

TCVN 9664:2013
ISO 26323:2009

Xuất bản lần 1

**SẢN PHẨM SỮA – XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ AXIT
CỦA CÁC GIỐNG VI KHUẨN TRONG SỮA
BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐO pH LIÊN TỤC (CpH)**

*Milk products – Determination of the acidification activity of
dairy cultures by continuous pH measurement (CpH)*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9664:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 3356:2009;

TCVN 9664:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo Lường
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sản phẩm sữa - Xác định hoạt độ axit của các giống vi khuẩn trong sữa bằng phương pháp đo pH liên tục (CpH)

Milk products – Determination of the acidification activity of dairy cultures by continuous pH measurement (CpH)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo hoạt độ axit hóa của vi khuẩn lactic bằng phép đo pH liên tục.

CHÚ THÍCH: Phương pháp này dựa trên Tài liệu viện dẫn [9].

Phương pháp này áp dụng cho các giống vi khuẩn khởi động đặc trưng có mặt trong sữa.

Có hai loại sữa đã chuẩn hóa được sử dụng trong tiêu chuẩn này: sữa đun sôi chứa 9,5 % khối lượng chất khô (sữa-B 9,5) và sữa đã được tiệt trùng bằng áp lực chứa 9,5 % khối lượng chất khô (sữa-A 9,5). Việc xử lý nhiệt sữa-B 9,5 có thể không làm bất hoạt hết tất cả các enzym có mặt, mà có thể ảnh hưởng đến hoạt động của một số giống vi khuẩn. Trong trường hợp đó, các giống vi khuẩn được kiểm tra bằng sữa-A 9,5 đã làm bất hoạt tất cả các enzym.

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 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 để chuẩn bị mẫu sữa và sản phẩm sữa¹⁾*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

¹⁾ Thay thế TCVN 6263 (ISO 8261).

3.1

Hoạt độ axit hóa (acidification activity)

Khả năng axit hóa sữa của giống vi khuẩn khởi động được xác định theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hoạt độ axit hóa có thể định lượng được theo các thông số sau:

- t_a là thời gian bắt đầu quá trình axit hóa sữa đã chuẩn hóa, nghĩa là thời gian để pH giảm đi 0,08 đơn vị so với pH ban đầu (sau 15 min). Thời gian t_a này được tính bằng phút kể từ thời điểm cấy giống vi khuẩn, $t = 0$. Nếu có sẵn phần mềm ghi lại dữ liệu sau mỗi 4 min thì t_a này được xác định bằng phương pháp nội suy.
- pH_t là độ pH sau khoảng thời gian t h (nghĩa là: 4 h, 6 h, 12 h hoặc 16 h) axit hóa của sữa đã chuẩn hóa ở 30 °C, 37 °C, 40 °C hoặc 43 °C. Thời gian thực tế đối với các thông số phụ thuộc vào đặc tính của giống vi khuẩn khởi động.
- t_{pHx} là thời gian axit hóa sữa đã chuẩn hóa đến giá trị pH nhất định, ví dụ: pH 4,50. Thời gian thực đối với thông số này phụ thuộc vào đặc tính của giống vi khuẩn khởi động và việc sử dụng chúng.

4 Nguyên tắc

Pha loãng một lượng quy định giống vi khuẩn khởi động rồi cấy vào một lượng quy định của sữa đã chuẩn hóa. Mẫu đã cấy được ủ ấm ở nhiệt độ quy định không đổi: 30 °C, 37 °C, 40 °C hoặc 43 °C trong một khoảng thời gian nhất định tùy thuộc vào đặc tính của giống vi khuẩn khởi động. Trong suốt quá trình ủ, hoạt độ axit hóa được xác định bằng cách đo pH liên tục, sử dụng điện cực pH và bộ ghi dữ liệu. Khi thu được đồ thị về quá trình lên men, có thể tính hoặc tách được số lượng các thông số của đồ thị.

5 Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác. Nước không được chứa các chất có thể ức chế hoặc ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật có trong sữa hoàn nguyên. Nếu sử dụng nước đã xử lý bằng clo thì cần trung hòa clo trước khi sử dụng.

Cần tuân thủ những quy tắc sau đối với chất lượng nước: số lượng tế bào phải dưới 50 tế bào/ml và độ dẫn điện phải nhỏ hơn 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Các phép thử để xác định mức độ phù hợp của nước được sử dụng trong các ứng dụng vi sinh vật được nêu trong TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1)^[5].

5.1 Nguyên liệu cơ bản

CẢNH BÁO AN TOÀN – Chú ý bảo đảm an toàn khi sử dụng dung dịch làm sạch điện cực (5.1.2), dung dịch kali clorua (5.1.3) hoặc dung dịch làm sạch máy ghi biểu đồ (5.1.4), vì chúng có thể kích thích da và mắt.

