a) đến g) sau đây [xem thêm TCVN 8177 (ISO 7889)].

- a) Chỉnh nhiệt độ của dịch pha loãng về nhiệt độ phòng.
- b) Cân 90 g \pm 0,1 g dịch pha loãng trong mỗi chai 250 ml (6.7) đã khử trùng trước. Đậy nắp chai.
- c) Lắc và đảo chiều vật chứa đậy kín để trộn kỹ lượng chứa bên trong (khoảng 10 lần với khoảng dao động 300 mm trong khoảng 7 s), hoặc nếu không thì trộn kỹ lượng chứa bên trong bằng dao trộn vô trùng hoặc dụng cụ tương tự, sau khi mở bao gói để lấy mẫu đồng nhất.

- d) Mở bao gói, lấy ra một lượng mẫu cần thiết bằng thìa vô trùng hoặc bằng pipet và tiến hành như dưới đây.
- e) Cân 10 g \pm 0,1 g mẫu, chính xác đến 0,05 g. Cho lượng mẫu đã cân vào dịch pha loãng đựng trong chai.
- f) Lắc chai 10 lần với khoảng dao động 300 mm trong khoảng 7 s.
- g) Bắt đầu kiểm tra càng nhanh càng tốt (xem thêm 8.5).

Sau khi chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù của mẫu là dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất, D1; 100 ml), chuẩn bị ngay các bước pha loãng.

8.3 Kiểm tra bằng kính hiển vi

Tiến hành kiểm tra sơ bộ bằng kính hiển vi đối với một vài tiêu bản phết mẫu thử dạng lỏng hoặc dung dịch pha loãng ban đầu (8.2) của các mẫu dạng bột và dạng rắn để chọn đúng dải pha loãng cần được sử dụng, đặc biệt là trong các trường hợp nhà sản xuất không cung cấp thông tin về sản phẩm.

Cách khác, có thể sử dụng kính hiển vi đối pha mà không cần phải nhuộm.

8.4 Chuẩn bị dung dịch pha loãng thập phân

Về các yêu cầu chung, xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1). Đối với các yêu cầu đặc biệt về phát triển của vi khuẩn bifidus, cần chú ý đến các vấn đề dưới đây.

Phải thực hiện thao tác quy định bằng cách trộn nhẹ trong các điều kiện quy định đã chuẩn hóa sau đây.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng như sau:

- a) Lắc dung dịch pha loãng ban đầu (8.2) tốt nhất là 10 lần, với dao động khoảng 300 mm trong khoảng 7 s để đồng hóa mẫu.
- b) Dùng pipet (6.9) lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù vi khuẩn ban đầu) cho vào các ống nghiệm (6.8) có chứa 9 ml dịch pha loãng vô trùng ở nhiệt độ thích hợp (xem thêm 5.2).
- c) Trộn kỹ dung dịch pha loãng này 3 s trên máy trộn vortex (6.2). Thực hiện tương tự đối với các dung dịch pha loãng tiếp theo cho đến khi thu được mật độ làm việc yêu cầu nằm trong khoảng từ 200 CFU/ml đến 500 CFU/ml. Việc trộn phải được thực hiện theo một cách, ví dụ mỗi lần trộn trong 3 s. Đối với mỗi bước pha loãng sử dụng một pipet vô trùng mới (6.9).

Không để bọt khí lẫn vào khi pipet chứa đầy mẫu. Chú ý xả hết lượng chứa trong pipet, đặc biệt là đối với dung dịch mẫu có nồng độ cao.

8.5 Cây

Chuyển từng giọt của 1 ml từ mỗi dung dịch pha loãng thích hợp (nên dùng 4 dung dịch pha loãng thập phân nằm trong vùng có thể đếm được) cho vào từng đĩa Petri trống với hai đĩa lặp lại cho mỗi độ pha loãng. Rót môi trường (5.3.3) với các lượng từ 12 ml đến 15 ml vào các đĩa Petri. Trộn kỹ môi trường với dịch pha loãng bằng cách xoay tròn đĩa Petri mà không làm lẫn không khí.

CHÚ THÍCH: Để giới hạn vùng đếm đến khoảng đã định, đặc biệt là nếu đoán trước số lượng vi sinh vật cao [TCVN 7030:2009 (CODEX STAN 243:2003^{6b})], nếu có thể chỉ cấy các dung dịch pha loãng thập phân cần thiết (ít nhất hai dung dịch pha loãng liên tiếp) để tạo thuận tiện cho việc đếm đúng [xem 9.1 và TCVN 6404 (ISO 7218)].

