TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9633:2013

ISO 27205:2010

Xuất bản lần 1

SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN – GIỐNG VI KHUẨN KHỞI ĐỘNG – TIÊU CHUẨN NHẬN DẠNG

Fermented milk products – Bacterial starter cultures – Standard of identity

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9633:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 27205:2010/IDF 149:2010;

TCVN 9633:2013 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 lên men – Giống vi khuẩn khởi động – Tiêu chuẩn nhận dạng

Fermented milk products – Bacterial starter cultures – Standard of identity

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định đặc tính của các giống vi khuẩn khởi động dùng trong công nghiệp, chủ yếu là vi khuẩn lactic, ngoài ra còn bao gồm vi khuẩn propionic và vi khuẩn bifidus, được sử dụng để sản xuất các sản phẩm sữa lên men như sữa chua (yoghurt), cream chua, bơ lên men và phomat.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho các giống vi khuẩn được bổ sung như một thành phần thực phẩm chỉ vì các đặc tính probiotic của chúng.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Giống vi khuẩn khởi động (bacterial starter culture)

Giống vi khuẩn được chuẩn bị, có chứa một hoặc một số chủng vi sinh với số lượng lớn (số vi khuẩn sống nhiều hơn 10^8 CFU/g hoặc 10^8 CFU/ml), được bổ sung vào để tạo phản ứng enzym mong muốn (ví dụ: lên men lactose tạo thành trong quá trình sinh axit, phân hủy axit lactic thành axit propionic hoặc các hoạt động chuyển hóa khác liên quan trực tiếp đến các đặc tính của sản phẩm cụ thể).

VÍ DỤ: Các giống vi khuẩn khởi động quan trọng nhất gồm vi khuẩn lactic (2.2), vi khuẩn propionic (2.3) và vi khuẩn bifidus (2.4) được mô tả trong tiêu chuẩn này.

2.2

Vi khuẩn lactic (lactic acid bacterium)

LAB

Vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh bào tử, âm tính với catalase, nitrate-reductase và cytochrome oxidase, không hóa lỏng gelatin hoặc sinh indol.

CHÚ THÍCH: LAB có chuyển hóa lên men mà chủ yếu là phân tách đường. Axit lactic là sản phẩm cuối chủ yếu của sự phân hủy cacbohydrat.

VÍ DỤ: Các LAB quan trọng trong công nghiệp chế biến sữa là:

Streptococcus thermophilus	*Lactococcus lactis*	*Pediococcus*
Enterococcus	*Leuconostoc*	*Lactobacillus*

2.3

Vi khuẩn propionic (propionibacterium)

Vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh bào tử, thông thường catalase dương tính, trực khuẩn đa hình sinh trưởng trong điều kiện kị khí đến kị khí tùy nghi, thường là dạng tương tự vi khuẩn bạch hầu hoặc có hình chùy và cũng có thể có hình cầu, dạng hai nhánh hoặc dạng chùm.

CHÚ THÍCH: Vi khuẩn propionic là loại sinh dưỡng hóa học và các sản phẩm lên men của chúng gồm một lượng lớn axit propionic, axit axetic và cacbon dioxit. Nhiệt độ phát triển tối ưu của chúng nằm trong khoảng từ 30 °C đến 37 °C.

2.4

Vi khuẩn bifidus (bifidobacterium)

Vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh bào tử, catalase âm tính, thường có dạng chùm hoặc dạng que và có những thuộc tính kị khí.

CHÚ THÍCH: Vi khuẩn bifidus là loại sinh dưỡng hóa học, lên men đường tạo ra axit axetic và axit lactic. Nhiệt độ phát triển tối ưu của chúng nằm trong khoảng từ 37 °C đến 41 °C. Các trực khuẩn sắp xếp đơn lẻ, thành cặp và thành hình chữ V, thành chuỗi, thành hàng rào hoặc các tế bào song song hoặc thành hình hoa thị, rất ít khi rộng thành dạng hình cầu.

2.5

Tiêu chí an toàn thực phẩm (food safety criterion)

Điều kiện xác định khả năng chấp nhận của sản phẩm hoặc mẻ thực phẩm áp dụng cho các sản phẩm lưu thông trên thị trường.