5.1.1 Dung dịch đệm

5.1.1.1 Dung dịch đệm pH 4,00, có khả năng làm chất đệm ở 20 °C; ví dụ: chất đệm Merck/VWR CertiPUR (Order No.1.09475)²⁾ hoặc loại tương đương.

5.1.1.2 Dung dịch đệm pH 7,00, có khả năng làm chất đệm ở 20 °C; ví dụ: chất đệm Merck/VWR CertiPUR (Order No.1.09477)²⁾ hoặc loại tương đương.

5.1.2 Dung dịch làm sạch điện cực, có khả năng làm sạch điện cực; ví dụ: dung dịch pepsin/HCl từ Mettler Toledo (Order no. 9891)²⁾ hoặc loại tương đương.

5.1.3 Dung dịch kali clorua, nồng độ $c(\text{KCl}) = 3 \text{ mol/l}$; ví dụ: dung dịch Mettler Toledo (Order no. 9823)²⁾ hoặc tương đương.

5.1.4 Dung dịch rửa máy ghi biểu đồ, có khả năng làm sạch máy ghi biểu đồ; ví dụ: dung dịch thiourea/HCl từ Mettler Toledo (Order no. 9892)²⁾ hoặc loại tương đương.

5.1.5 Dung dịch etanol, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$ phần thể tích trong nước, dùng để khử trùng.

5.1.6 Sữa bột sấy phun, chứa hàm lượng chất béo thấp, đã xử lý nhiệt vừa phải. Sử dụng sữa bột sấy phun, chứa hàm lượng chất béo thấp, đã xử lý nhiệt vừa phải được chế biến từ sữa có chất lượng tốt và không có dư lượng kháng sinh có thể phát hiện được. Sữa bột sấy phun phải có chất lượng vi sinh tốt (xem Tài liệu tham khảo [8]), có mùi vị tự nhiên, hương thơm của sữa tươi đã tách chất béo và phải chứa các thành phần như quy định trong Bảng 1.

Bảng 1 – Thành phần của sữa bột sấy phun, chứa hàm lượng chất béo thấp, đã xử lý nhiệt vừa phải^a, ví dụ của hãng Chr. Hansen³⁾

Thành phần	Phần khối lượng %
Protein sữa	34 đến 38
Lactose	48 đến 56
Chất béo sữa	< 1,25
Hàm lượng tro	từ 7 đến 9
Độ ẩm	< 4
Độ axit chuẩn độ, tính theo axit lactic	< 0,15
^a Độ pH của dung dịch 10 % khối lượng phải nằm trong khoảng từ 6,5 đến 6,8.	

²⁾ Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

³⁾ Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

5.2 Cơ chất

5.2.1 Sữa-QC 9,5

5.2.1.1 Thành phần. Chỉ sử dụng sữa đã chuẩn hóa với hàm lượng chất khô quy định được pha chế từ sữa bột gầy sấy phun phù hợp với thành phần trong Bảng 2.

Lượng sữa pha chế có thể ít hơn lượng sữa quy định trong Bảng 2. Tuy nhiên, không pha chế ít hơn khoảng 1,1 kg sữa. Nếu sử dụng lượng ít hơn thì dùng cân phân tích (6.1) để cân sữa bột chính xác đến 1 mg.

Mục đích là để pha chế sữa có hàm lượng chất khô 9,5 % \pm 0,2 % khối lượng, tương tự như sữa gầy đóng chai hoặc sữa tiệt trùng.

Bảng 2 – Thành phần của sữa được chế biến từ sữa bột sấy phun

Thành phần	Khối lượng kg
Sữa bột được xử lý nhiệt trung bình ^a	10,9 đến 11,2
Nước	100,0

^a Lượng này dao động theo hàm lượng nước của sữa bột và nước bị mất trong quá trình chuẩn bị và xử lý nhiệt.

5.2.1.2 Chuẩn bị. Hòa tan sữa bột đã xử lý nhiệt trung bình vào nước trong khoảng thời gian không quá 30 min. Đun nóng nước đến 40 °C để hòa tan hoàn toàn bột sữa, nếu cần.

Phân phối sữa thu được vào chai hình trụ để có được thể tích 200 ml sau khi xử lý nhiệt. Kiểm tra thể tích bằng cách cân chai cho đến khi đạt được khối lượng tịnh 207 g \pm 2 g (tổng khối lượng trừ đi khối lượng của chai). Tỷ trọng của sữa-QC 9,5 là 1,033 g/ml.

Cách khác, phân phối sữa thu được vào chai hình trụ để có được khối lượng 200 g \pm 2 g (khối lượng tịnh). Bù phần chênh lệch khối lượng trong quá trình nuôi cấy.