Cách khác, dùng các kỹ thuật dàn mẫu tự động, nếu đã được đánh giá xác nhận có đối chứng với phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

8.6 Thời gian tiến hành

Thời gian từ khi chuẩn bị xong dung dịch pha loãng ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu đã chuẩn bị) đến khi bổ sung môi trường nuôi cấy không được vượt quá 15 min (xem Tài liệu tham khảo [8]).

8.7 Ủ

Ngay sau khi môi trường đông đặc, lật úp tất cả các đĩa Petri rồi để vào bình nuôi cấy yếm khí hoặc tủ yếm khí (6.1) và ủ ở 37 °C trong 71 h ± 3 h.

8.8 Đếm khuẩn lạc

Sau thời gian ủ quy định, chỉ đếm các khuẩn lạc ở các dung dịch pha loãng nằm trong phạm vi có thể đếm được [nghĩa là các dung dịch pha loãng có số đếm trung bình dự kiến trên một đĩa $\bar{x} \leq 300$ CFU, xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Đếm tất cả các đĩa của các dung dịch pha loãng được chọn bằng cách xem xét tất cả các khuẩn lạc trên đĩa ngay sau khi ủ xong.

Kiểm tra tất cả các đĩa dưới ánh sáng mờ đục. Để thuận tiện cho việc đếm, sử dụng dụng cụ đếm khuẩn lạc thích hợp (6.3). Chú ý để không nhầm các hạt của mẫu không hòa tan hoặc các chất kết tủa trên các đĩa với các khuẩn lạc nhỏ. Để kiểm tra các khuẩn lạc nghi ngờ, có thể dùng thấu kính có độ phóng đại cao hơn để phân biệt được các khuẩn lạc với các chất lạ.

Sau khi ủ, kiểm tra ngay các đĩa, nếu có thể. Nếu không thì bảo quản các đĩa này trong tủ lạnh tối đa 48 h [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

8.9 Khẳng định bằng cách đọc đĩa Petri

Nhận biết các khuẩn lạc của vi khuẩn bifidus qua màu trắng nhạt. Chọn các khuẩn lạc điển hình (xem 3.1) từ các đĩa đã dùng để đếm và kiểm tra bằng kính hiển vi.

Tùy chọn, có thể thực hiện phép thử F6PPK để khẳng định các kết quả (xem Tài liệu tham khảo [14], [15]).

CHÚ THÍCH: Một số chủng vi khuẩn bifidus có thể có kích thước và dạng bề ngoài khác nhau trên cùng một đĩa. Hầu hết khuẩn lạc của vi khuẩn bifidus làm mất mùi axít axetic.

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Tính

Sử dụng tất cả các số đếm của các đĩa bắt đầu từ các dung dịch pha loãng nằm trong vùng có thể đếm thu được trong 8.7. Vùng có thể đếm này bao gồm tất cả các dung dịch pha loãng có số đếm trung bình dự kiến trên đĩa $\bar{x} \leq 300$ CFU.

Tính số lượng CFU vi khuẩn bifidus giả định trên mỗi gam sản phẩm, N , theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3) \times d} \quad (1)$$

trong đó:

$\sum x_i$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại (8.8);

n_1 là số đĩa được giữ lại của độ pha loãng thứ nhất có thể đếm được;

n_2 là số đĩa được giữ lại của độ pha loãng thứ hai;

n_3 là số đĩa được giữ lại của độ pha loãng thứ ba;

d là hệ số pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng thứ nhất có thể đếm được được giữ lại.

Trong trường hợp chỉ có hai độ pha loãng được đếm thì công thức được điều chỉnh như sau:

$$N = \frac{\sum x_i}{(n + 0,1n_2) \times d}$$

Xác định độ tin cậy của số đếm khuẩn lạc thu được từ các đĩa song song và các độ pha loãng liên tiếp theo TCVN 9330-2 (ISO 14461-2). Để tính kết quả, chỉ sử dụng các số đếm tin cậy [xem thêm TCVN 6404 (ISO 7218)].

9.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến hai chữ số có nghĩa, là số CFU vi khuẩn bifidus trên mỗi gam sản phẩm, biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10. Về việc xác nhận kết quả, xem 10.4.