CHÚ THÍCH: Xem Tài liệu tham khảo [18].

2.6

Tiêu chí vệ sinh quá trình (process hygiene criterion)

Điều kiện xác định sự vận hành có thể chấp nhận được của quá trình sản xuất nhưng không áp dụng cho các sản phẩm lưu thông trên thị trường, xác lập giá trị ô nhiễm chỉ thị cao hơn mức này cần phải

có các hành động khắc phục nhằm duy trì điều kiện vệ sinh của quá trình sao cho phù hợp với các quy định về an toàn thực phẩm.

CHÚ THÍCH: Xem Tài liệu tham khảo [18].

3 Nguyên tắc

Mô tả về đặc tính của các giống vi khuẩn khởi động về thành phần vi khuẩn, nồng độ tế bào, các chất nhiễm bẩn, việc quản lý chất lượng và an toàn, thông tin về sản phẩm, đồng thời cung cấp danh mục các phương pháp phân tích để đánh giá sự phù hợp.

4 Mô tả các giống vi khuẩn khởi động

4.1 Phân nhóm theo loại và số lượng chủng vi khuẩn

4.1.1 Giống khởi động đơn chủng

Giống khởi động đơn chủng là giống khởi động chỉ chứa một chủng của một loài xác định.

4.1.2 Giống khởi động đa chủng, đơn loài

Giống khởi động đa chủng, đơn loài là giống khởi động có chứa nhiều hơn một chủng thuộc cùng một loài. Giống vi khuẩn khởi động đa chủng, đơn loài cũng có thể là giống khởi động chủng hỗn hợp không xác định.

4.1.3 Giống khởi động đa loài

Giống khởi động đa loài là giống khởi động có chứa nhiều hơn một loài. Giống khởi động đa loài cũng có thể chứa một hoặc nhiều chủng của mỗi loài. Nó cũng có thể là giống khởi động đa loài không xác định.

4.2 Phân nhóm theo nhiệt độ áp dụng

4.2.1 Giống khởi động là vi khuẩn ưa nhiệt trung bình

Giống khởi động là vi khuẩn ưa nhiệt trung bình được sử dụng trong dải nhiệt độ từ 18 °C đến 37 °C. Các chủng ưa nhiệt trung bình được sử dụng rộng rãi trong sản xuất phomat và trong các sản phẩm sữa lên men khác như buttermilk và cream chua.

Các vi khuẩn sau đây là các ví dụ về các vi khuẩn ưa nhiệt trung bình và có thể sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp làm giống khởi động như quy định trong 4.1.1 đến 4.1.3.

Lactoc. lactis	*Lactob. rhamnosus*
Leucon. mesenteroides	*Propionibacterium freudenreichii*
Pedioc. pentosaceus	*Bifidobacterium animalis*
Lactob. casei	*Bifidob. longum* subsp. *longum*
Lactob. paracasei	*Brevibacterium linens*

Ví dụ về giống khởi động ưa nhiệt trung bình đơn loài và đa loài được nêu trong Bảng 1. LAB ưa nhiệt trung bình có thể phân biệt được dựa vào sự chuyển hóa của chúng. Giống-O có khả năng lên men đồng nhất và chỉ sinh axit lactic. Các giống L-, D- và DL- là các vi khuẩn xitrat dương tính, sinh axit lactic đặc trưng kèm theo các hợp chất bay hơi với mùi đặc trưng, như etanol, axetaldehyd, diaxetyl và axetat và/hoặc cacbon dioxit trong quá trình lên men. Vi khuẩn axit hóa và các loài *Leuconostoc* có trong các giống L-, trong khi giống D- gồm các vi khuẩn axit hóa và biovar *diacetylactis*. Các giống DL- gồm giống L- và giống D-.