5.2.2 Xử lý nhiệt sữa-B 9,5. Xử lý nhiệt sữa đã chuẩn bị (5.2.1.2) theo chương trình nhiệt độ trong Bảng 3.

Bảng 3 – Chương trình nhiệt độ để xử lý nhiệt sữa-B 9,5

Quy trình	Nhiệt độ °C	Thời gian min
Gia nhiệt	> 99 \pm 1	< 20
Duy trì	99 \pm 1	30 \pm 1
Làm nguội	99 \pm 1 đến 40 \pm 5	< 40

Sau đó bảo quản sữa-B 9,5 thu được ở nhiệt độ dưới 7 °C trong ít nhất 16 h.

Ghi lại sự bay hơi trong quá trình xử lý nhiệt và sự thay đổi khối lượng sau khi xử lý nhiệt.

5.2.3 Thời hạn sử dụng của sữa-B 9,5. Trước khi sử dụng, bảo quản sữa-B 9,5 (5.2.2) trong ít nhất 16 h và tối đa 12 ngày.

Các enzym như protease có thể chưa bị bất hoạt và có thể ảnh hưởng đến hoạt độ axit hóa của một số giống vi khuẩn.

5.2.4 Xử lý nhiệt sữa-A 9,5. Sử dụng sữa-A 9,5 cho giống vi khuẩn khi sữa-B 9,5 không đáp ứng được độ lặp lại, ví dụ do hoạt tính của protease vẫn còn.

Tiệt trùng sữa đã chuẩn bị (5.2.1.2) theo chương trình nhiệt độ trong Bảng 4.

Bảng 4 – Chương trình nhiệt độ để xử lý nhiệt sữa-A 9,5

Quy trình	Nhiệt độ °C	Thời gian min
Gia nhiệt	115 ± 1	< 20
Duy trì	115 ± 1	15 ± 1
Làm nguội	115 ± 1 đến 40 ± 5	< 40

Sau đó bảo quản sữa-A 9,5 thu được ở nhiệt độ dưới 7 °C trong ít nhất 16 h.

Ghi lại sự bay hơi trong quá trình xử lý nhiệt và sự thay đổi khối lượng sau khi xử lý nhiệt.

5.2.5 Thời hạn sử dụng của sữa-A 9,5. Trước khi sử dụng, bảo quản sữa-A 9,5 (5.2.4) trong ít nhất 16 h và tối đa 12 ngày.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và cụ thể là các dụng cụ cần thiết để chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng được quy định trong TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) và các dụng cụ sau:

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 mg và 1 mg (xem 5.2.1.1) tương ứng.

6.2 Thiết bị hấp áp lực, có khả năng hoạt động ở 99 °C ± 1 °C và 115 °C ± 1 °C.

6.3 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 21 °C ± 1 °C, 30,0 °C ± 0,2 °C, 37,0 °C ± 0,2 °C, 40,0 °C ± 0,2 °C và 43,0 °C ± 0,2 °C, kiểm soát được nhiệt.

6.4 Điện cực đo pH, thích hợp để đo pH yêu cầu; ví dụ Mettler Toledo⁴⁾ 405-DPAS-SC-K8S/150 hoặc các điện cực tương đương.

6.5 Chai hình trụ, dung tích 250 ml, cao 16,5 cm và đường kính trong 5,5 cm.

6.6 Đầu đo nhiệt độ, được hiệu chuẩn chính xác đến $\pm 0,1$ °C.

6.7 Bộ ghi dữ liệu, được trang bị cùng với các kênh đo pH và nhiệt độ; được kết nối với máy tính có khả năng ghi dữ liệu từ kênh đo pH và dụng cụ dò nhiệt độ.

7 Lấy mẫu

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

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Chuẩn bị sữa

Tối thiểu 16 h trước khi bắt đầu phân tích, nới lỏng nắp chai sữa (lần cân thứ hai) được dùng để phân tích hoạt độ. Để cho nồng độ oxy và cacbon dioxide đạt được sự cân bằng giữa sữa và môi trường xung quanh.

Làm ấm trước trong nồi cách thủy đến nhiệt độ cần.

Làm nguội chai sữa dùng để pha loãng (lần cân thứ nhất) đến nhiệt độ từ 4 °C đến 12 °C để giảm thiểu hoạt độ của vi khuẩn.

Làm ấm trước chai sữa để phân tích hoạt độ (lần cân thứ hai hoặc thứ ba, xem 9.1.2) tới nhiệt độ cần trong nồi cách thủy ở nhiệt độ quy định từ 20 min đến 40 min. Tổng thời gian phụ thuộc vào nhiệt độ cần và có thể không vượt quá 60 min trước khi cần.