Nếu chữ số cuối cùng nhỏ hơn 5 thì không thay đổi số đứng trước. Nếu chữ số sau cùng bằng hoặc lớn hơn 5 thì tăng số đứng trước lên một đơn vị. Tiếp tục thực hiện cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

VÍ DỤ 1: Giả sử rằng số đếm vi khuẩn bifidus trên môi trường cho các kết quả dưới đây (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng được ủ), kết quả cuối cùng được tính như sau:

Bảng 1 – Ví dụ 1

Độ pha loãng	Đĩa 1	Đĩa 2
D4 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-4})	300	298
D5 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-5})	30	25
D6 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-6})	2	3

Tính theo Công thức (1) ta có:

$$N = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3) \times d} = \frac{300 + 298 + 30 + 25 + 2 + 3}{(2 + 0,1 \times 2 + 0,01 \times 2) \times 10^{-4}} = \frac{658}{2,22 \times 10^{-4}} = 296 \times 10^4 = 3,0 \times 10^6$$

VÍ DỤ 2: Giả sử rằng số đếm vi khuẩn bifidus trên môi trường cho các kết quả dưới đây (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng được ủ), kết quả cuối cùng được tính như sau:

Bảng 2 – Ví dụ 2

Độ pha loãng	Đĩa 1	Đĩa 2
D5 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-5})	311	286
D6 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-6})	27	21
D7 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-7})	2	0

Tính theo Công thức (1) ta có:

$$N = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3) \times d} = \frac{311 + 286 + 27 + 21 + 2 + 0}{(2 + 0,1 \times 2 + 0,01 \times 2) \times 10^{-5}} = \frac{647}{2,22 \times 10^{-5}} = 291 \times 10^5 = 2,9 \times 10^7$$

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm được thực hiện năm 2006 về độ chụm của phương pháp được tóm tắt trong Phụ lục A (xem Tài liệu tham khảo [12], [13]). Để xác định giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập, trong phép thử này đã sử dụng một sản phẩm thức ăn theo công thức dạng bột từ sữa dành cho trẻ sơ sinh bổ sung probiotic và sáu sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa các chủng vi khuẩn bifidus khác nhau có bán trên thị trường.

Các kết quả thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không sử dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền đã nêu. Dải nồng độ thử nghiệm của các chủng vi khuẩn bifidus trong các sản phẩm được chọn là đại diện cho các sản phẩm bán sẵn và phù hợp với TCVN 7030:2009 (CODEX STAN 243:2003)^[6].

10.2 Độ lặp lại

Độ lặp lại là giá trị gần nhất về sự thống nhất giữa các kết quả thử độc lập và liên tiếp thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên cùng vật liệu, trong cùng điều kiện (thiết bị, người thực hiện, phòng thử nghiệm và khoảng thời gian ngắn); nghĩa là *các điều kiện lặp lại*.

Giới hạn lặp lại, r , là giá trị nhỏ hơn hoặc bằng chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm (vi khuẩn bifidus giả định trên mỗi gam, được chuyển về logarit thập phân) thu được trong các điều kiện lặp lại dự kiến nằm trong xác suất 95 % [xem ISO 3534-1^[2], TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[3], TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4] và ISO 16140^[5]].

Bảng 3, cột thứ hai từ phải sang trái cho thấy độ lặp lại của các sản phẩm sữa khác nhau thu được trong phép thử vòng năm 2006, được biểu thị theo giới hạn lặp lại r . Các giá trị này được tính bằng các phép phân tích thô theo ISO 16140^[5] có tính đến tất cả các biến thiên (độ lệch) phản ánh các điều kiện thực tế thông thường.

10.3 Độ tái lập

Độ tái lập là giá trị gần nhất về sự thống nhất giữa các kết quả thử độc lập khi sử dụng cùng phương pháp trên cùng vật liệu, thu được từ các phòng thử nghiệm khác nhau sử dụng các thiết bị khác nhau; nghĩa là *các điều kiện tái lập*.

Giới hạn tái lập, R , là giá trị nhỏ hơn hoặc bằng chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm (vi khuẩn bifidus giả định trên mỗi gam, được chuyển về logarit thập phân) thu được trong các điều kiện tái lập dự kiến nằm trong xác suất 95 % [xem ISO 3534-1^[2], TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[3], TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4] và ISO 16140^[5]].