Bảng 1 – Các ví dụ về các giống khởi động LAB đơn loài và đa loài ưa nhiệt trung bình

Dạng		Ví dụ
O	Đơn loài	*Lactoc. lactis* subsp. *lactis* và/hoặc *Lactoc. lactis* subsp. *cremoris*
L	Đa loài	*Lactoc. lactis* subsp. *lactis* và/hoặc *Lactoc. lactis* subsp. *cremoris*, ngoài ra còn có các chủng *Leuconostoc* ví dụ: *Leucon. mesenteroides* subsp. *cremoris, Leucon. lactis, Leucon. mesenteroides* subsp. *dextranicum* và *Leucon. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*
D	Đơn loài	*Lactoc. lactis* subsp. *lactis* và/hoặc *Lactoc. lactis* subsp. *cremoris*, ngoài ra còn có các chủng *Lactoc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
DL	Đa loài	*Lactoc. lactis* subsp. *lactis* và/hoặc *Lactoc. lactis* subsp. *cremoris*, ngoài ra còn có các chủng *Lactoc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* và các chủng *Leuconostoc* (ví dụ: *Leucon. mesenteroides* subsp. *cremoris, Leucon. lactis, Leucon. mesenteroides* subsp. *dextranicum* và *Leucon. mesenteroides* subsp. *mesenteroides)*

4.2.2 Giống khởi động là vi khuẩn ưa nhiệt

Giống khởi động là vi khuẩn ưa nhiệt được sử dụng trong dải nhiệt độ từ 30 °C đến 45 °C. Các giống này được sử dụng trong sản xuất sữa lên men như yoghurt và một số loại pho mát như Emmental, Grana.

Các vi khuẩn sau đây là ví dụ về vi khuẩn axit hóa ưa nhiệt và có thể sử dụng làm giống khởi động:

Strep. thermophilus	*Lactob. acidophilus*	*Bifidob. adolescentis*
E. faecium	*Lactob. fermentum*	*Bifidob. longum* subsp. *infantis*
Lactob. helveticus	*Lactob. gasseri*	*Bifidob. bifidum*
Lactob. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	*Lactob. reuteri*	*Brevib. breve*
Lactob. delbrueckii subsp. *lactis*	*Lactob. rhamnosus*	

Các vi khuẩn ưa nhiệt liệt kê trên đây có thể sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp làm giống khởi động như quy định trong 4.1.1 đến 4.1.3.

Các ví dụ về các giống khởi động ưa nhiệt đơn loài là *Lactob. acidophilus* và *Lactob. helveticus*. Ví dụ vi khuẩn khởi động ưa nhiệt đa loài (4.1.3) là yoghurt chứa *Strep. thermophilus* và *Lactob. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

4.3 Phân nhóm theo trạng thái vật lý

Giống khởi động có thể ở một trong các trạng thái vật lý sau:

a) dạng lỏng;

b) dạng đông lạnh;

c) dạng khô.

5 Thành phần cơ bản

5.1 Yêu cầu chung

Các tiêu chí vi sinh được quy định trong 5.2 và 5.3 được khuyến cáo đối với các sản phẩm lưu hành trên thị trường trong thời hạn sử dụng.

Danh mục các phương pháp khuyến cáo sử dụng để phân tích tiêu chí vi sinh được nêu trong Phụ lục A.

5.2 Vi khuẩn sống

Số lượng tế bào sống được biểu thị bằng số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một gam phải đáp ứng các yêu cầu tối thiểu do nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp giống khởi động công bố.

Nhìn chung, các giống vi khuẩn khởi động (2.1) chứa số vi khuẩn sống nhiều hơn 10^8 CFU/g hoặc 10^8 CFU/ml. Đối với các ứng dụng nhất định, việc kiểm tra hoạt tính axit hóa, cấu trúc, mật độ quang,

đếm tế bào theo dòng chảy hoặc các công nghệ kiểm tra mới khác thay thế cho việc kiểm tra tế bào sống có thể thích hợp hơn.

5.3 Chất nhiễm bẩn

Nhà sản xuất phải thiết lập các biện pháp kiểm soát để tránh khả năng nhiễm bẩn, phù hợp với 6.2.