Thiết lập nhiệt độ đo liên tục bằng cách đặt đầu đo nhiệt độ đã hiệu chuẩn trong chai kiểm soát. Kiểm tra nhiệt độ trước khi cần. Cách khác, có thể sử dụng nhiệt kế đã hiệu chuẩn.

8.2 Rửa và hiệu chuẩn các điện cực pH

Làm ấm dung dịch đệm có pH 4,00 (5.1.1.1), dung dịch đệm có pH 7,00 (5.1.1.2) và các điện cực pH (6.4.) đến nhiệt độ cần của nồi cách thủy (6.3) duy trì ở các nhiệt độ $30,0$ °C $\pm 0,2$ °C, $37,0$ °C $\pm 0,2$ °C, $40,0$ °C $\pm 0,2$ °C hoặc $43,0$ °C $\pm 0,2$ °C trong ít nhất 10 min trước khi hiệu chuẩn đầu đo pH.

⁴⁾ Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Dùng giá trị pH của các dung dịch đệm ở nhiệt độ 30 °C, 37 °C, 40 °C hoặc 43 °C khi hiệu chuẩn các đầu đo pH như quy định của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH: Các giá trị pH của các dung dịch đệm phụ thuộc vào nhiệt độ và có thể lấy được từ nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp.

8.3 Rửa protein và chất béo ra khỏi các điện cực

Giữa mỗi lần lên men và sau mỗi lần chạy, tráng rửa sạch sữa còn sót lại trên các điện cực bằng nước. Sau đó loại hết chất béo bằng dung dịch etanol (5.1.5).

Khử trùng điện cực. Ngâm điện cực vào dung dịch rửa điện cực mới (5.1.2) ít nhất 15 min. Tráng điện cực bằng nước. Chú ý mỗi lần rửa sử dụng dung dịch rửa mới.

8.4 Ổn định và bảo quản điện cực đo pH

Ngâm điện cực pH (6.4) trong dung dịch kali clorua (5.1.3) trong 30 min để cho ổn định.

Bảo quản điện cực trong dung dịch kali clorua (5.1.3), nếu cần và tối thiểu mỗi tuần 1 lần cần thay mới dung dịch.

8.5 Hiệu chuẩn điện cực đo pH

Tráng điện cực đo pH (6.4) bằng nước. Lau khô nhẹ điện cực bằng giấy chuyên dụng (hoặc giấy mềm tương tự). Ngâm điện cực vào dung dịch đệm có pH 7,00 (5.1.1.2) để bắt đầu hiệu chuẩn.

Tráng điện cực bằng nước. Lau khô nhẹ điện cực bằng giấy chuyên dụng (hoặc giấy mềm tương tự). Ngâm điện cực vào dung dịch đệm có pH 4,00 (5.1.1.1) để kết thúc việc hiệu chuẩn. Độ dốc của đồ thị thu được phải bằng hoặc cao hơn 93 % và phần bị chặn trong khoảng từ - 30 mV đến 30 mV.

Thay mới dung dịch hiệu chuẩn hàng ngày.

8.6 Khử trùng điện cực pH bằng etanol

Khử trùng điện cực pH (6.4) bằng dung dịch etanol (5.1.5). Sau đó lau khô nhẹ điện cực bằng giấy lau chuyên dụng (hoặc giấy mềm tương tự). Sau khi lau điện cực đã sẵn sàng để làm việc.

8.7 Xử lý nhiệt để khử nhiễm điện cực

Có thể cần khử nhiễm các điện cực pH (6.4) ví dụ: khi điện cực bị nhiễm vi khuẩn. Nếu cần, tiến hành khử nhiễm điện cực pH bị nhiễm khuẩn bằng xử lý nhiệt ở 99 °C trong 30 min.

9 Cách tiến hành

9.1 Giống vi khuẩn đông lạnh

9.1.1 Rã đông các mẫu đông lạnh trước khi cấy

Lấy mẫu thử đại diện. Sử dụng 10 g ± 4 g mẫu thử đối với các sản phẩm một giống vi khuẩn. Đối với các sản phẩm chứa nhiều giống vi khuẩn, lấy khoảng một nửa sản phẩm trong mỗi hộp chứa, nghĩa là nếu hộp chứa 500 g thì lấy 250 g ± 10 g và chứa 1 000 g thì lấy 500 g ± 50 g.

Nếu sản phẩm không đồng nhất thì rã đông các hộp/túi, ví dụ: đối với các sản phẩm có nhiều lớp hoặc sản phẩm chứa một thành phần với tỷ lệ phần trăm thấp.

Chuyển mẫu thử sang một túi nhu động vô trùng. Đặt túi này vào túi bằng chất dẻo chắc chắn thứ hai. Nếu có thể, hút chân không nhẹ khỏi túi để truyền nhiệt được tốt hơn.