Bảng 3. cột ngoài cùng bên phải cho thấy độ tái lập của các sản phẩm sữa khác nhau thu được trong phép thử vòng năm 2006, được biểu thị theo giới hạn tái lập R . Các giá trị này được tính bằng các phép phân tích độ ổn định (robust analyse) theo ISO 16140^[5] có tính đến tất cả các biến thiên (độ lệch) phản ánh các điều kiện thực tế thông thường.

Bảng 3 – Giới hạn lặp lại, r ổn định và giới hạn tái lập R ổn định

Sản phẩm	Mô tả	Dạng sản phẩm	r lg(CFU/g)	R lg(CFU/g)
Yogurt 1	Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> bán ở châu Âu	Dạng lỏng	0,115	0,227
Yogurt 2	Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> bán ở châu Âu	Dạng đặc	0,182	0,389
Yogurt 3	Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i> bán ở châu Âu	Dạng lỏng	0,123	0,538
Yogurt 4	Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa <i>B. breve</i> , <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i> bán ở châu Á	Dạng lỏng	0,118	0,400
Yogurt 5	Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa <i>B. longum</i> , <i>L. gasserii</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> bán ở châu Á	Dạng đặc	0,543	0,543
Yogurt 6	Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> bán ở châu Á	Dạng đặc	0,213	0,291
Thức ăn theo công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh	Sản phẩm thức ăn theo công thức từ sữa bổ sung probiotic dành cho trẻ sơ sinh có chứa <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> bán trên thị trường	Dạng bột	0,221	0,529

10.4 Dữ liệu về độ chụm thu được đã được xác định đối với sản phẩm sữa

Dựa trên tính tương tự của các kết quả thu được đối với một số sản phẩm, dữ liệu về độ chụm của phương pháp đã xác định được, do đó phân biệt được giữa ba dạng khác nhau của sản phẩm (xem Bảng 4).

Các kết quả thu được đối với mẫu yogurt 5 cho thấy khả năng không đều do tính không đồng nhất và đã loại ra khỏi phép tính (xem Tài liệu tham khảo [12], [13]).

Tùy thuộc vào dạng sản phẩm mà áp dụng dữ liệu về độ chụm sau đây (giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập, Bảng 4):

- yogurt dạng lỏng, bao gồm yogurt uống hoặc dạng tương tự;
- yogurt dạng kem và dạng đặc (bao gồm yogurt đã định dạng);
- sản phẩm dạng bột, bao gồm thức ăn theo công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh hoặc dạng tương tự.

Bảng 4 – Dữ liệu về độ chụm thu được đã được xác định đối với các dạng sản phẩm

Dạng sản phẩm	s_r lg(CFU/g)	s_R lg(CFU/g)	r lg(CFU/g)	R lg(CFU/g)
Dạng lỏng	0,042	0,139	0,12	0,39
Dạng đặc	0,071	0,144	0,20	0,40
Dạng bột	0,079	0,189	0,22	0,53

Các diễn giải thêm liên quan đến ứng dụng thực tế được nêu trong ví dụ.

Ví DỤ: Kiểm tra sản phẩm yogurt:

Bảng 5 – Kiểm tra lần thứ nhất

Độ pha loãng	Đĩa 1	Đĩa 2
D5 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-5})	128	145
D6 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-6})	9	11
D7 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-7})	0	0

Tính theo Công thức (1) ta có:

$$N_1 = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d} = \frac{128 + 145 + 9 + 11}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-5}} = 133,2 \times 10^5 = 1,332 \times 10^7$$

$$\lg N_1 = \lg(1,332 \times 10^7) = 7,13$$

Bảng 6 – Kiểm tra lần thứ hai

Độ pha loãng	Đĩa 1	Đĩa 2
D5 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-5})	186	171
D6 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-6})	17	21
D7 (dung dịch pha loãng thập phân 10^{-7})	1	0

Tính theo Công thức (1) ta có:

$$N_2 = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d} = \frac{186 + 171 + 17 + 21 + 1 + 0}{(2 + 0,1 \times 2 + 0,01 \times 2) \times 10^{-5}} = 178,4 \times 10^5 = 1,784 \times 10^7$$

$$\lg N_2 = \lg(1,784 \times 10^7) = 7,25$$

Để kiểm tra sự đáp ứng yêu cầu lặp lại quy định trong tiêu chuẩn này, tiến hành như sau:

a) Tính chênh lệch logarit của hai kết quả kiểm tra riêng rẽ (N_1 và N_2) thu được:

$$|\lg N_1 - \lg N_2| = |7,12 - 7,25| = 0,13$$

b) So sánh giá trị tuyệt đối tính được với giới hạn độ chụm, r , nêu trong Bảng 4. Với các điều kiện lặp lại, cần đáp ứng yêu cầu dưới đây:

$$|\lg N_1 - \lg N_2| \leq r$$

Tùy thuộc vào dạng sản phẩm, cần đưa ra quyết định sau:

1) Đối với yogurt dạng lỏng: $0,13 > r_{\text{Bảng 4}} = 0,12 \rightarrow$ không có hiệu lực !!

Nếu có thể, lặp lại phép xác định sau khi xem xét các nguyên nhân biến thiên ngoại lệ.

2) Đối với sản phẩm yogurt dạng kem hoặc dạng rắn: $0,13 \leq r_{\text{Bảng 4}} = 0,20 \rightarrow$ có hiệu lực !!

c) Biểu thị các kết quả như sau:

1) Đối với các kết quả có hiệu lực (sự phù hợp với dữ liệu độ chụm quy định đã khẳng định), làm tròn các kết quả cuối cùng bằng cách tính trung bình cộng của các kết quả.

2) Nếu yêu cầu nói trên không đáp ứng được thì tốt nhất nên kiểm tra lại. Nếu không thực hiện được việc kiểm tra lặp lại thì báo cáo các kết quả riêng rẽ, nêu rõ "dữ liệu không được đánh giá hiệu lực".

11 Kinh nghiệm sử dụng phương pháp

Để thực hiện đầy đủ các yêu cầu thực hành phòng thử nghiệm tốt, nên chứng minh sự hiểu biết về sử dụng tiêu chuẩn này bằng cách đánh giá năng lực của từng người phân tích khi áp dụng kỹ thuật đồ đĩa [ví dụ: xem TCVN 9330-1 (ISO 14461-1)].

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra:

- 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 đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm – Phép thử vòng "bifido"

Nghiên cứu cộng tác quốc tế gồm 23 phòng thử nghiệm của 11 nước tham gia đánh giá các sản phẩm sữa bổ sung probiotic bán sẵn trên thị trường (lên men và không lên men). Phép thử này được chia thành: Pha A để đánh giá năng lực phân tích của tất cả các phòng thử nghiệm tham gia (quốc tế); Pha B để kiểm tra thức ăn theo công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh và Pha C để kiểm tra một số sản phẩm yogurt bổ sung probiotic được chọn. Pha C thực hiện nghiên cứu các sản phẩm yogurt điển hình bán trên thị trường châu Âu và châu Á.

Phép thử vòng do Bộ môn Khoa học và Công nghệ Thực phẩm của trường Đại học Ứng dụng khoa học đời sống và Tài nguyên thiên nhiên (BOKU), Viên, Áo thực hiện năm 2005 và 2006. Khi thực hiện phương pháp này, tất cả các hướng dẫn có liên quan đã được gửi đến tất cả các thành viên tham gia. Sau khi thu thập và chuẩn bị các dữ liệu thu được, phép phân tích thống kê được BOKU thực hiện, cùng hợp tác có Viện Sinh trắc học và Xử lý dữ liệu và Viện Thống kê và Toán kinh tế của trường Đại học Mở Beclin, Beclin, Đức (thông tin chi tiết, xem Tài liệu tham khảo [12], [13]).

Bảng A.1 – Kết quả thử liên phòng thử nghiệm quốc tế

Thông số	Mẫu						
	Quốc tế Thức ăn theo công thức từ sữa cho trẻ sơ sinh K, L, N	Châu Âu			Châu Á		
		Yogurt 1 A, B	Yogurt 2 C, D	Yogurt 3 E, F	Yogurt 4 A, B	Yogurt 5 C, D	Yogurt 6 E, F
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	23	17	17	17	6	6	6
Cỡ mẫu	3	2	2	2	2	2	2
Tổng số lần kiểm tra của mỗi phòng	12	4	4	4	4	4	4
Giá trị trung bình [lg(CFU)/g]	7,344	6,337	7,813	6,723	7,262	7,674	7,824
Bộ dữ liệu được giữ lại	23	17	16	17	6	6	6
Kết quả được dùng để đánh giá r, R	69	34	32	34	12	12	12
Độ lệch chuẩn lặp lại, $S_{R\text{ôn định}}^a$	0,079	0,041	0,065	0,044	0,042	0,194	0,076
Giới hạn lặp lại, $r_{\text{ôn định}}^a$	0,221	0,115	0,182	0,123	0,118	0,543	0,213
Độ lệch chuẩn tái lập, $S_{R\text{ôn định}}^a$	0,189	0,081	0,139	0,192	0,143	0,194	0,104
Giới hạn tái lập, $R_{\text{ôn định}}^a$	0,529	0,227	0,389	0,538	0,400	0,543	0,291