Giống khởi động phải phù hợp với các yêu cầu nêu trong Bảng 2. Các tiêu chí vi sinh, các quy định kỹ thuật đối với vệ sinh quá trình và các tiêu chí an toàn thực phẩm đã được thiết lập để xác định khả năng chấp nhận đối với các quá trình và đối với sản phẩm thực phẩm.

Độ nhạy của các phương pháp phân tích sẵn có (xem Phụ lục A) cũng đã được xem xét đến khi thiết lập các yêu cầu.

Bảng 2 – Các yêu cầu

Loại tiêu chí	Chất nhiễm bẩn[a]	Đơn vị	Dạng lỏng hoặc đông lạnh	Dạng khô
Vệ sinh quá trình	Vi khuẩn không sinh axit lactic [b]	CFU/g	< 500	< 500
	Nấm men và nấm mốc	CFU/g	< 1	< 10
	Enterobacteriaceae	CFU/g	< 1	<10
	Staphylococci dương tính coagulase	CFU/g	< 1	< 10
An toàn thực phẩm	*Salmonella* spp.	Có/không có trong 1 g	Không có	Không có
	Listeria monocytogenes	Có/không có trong 1 g	Không có	Không có

[a] Các chất nhiễm bẩn cần được kiểm tra trong môi trường chế biến và trong mẫu lấy từ quá trình chế biến hoặc mẫu sản phẩm. Các mẫu môi trường khi so với mẫu lấy từ quá trình chế biến hoặc mẫu sản phẩm phải dựa trên các nguyên tắc HACCP (theo 6.2) và phù hợp với các yêu cầu nêu trên.

[b] Tiêu chí này chỉ được coi chất nhiễm bẩn trong các giống chỉ chứa vi khuẩn lactic.

Các tiêu chí thử nghiệm vi sinh khác hoặc các nồng độ khác với quy định trong Bảng 2 có thể có liên quan tùy thuộc vào việc sử dụng giống khởi động.

Nhà sản xuất phải thiết lập các biện pháp kiểm soát nhằm ngăn ngừa khả năng nhiễm bẩn chéo từ các sản phẩm khác có thể làm ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm.

Cũng phải đánh giá xem có cần kiểm tra nhiễm chéo trên sản phẩm, mẫu lấy từ quá trình chế biến hoặc môi trường chế biến hay không.

6 Quản lý chất lượng và an toàn thực phẩm

6.1 Quản lý chất lượng

Để kiểm soát thành phần chính của giống khởi động, nhà sản xuất phải xây dựng, thực hiện và duy trì hệ thống quản lý chất lượng.

6.2 Quản lý an toàn thực phẩm

Để kiểm soát thành phần chính của giống khởi động, nhà sản xuất phải xây dựng, thực hiện và duy trì thường xuyên một hoặc nhiều quy trình dựa trên các chương trình tiên quyết và các nguyên tắc phân tích mối nguy và điểm kiểm soát tới hạn (HACCP) (xem TCVN ISO 22000[16]).

6.3 Chất lượng sản phẩm

Để bảo đảm phù hợp với các mức quy định trong 5.2 và 5.3, chất lượng sản phẩm phải bảo đảm an toàn và được lập thành văn bản theo 6.1 và 6.2.

7 Thông tin về sản phẩm

7.1 Ghi nhãn

Việc ghi nhãn phải phù hợp với các quy định hiện hành.

Trên nhãn sản phẩm phải có các thông tin sau:

a) tên sản phẩm;

b) loại sản phẩm (ví dụ: giống ưa nhiệt trung bình) hoặc thành phần vi khuẩn phù hợp với danh pháp khoa học quốc tế (ví dụ: xem Tài liệu tham khảo [19]) và phù hợp với những nội dung quy định tại Điều 4 (tùy chọn);

c) dạng sản phẩm (ví dụ: đông khô, cô đặc);

d) khối lượng tịnh được ghi bằng một trong các đơn vị sau: gam, mililit, đơn vị, liều lượng (phù hợp với quy định của luật có thể áp dụng);

e) tên và địa chỉ của nhà sản xuất, nhà đóng gói, nhà phân phối, nhà nhập khẩu, nhà xuất khẩu hoặc nhà cung cấp;

f) tên nước sản xuất (tùy chọn);

g) mã và nhận biết lô hàng;

h) hạn sử dụng (tháng và năm);

i) điều kiện bảo quản.