Làm rã đông túi và lượng chứa bên trong trên nồi cách thủy (6.3) ở 21 °C cho đến khi toàn bộ mẫu được tan chảy (ít hơn 20 min). Trong khi rã đông, quan sát mẫu và bóp túi để đảm bảo có thể lấy túi mẫu ra khỏi nồi cách thủy khi toàn bộ mẫu vừa tan hết.

Dùng khăn giấy lau khô phần ngoài túi. Bóp túi để trộn đều mẫu.

Chú ý để nhiệt độ của giống vi khuẩn rã đông không vượt quá 5 °C. Sau khi giống vi khuẩn đã rã đông, kiểm tra để chắc chắn rằng các túi không bị thủng, nhận biết túi thủng qua việc rò rỉ dung dịch nuôi cấy hoặc có nước giữa 2 lớp túi.

9.1.2 Cân và cấy giống vi khuẩn

Chia quá trình cấy ra thành hai công đoạn; lần cân thứ nhất, m_{11} , và lần cân thứ hai, m_{12} . Dựa vào quy trình hai lần cân này tính ra được lượng cấy.

Tính lượng cấy, w_1 , biểu thị bằng phần trăm, sử dụng Công thức (1):

$$w_1 = \frac{m_{11}}{m_1} \times \frac{m_{12}}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

m_1 là khối lượng của sữa và giống vi khuẩn, tính bằng gam (g);

m_2 là khối lượng của sữa và giống vi khuẩn trong dung dịch pha loãng thứ hai, tính bằng gam (g).

Giới hạn đối với lần cân riêng rẽ được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5 – Giới hạn đối với lần cân riêng rẽ

Cấy %	m_{11} g	m_{12} g
$[0,005 \text{ đến } 0,01] \pm 0,002$	1,5 đến 2,5	0,8 đến 1,5
$0,01 \pm 0,002$	1,5 đến 2,5	1,7 đến 2,9
$> 0,01 \pm 0,002^a$	> 3	1,7 đến 2,9

^a Có thể thu được tỷ lệ phần trăm cấy cao hơn bằng cách thay đổi giá trị của lần cân thứ nhất m_{11} .

9.1.3 Cấy giống vi khuẩn vào chai sữa pha loãng (lần cân thứ nhất)

Đặt chai sữa dùng để pha loãng của lần cân thứ nhất lên cân phân tích (6.1), chỉnh cân về zero. Cân mẫu đã rã đông trực tiếp trong chai sữa. Ghi khối lượng thực của giống vi khuẩn (cân lần thứ nhất), tính bằng gam, lấy đến 2 chữ số thập phân.

Trộn nhẹ sữa với giống vi khuẩn bằng cách lắc đảo chiều chai 10 lần. Để yên chai ít nhất 30 s, nhưng không quá 10 min trước khi cấy chai sữa hoạt hóa (cân lần thứ hai).

9.1.4 Cấy giống vi khuẩn vào chai sữa đã làm ấm sơ bộ (lần cân thứ hai)

Lấy chai sữa đã làm ấm sơ bộ ra khỏi nồi cách thủy (6.3) được duy trì ở nhiệt độ $30,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $40,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ hoặc $43,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ cho lần cân thứ hai. Dùng khăn giấy lau khô phần ngoài chai. Đặt chai sữa lên cân phân tích (6.1) và chỉnh cân về zero.

Trộn chai pha loãng bằng cách lắc đảo chiều chai 10 lần trước khi thực hiện lần cân thứ hai. Cân trực tiếp giống vi khuẩn từ chai pha loãng cho vào chai hoạt hóa. Ghi lại khối lượng bằng gam (lần cân thứ hai), lấy đến hai chữ số thập phân.

Cẩn thận trộn chai hoạt hóa bằng cách lắc đảo chiều chai 10 lần. Sau đó đặt chai vào nồi cách thủy (6.3) được duy trì ở $30,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $40,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ hoặc $43,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Khử trùng điện cực pH đã hiệu chuẩn bằng khăn giấy mềm (ví dụ: giấy lau ống kính) tẩm dung dịch etanol (5.1.5). Cho điện cực vào chai sữa hoạt hóa đang ấm. Cài đặt phần mềm cho phép đo pH liên tục để bắt đầu kiểm tra, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lặp lại quy trình cấy cho các mẫu và giống vi khuẩn kiểm chứng cho đến khi tất cả các mẫu được ủ.

Đặt đầu đo nhiệt độ đã hiệu chuẩn (6.6) vào chai sữa không cấy hoặc chai nước đặt trong nồi cách thủy (6.3) được duy trì ở $30,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$; $40,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ hoặc $43,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Luôn cho chạy giống vi khuẩn kiểm chứng với hoạt độ đã biết đồng thời với mẫu thử sử dụng cùng thời gian, nhiệt độ và nội cách thủy.