^a Dựa vào các phép phân tích độ ổn định phù hợp với ISO 16140^[5], không có bộ dữ liệu nào bị loại ra.

Mô tả các mẫu thử đã được sử dụng:

Thức ăn theo công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh: Sản phẩm thức ăn theo công thức từ sữa bổ sung probiotic dành cho trẻ sơ sinh có chứa *B. animalis* subsp. *lactis* có bán trên thị trường

Yogurt 1: Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* bán ở châu Âu.

Yogurt 2: Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* bán ở châu Âu.

Yogurt 3: Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. casei*, *S. thermophilus* bán ở châu Âu.

Yogurt 4: Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa *B. breve*, *L. casei*, *S. thermophilus* bán ở châu Á.

Yogurt 5: Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa *B. longum*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* bán ở châu Á.

Yogurt 6: Sản phẩm yogurt bổ sung probiotic có chứa *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* bán ở châu Á.

Thư mục liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] ISO 3534-1, *Statistic – Vocabulary and symbols – Part 1: General statistical terms and terms used in probability*
- [3] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
- [4] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
- [5] ISO 16140, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*
- [6] TCVN 7030:2009 (CODEX STAN 243-2003), *Sữa lên men*
- [7] MACSO, L., HUYS, G., DE BRANDT, E., TEMMERMAN, R., SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, **102**, pp. 221-230
- [8] IDF GROUP E104 – LACTIC ACID BACTERIA AND STARTERS. Guideline for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Bull. Int. Dairy Fed.* 1999, (340), pp. 19-23
- [9] SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacteria* Orla-Jensen 1924, 472^{AL}. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, pp. 1418-1434. Williams & Wikins, Baltimore, MD, 1986
- [10] EXPERT GROUP ON SELECTIVE ENUMERATION OF BIFIDOBACTERIA. *Method of enumeration of bifidobacteria in fermented milks and fermented milk drinks*. Japanese Association of Fermented Milks and Fermented Milk Drinks, 2000
- [11] RADA, V., KOC, J. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 2000, **55**, pp. 65-67
- [12] ZITZ, U., KNEIFEL, W., WEISS, H., WILRICH, P.T. Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: Development of a standard method. *Bull. Int. Dairy Fed.* 2007, (411), pp. 3-20
- [13] ZITZ, U. *Kulturelle Bestimmung der Bifidobakterienkeimzahl in Milchprodukten – Ein Leitfaden zur Standardisierung quantitativer mikrobiologischer Methoden* [Culture determination of the bifidobacteria count in milk products – A manual for the standardization of quantitative

microbiological methods]. SVH (Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften), Saarbrücken, 2008. 242 p.

- [14] ORBAN, J.I., PATTERSON, J.A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Meth.* 2000, **40**, pp. 221-224
- [15] SIMPSON, P.J., FITZGERALD, G.F., STANTON, C., ROSS, R.P. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J. Microbiol. Meth.* 2004, **57**, pp. 9-16
- [16] HOLZAPFRL, W.H., SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* 2002, **35**, pp. 109-116
- [17] TANAKA, R., TAKAYAMA, H., MOROTOMI, M., KUROSHIMA, T., UHEYAMA, S., MATSUMOTO, K., KURODA, A., MUTAI, M. Effects of administration of TOS and *Bifidobacteria breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1983, **2**, pp. 17-24
- [18] TOBA, T., YOKOTA, A., ADACHI, S. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chem.* 1985, **16**, pp. 147-162
- [19] YAKUL HONSHA KK. *Composition for promoting growth of bifidobacteria*. MUTAI, M., TERASHIMA, T., TAKAHASHI, T., TANAKA, R., KURODA, A., UHEYAMA, S., MEYAMA, S., MATSUMOTO, K. inventors. US Patent No. 4 435 389, 1984
- [20] TCVN 7150 (ISO 835) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
-