7.2 Dữ liệu kỹ thuật

Các thông tin sau đây phải cung cấp cho người sử dụng:

a) lĩnh vực sử dụng;

b) hướng dẫn sử dụng (nồng độ cấy, nhiệt độ ủ v.v...);

c) thành phần (loại vi khuẩn, giống khởi động v.v... phù hợp với mô tả trong 4.1 đến 4.3);

d) chứng chỉ phân tích, chứng chỉ phù hợp hoặc tương tự.

8 Phương pháp phân tích

Các phương pháp phân tích khuyến cáo được nêu trong Phụ lục A.

Nhìn chung, các phương pháp phân tích khuyến cáo đối với các chất nhiễm bẩn chưa được đánh giá xác nhận đối với các giống vi khuẩn khởi động, nhưng đã được đánh giá xác nhận đối với thực phẩm. Do đó, các phương pháp này phải được nhà sản xuất đánh giá xác nhận, khi thích hợp. Có thể sử dụng các phương pháp khác khi đã được đánh giá xác nhận, do đó Phụ lục A chỉ dùng để tham khảo.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Các phương pháp phân tích được khuyến cáo

A.1 Chuẩn bị mẫu

Nên sử dụng các nguyên tắc quy định trong TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) [3].

A.2 Phương pháp định lượng vi khuẩn lactic trong các giống khởi động

A.2.1 Định lượng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Nên sử dụng phương pháp thạch MRS quy định trong TCVN 8177 (ISO 7889)[7].

A.2.2 Định lượng *Lactobacillus acidophilus*

Nên sử dụng phương pháp thạch MRS với clindamycin và ciprofloxacin quy định trong TCVN 7849 (ISO 20128)[15].

A.2.3 Định lượng *Enterococcus faecium*, pediococci và lactobacilli

Nên sử dụng phương pháp thạch MRS quy định trong TCVN 8177 (ISO 7889)[7].

Độ pH của môi trường phải trong khoảng từ 6,0 đến 6,4. Phải tiến hành ủ trong điều kiện kị khí ở 37 °C ± 1 °C trong thời gian 72 h.

A.2.4 Định lượng lactococci và *Streptococcus thermophllus*

Nên sử dụng phương pháp thạch M-17 quy định trong TCVN 8177 (ISO 7889)[7].

A.2.4.1 pH của thạch M-17

Độ pH của thạch M-17 (sau khi khử trùng) phải là 7,2 (M-$17_{7,2}$) đối với lactococci và phải là 6,8 (M-$17_{6,8}$) đối với *Strep. thermophilus*.

A.2.4.2 Quy trình đổ đĩa

Trộn các dung dịch pha loãng thích hợp với môi trường tan chảy để nguội về 44°C đến 47°C. Sau khi đông đặc, lật ngược đĩa Petri và ủ trong điều kiện hiếu khí ở 30 °C ± 1 °C trong 72 h đối với lactococci và ở 37 °C ± 1 °C trong 48 h đối với *Strep. thermophilus*.

Đối với các giống khởi động đa loài chứa *Strep. thermophilus* và lactococci, ủ hiếu khí 48 h ở 45 °C ± 1 °C tại M-$17_{6,8}$ đối với *Strep. thermophilus* và ủ hiếu khí trong 5 ngày ở 20 °C ± 1 °C tại M-$17_{7,2}$ đối với lactococci.

A.2.4.3 Đọc các đĩa Petri

Sau khi ủ, đếm tất cả các khuẩn lạc. Nếu giống khởi động là đa loài thì sử dụng phương pháp kiểm tra vi phân (ví dụ: phát triển ở các nhiệt độ khác nhau) để xác định chính xác các khuẩn lạc lactococci hoặc *Strep. thermophilus*.

A.2.5 Định lượng vi khuẩn lactic lên men xitrat

Nên sử dụng phương pháp Nickels và Leesment quy định trong TCVN 8104 (ISO 17792)[10].