9.2 Sản phẩm đông khô

9.2.1 Rã đông các mẫu đông khô

Lấy mẫu thử đại diện. Để nhiệt độ của giống vi khuẩn đông khô cân bằng với nhiệt độ của phòng thử nghiệm trong khoảng 15 min trước khi mở bao gói. Sử dụng khoảng 10 g mẫu thử.

Nếu khối lượng của vật chứa nhỏ hơn 10 g thì sử dụng toàn bộ lượng chứa.

9.2.2 Cân và cấy giống vi khuẩn

Tính khối lượng vi khuẩn đích, w_t , biểu thị bằng phần trăm, theo Công thức (2):

$$w_t = \frac{m_{c0}}{m_m} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

m_{c0} , là khối lượng của hỗn hợp các giống vi khuẩn, tính bằng gam (g);

m_m là lượng xác định của sữa được cấy giống vi khuẩn, tính bằng gam (g).

Quá trình cấy được chia ra thành ba công đoạn cân: m_{11} , m_{12} và m_{13} .

Dựa vào vào ba lần cân này, tính được lượng cấy w_{td} , biểu thị bằng phần trăm, theo Công thức (3):

$$w_{td} = \frac{m_{11}}{m_1} \times \frac{m_{12}}{m_2} \times \frac{m_{13}}{m_3} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:

m_1 là khối lượng của sữa và giống vi khuẩn, tính bằng gam (g);

m_2 là khối lượng của sữa và giống vi khuẩn sau lần pha loãng thứ hai, tính bằng gam (g);

m_3 là khối lượng của sữa và giống vi khuẩn sau lần pha loãng thứ ba, tính bằng gam (g).

Giới hạn đối với lần cân riêng rẽ được nêu trong Bảng 6.

Bảng 6 – Giới hạn đối với lần cân riêng rẽ

Cỡ vật chứa g	m_{11} g	m_{13} ^a g
< 10	Toàn bộ bao gói	0,5 đến 10
> 10	10 đến 12	0,5 đến 10

^a Nếu các giới hạn đối với m_{13} bị vượt quá thì không cần pha loãng lần hai. Nó sẽ tương đương với cây $\geq 0,01\%$ (xem 9.1.2).

VÍ DỤ

Giống vi khuẩn khởi động cho 250 kg (250 000 g) sữa chứa, 12 g giống vi khuẩn. Thì mục tiêu cây, w_1 , biểu thị bằng phần trăm, được tính là:

$$w_1 = 100 \times \frac{12}{250\,000} = 0,0048$$

VỚI

$$m_{11} = 11,9 \text{ g} \quad m_1 = 218,8 \text{ g} \quad m_{12} = 10 \text{ g} \quad m_2 = 216,9 \text{ g} \quad m_{13} = 4,06 \text{ g} \quad m_3 = 211,0 \text{ g}$$

lượng cây, w_{td} , biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm là:

$$w_{td} = \frac{11,9}{218,8} \times \frac{10,0}{216,9} \times \frac{4,06}{211,0} \times 100 = 0,0048$$

9.2.3 Lần cân thứ nhất

Cân trực tiếp khoảng 10 g giống vi khuẩn cho vào túi nhu động. Thêm 1 chai (ví dụ 200 ml) sữa-A hoặc sữa-B 9,5 vào túi nhu động. Ghi lại khối lượng thực của giống vi khuẩn, m_{11} bằng gam, đến hai chữ số thập phân.

Sử dụng túi nhu động để trộn ở tốc độ 200 r/min trong 2 min. Kiểm tra huyền phù về độ đồng nhất. Nếu cần, trộn thêm túi nhu động trong 2 min. Để cho huyền phù lắng trong thời gian ít nhất 30 s, nhưng không quá 2 min, trước khi lần cân thứ hai. Tiếp tục quy trình này cho đến khi huyền phù được đồng nhất.

9.2.4 Lần cân thứ hai

Chuyển khoảng 10 g hỗn hợp từ chai pha loãng lần thứ nhất, m_{11} , cho vào chai sữa (ví dụ 200 ml). Ghi lại khối lượng thực của dịch cấy m_{12} , bằng gam, đến hai chữ số thập phân.

Nhẹ nhàng trộn sữa và giống vi khuẩn bằng cách lắc đảo chiều chai 10 lần. Để yên chai ít nhất 30 s, nhưng không quá 10 min, trước khi cấy chai sữa hoạt hóa (lần cân thứ ba).