A.2.6 Định lượng *Leuconostoc* spp.

Nên sử dụng phương pháp Nickels và Leesment có bổ sung vancomycin quy định trong TCVN 8104 (ISO 17792)[10].

A.3 Phương pháp định lượng *Propionibacterium* spp. trong các giống khởi động

Nên sử dụng môi trường chất chiết nấm men-lactat cải biến mô tả trong Tài liệu tham khảo [20].

A.4 Phương pháp định lượng *Bifidobacterium* spp. trong các giống khởi động

Nên sử dụng phương pháp dùng môi trường thạch TOS chứa mupirocin quy định trong TCVN 9635 (ISO 29981)[17].

A.5 Phương pháp phát hiện và định lượng các chất nhiễm bẩn

Chú ý khi sử dụng các tiêu chuẩn quy định trong điều này, các giống khởi động có thể làm giảm pH đến mức có thể ức chế các chất nhiễm bẩn (các sinh vật đích), do đó có thể cần trung hòa. Đây được xem như một phần của việc đánh giá xác nhận của phương pháp đối với các sản phẩm liên quan.

A.5.1 Định lượng vi khuẩn không sinh axit lactic

Nên sử dụng phương pháp quy định trong TCVN 8155 (ISO 13559)[9].

A.5.2 Định lượng nấm men và nấm mốc

Nên sử dụng các phương pháp quy định trong TCVN 6265 (ISO 6611)[1], TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)[11] và TCVN 8275-2 (ISO 21527-2)[12]).

CHÚ THÍCH: Có thể áp dụng TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)[11] và TCVN 8275-2 (ISO 21527-2)[12] thay cho TCVN 6265 (ISO 6611)[1].

A.5.3 Định lượng Enterobacteriaceae

Nên sử dụng phương pháp quy định trong TCVN 5518-1 (ISO 21528-1)[13] và TCVN 5518-2 (ISO 21528-2)[14].

A.5.4 Định lượng staphylococci dương tính coagulase

Nên sử dụng phương pháp quy định trong TCVN 4830-1 (ISO 6888-1)[4], TCVN 4830-2 (ISO 6888-2)[5] và TCVN 4830-3 (ISO 6888-3)[6].

A.5.5 Phát hiện *Salmonella* spp.

Nên sử dụng phương pháp quy định trong TCVN 6402 (ISO 6785)[2].

Để phát hiện *Salmonella* spp. trong các chất nền có vi khuẩn lactic và vi khuẩn bifidus, thường phải cải biến thành phần của canh thang tiền tăng sinh để bảo đảm rằng các axit hữu cơ do các vi khuẩn khởi động sinh ra và các chất đồng hành làm giảm pH không giết chết *Salmonella* spp. Việc cải biến này phụ thuộc vào kiểu loại cũng như số lượng vi khuẩn lactic có mặt.

Các hướng dẫn sau đây được đưa ra dựa vào nghiên cứu thực hiện trên một số giống khởi động. Tùy thuộc vào chủng và số lượng vi khuẩn, có thể cần sửa đổi hướng dẫn cho phù hợp.

a) Đối với các chất nền chứa số vi khuẩn lactic hoặc vi khuẩn bifidus đến 10^8 CFU/g: sử dụng nước đệm pepton (BPW) có bổ sung vancomycin (10 mg/l). Lọc để khử trùng, nhưng việc lọc khử trùng lại không phù hợp đối với vi khuẩn lactic và vi khuẩn bifidus bền với vancomycin.

b) Đối với các chất nền chứa số vi khuẩn lactic hoặc vi khuẩn bifidus đến 10^{11} CFU/g: sử dụng nước pepton (BPW) nồng độ gấp hai lần có bổ sung vancomycin (10 mg/l), xanh malachit (40 mg/l) và sữa (10 g/l). Thay vì sử dụng BPW nồng độ gấp hai lần, có thể sử dụng BPW trong đó chỉ có nồng độ dung dịch đệm phosphat được tăng hai lần so với BPW chuẩn.

c) Đối với các chất nền chứa nhiều hơn 10^{11} CFU/g: sử dụng BPW nồng độ gấp hai lần có bổ sung vancomycin (10 mg/l), xanh malachit (40 mg/l) và sữa (10 g/l) (Xem Chú thích). Sử dụng hệ số pha loãng cao hơn để bảo đảm rằng mức tối đa vi khuẩn lactic hoặc vi khuẩn bifidus trong canh thang tiền tăng sinh không vượt quá 10^{10} CFU/ml, tại thời điểm ngay sau khi cho mẫu vào canh thang tiền tăng sinh.

CHÚ THÍCH: Việc bổ sung sữa chỉ cần thiết đối với các chất nền không chứa sữa. Việc bổ sung sữa là cần thiết để giảm độc tính của xanh malachit đối với *Salmonella*.

A. 5.6 Phát hiện *Listeria monocytogenes*

Nên sử dụng phương pháp quy định trong TCVN 7700-1 (ISO 11290-1)[8].

Để kiểm tra các vi sinh vật gây bệnh, pha loãng 1 g mẫu thử với 25 g dịch pha loãng vô trùng thích hợp. Trộn kỹ hỗn hợp và thêm 225 g môi trường canh thang có nồng độ thích hợp để đạt được tổng khối lượng là 250 g. Đảm bảo đúng nồng độ các chất chọn lọc trong canh thang.

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] TCVN 6265 (ISO 6611), *Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ nấm men và/hoặc nấm mốc – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C*

[2] TCVN 6402 (ISO 6785), *Sữa và sản phẩm sữa – Phát hiện Salmonella*

[3] 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 sữa*

[4] TCVN 4830-1 (ISO 6888-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính coagulase (Staphylococcus aureus và các loài khác) trên đĩa thạch – Phần 1: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch Baird-Parker*

[5] TCVN 4830-2 (ISO 6888-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính coagulase (Staphylococcus aureus và các loài khác) trên đĩa thạch – Phần 2: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch fibrinogen huyết tương thỏ*

[6] TCVN 4830-3 (ISO 6888-3), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Staphylococci có phản ứng dương tính với coagulase (Staphylococcus aureus và các loài khác) trên đĩa thạch – Phần 3: Phát hiện và dùng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN) để đếm số lượng nhỏ.*

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

[8] TCVN 7700-1 (ISO 11290-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Listeria monocytogenes – Phần 1: Phương pháp phát hiện*

[9] TCVN 8155 (ISO 13559), *Bơ, sữa lên men và phomát tươi – Định lượng các vi sinh vật nhiễm bẩn – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C*

[10] TCVN 8104 (ISO 17792), *Sữa, sản phẩm sữa và các chủng khởi động ưa ấm – Định lượng vi khuẩn lactic lên men xitrat – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C*

[11] TCVN 8275-1 (ISO 21527-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95*

[12] TCVN 8275-2 (ISO 21527-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95*

[13] TCVN 5518-1 (ISO 21528-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Enterobactericeae – Phần 1: Phát hiện và định lượng bằng kỹ thuật MPN có tiền tăng sinh*

[14] TCVN 5518-2 (ISO 21528-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Enterobacteriaceae – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*

[15] TCVN 7849 (ISO 20128), *Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng Lactobacillus acidophilus giả định trên môi trường chọn lọc – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C*

[16] TCVN ISO 22000 (ISO 22000), *Hệ thống quản lý an toàn thực phẩm – Yêu cầu đối với các tổ chức trong chuỗi thực phẩm*

[17] TCVN 9635 (ISO 29981), *Sản phẩm sữa – Định lượng vi khuẩn bifidus giả định – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C*

[18] Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. EU* 2005, **L338**, pp. 1-26

[19] GARRITY, G.M., DE Vos, P. et al., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology,* 2nd edition, 3 vols. New York, NY: Springer, 2001; 2005; 2009

[20] MALIK, A.C., REINBOLD, G.W., VEDAMUTHU, E.R. An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium. Can. J. Microbiol.* 1968, **14**, pp. 1185-1191

[21] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Health benefits and safety evaluation of certain food components. *Bull. Int. Dairy Fed.* 2002, (377).