9.2.5 Cấy giống vi khuẩn vào chai sữa hoạt hóa ấm (lần cân thứ ba)

Dựa vào lần cân thứ nhất và lần cân thứ hai, tính m_{13} bằng gam. Dùng pipet, chuyển lượng tính được vào chai sữa hoạt hóa ấm. Ghi lại khối lượng thực của dịch cấy m_{13} , lấy đến hai chữ số thập phân.

Cẩn thận trộn chai đã hoạt hóa bằng cách lắc đảo chiều 10 lần. Sau đó đặt chai vào nồi cách thủy (6.3) duy trì nhiệt độ ở $30,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $40,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc $43,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Khử trùng điện cực pH đã hiệu chuẩn bằng khăn giấy (ví dụ: giấy lau kính) đã tẩm etanol 70 %. Cho điện cực vào chai sữa hoạt hóa ấm. Cài đặt phần mềm để bắt đầu kiểm tra, tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lặp lại quy trình cấy đối với các mẫu và giống vi khuẩn kiểm chứng cho đến khi tất cả được ủ.

Cho đầu đo nhiệt độ đã hiệu chuẩn (6.6) vào chai sữa không cấy hoặc chai nước đặt trong nồi cách thủy (6.3) duy trì nhiệt độ ở $30,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $40,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc $43,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Luôn chạy giống vi khuẩn kiểm chứng có hoạt độ đã biết đồng thời với mẫu thử sử dụng cùng thời gian, nhiệt độ và nồi cách thủy.

9.3 Kết thúc phân tích

Kiểm tra đồ thị nhiệt độ của nồi cách thủy đo được bằng đầu đo nhiệt độ (6.6) đặt trong chai không cấy. Cách khác, có thể dùng nhiệt kế đã hiệu chuẩn. Việc vận hành được chấp nhận khi chênh lệch nhiệt độ trong chai không cấy luôn duy trì trong khoảng $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nhiệt độ đã định.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp này được nêu trong Phụ lục A. Các giới hạn lặp lại và tái lập đã được xác định bằng cách sử dụng ba giống vi khuẩn axit lactic dùng cho sữa có bán sẵn ở châu Âu, Bắc Mỹ và Nam Mỹ làm chua sữa tạo thành các sản phẩm sữa lên men.

Các giá trị thu được từ phép thử nghiệm liên phòng này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ, các giống vi khuẩn và các chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu, đặc biệt là các giống vi khuẩn axit lactic không axit hóa và/hoặc rất đặc.

Các dải nồng độ thử nghiệm và các đặc trưng của các giống vi khuẩn axit lactic dùng cho sữa trong các sản phẩm chọn lọc là đại diện trên thị trường và phù hợp với ISO 27205^[7].

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người phân tích, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn các giá trị nêu trong Bảng 7.

CHÚ THÍCH: Như chỉ thị về giới hạn lặp lại, r , Bảng 7 cho thấy giá trị ước tính của độ tái lập của các giống vi khuẩn axit lactic gốc khác nhau trong Tài liệu tham khảo [10]. Chi tiết hơn được nêu trong Phụ lục A.

Bảng 7 – Giới hạn lặp lại, r [t_a , pH_{4h} , pH_{6h} và pH_{16h}]

Sản phẩm	Mô tả	Thông số ^a	r^b
Mẫu 1	Giống khởi động-O ưa nhiệt trung bình của các chủng <i>Lactococcus lactis</i>	t_a	7,3
		pH_{6h}	0,039
		pH_{16h}	0,032
Mẫu 2	Giống khởi động-LD ưa nhiệt trung bình của các chủng <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> và <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	t_a	7,8
		pH_{6h}	0,062
		pH_{16h}	0,028
Mẫu 3	Giống khởi động ưa nhiệt của các chủng <i>Streptococcus thermophilus</i>	t_a	4,0
		pH_{4h}	0,048
		pH_{16h}	0,039

^a pH đo được tương ứng sau 4 h được ký hiệu là pH_{4h} ; sau 6 h là pH_{6h} và sau 16 h là pH_{16h} .

^b Các kết quả thu được từ Tài liệu tham khảo [10].

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các kỹ thuật viên khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các giá trị nêu trong Bảng 8.

CHÚ THÍCH: Như chỉ thị về giới hạn tái lập, R , Bảng 8 cho thấy giá trị ước tính của độ tái lập của các giống vi khuẩn axit lactic gốc khác nhau trong Tài liệu tham khảo [10]. Chi tiết hơn được nêu trong Phụ lục A.

Bảng 8 – Giới hạn tái lập, R [t_a , pH_{4h} , pH_{6h} và pH_{16h}]

Sản phẩm	Mô tả	Thông số ^a	r^b
Mẫu 1	Giống khởi động-O ưa nhiệt trung bình của các chủng <i>Lactococcus lactis</i>	t_a pH_{6h} pH_{16h}	21,1 0,154 0,090
Mẫu 2	Giống khởi động-LD ưa nhiệt trung bình của các chủng <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> và <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	t_a pH_{6h} pH_{16h}	12,0 0,131 0,094
Mẫu 3	Giống khởi động ưa nhiệt của các chủng <i>Streptococcus thermophilus</i>	t_a pH_{4h} pH_{16h}	6,5 0,140 0,111

^a pH đo được tương ứng sau 4 h được ký hiệu là pH_{4h} ; sau 6 h là pH_{6h} và sau 16 h là pH_{16h} .

^b Các kết quả thu được từ Tài liệu tham khảo [10].

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả, đề cập đến ít nhất:
 - $pH_{15 \text{ min}}$ là pH đo được sau 15 min, thông số này được ghi lại để đảm bảo rằng pH của sữa và điện cực đã cân bằng trước khi xác định pH để tính t_a ;
 - t_a là thời gian tính bằng phút để pH giảm đi 0,08 đơn vị pH từ giá trị pH sau 15 min (xem 3.1, Chú thích);
 - pH_{t_h} là pH đo được sau t h, ví dụ: sau 4 h, 6 h, 12 h hoặc 16 h (xem 3.1, Chú thích);
 - t_{pH_x} là thời gian đo pH_x , ví dụ: pH 4,50 (xem 3.1, Chú thích).
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu kiểm tra về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Thử liên phòng thử nghiệm – Phép thử vòng CpH

Một phép thử cộng tác liên phòng gồm có 10 phòng thử nghiệm tham gia được bố trí ở năm quốc gia thực hiện trên các giống vi khuẩn khởi động để axit hóa có bán sẵn trên thị trường phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[3] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4]. Các mẫu được chia đôi và được phân tích lặp lại hai lần.

Phép thử vòng CpH của Hiệp hội Sữa Quốc tế (IDF) do Chr. Hansen A/S, Đan Mạch tổ chức. Phương pháp bao gồm tất cả các hướng dẫn có liên quan đều được chuyển đến các thành viên tham dự. Sau khi thu thập và chuẩn bị các số liệu thu được đã được phân tích thống kê trong sự hợp tác của Nhóm Lấy mẫu và Phân tích Thống kê.

Bảng A.1 – Các kết quả của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Thông số	Mẫu 1 ^a			Mẫu 2 ^b			Mẫu 3 ^c		
	t_a	pH _{6h}	pH _{16h}	t_a	pH _{6h}	pH _{16h}	t_a	pH _{4h}	pH _{16h}
Số lượng phòng thử nghiệm	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Giá trị trung bình	110,7	5,05	4,34	116,8	5,30	4,50	65,5	5,02	4,19
Số lượng bộ dữ liệu được chấp nhận	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Số lượng kết quả được dùng để ước tính r , R	48	47	47	48	47	47	44	48	48
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	2,6	0,014	0,011	2,8	0,02	0,010	1,4	0,173	0,014
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$)	7,3	0,039	0,032	7,8	0,062	0,028	4,0	0,484	0,039
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	7,5	0,055	0,032	4,3	0,047	0,034	2,3	0,050	0,040
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$)	21,1	0,154	0,090	12,0	0,131	0,094	6,5	0,140	0,111

^a Giống khởi động-O ưa nhiệt trung bình của các chủng *Lactococcus lactis*.

^b Giống khởi động-LD ưa nhiệt trung bình của các chủng *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mensesteriodes* và *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

^c Giống khởi động ưa nhiệt của các chủng *Streptococcus thermophilus*.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
 - [2] ISO 8244-1, *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu – Phần 1: Thuật ngữ chung về thống kê và thuật ngữ dùng trong xác suất.*
 - [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] 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*
 - [6] TCVN 9332 (ISO/TS 19036), *Vi sinh vật thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn ước lượng độ không đảm bảo đo đối với các phép phân tích định lượng.*
 - [7] TCVN 9633 (ISO 27205), *Sản phẩm sữa lên men – Giống vi khuẩn khởi động – Tiêu chuẩn nhận dạng*
 - [8] IDF GROUP B39 – SPRAY DRYING OF MILK. IDF recommendations for the hygienic manufacture of spray-dried milk powders, Bull. IDF 1991, (267), pp. 1-24.
 - [9] IDF GROUP E 104 – LACTIC ACID BACTERIA AND STARTERS. IDF Guideline – Determination of acidifying activity of dairy cultures. Bull. IDF 1995, (306), p.3
 - [10] CpH-ringtrial 2008 (Paper presented at IDF/ISO Analytical Meeting, Montreux, 2008). Bull IDF (in press)
-