

LACTICASEIBACILLUS CASEI

Định nghĩa

Lactocaseibacillus casei (trước đây gọi là *Lactobacillus casei*) là vi khuẩn sinh acid lactic, Gram dương, hình que, không sinh bào tử, vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tùy tiện, lên men đồng hình. Tế bào không di động, thường thẳng và đứng thành cặp hoặc chuỗi có độ dài khác nhau. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau khi lên men trước khi đông lạnh rồi đông khô sản phẩm đó. Các chất độn hay tá dược pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành có số lượng vi khuẩn sống *Lactocaseibacillus casei* không được ít hơn 100% so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng Lc-11: *Lactocaseibacillus casei* Lc-11 (ATCC SD- 5213) là chủng *Lactocaseibacillus casei* đặc hiệu, thuần chủng, sản phẩm lên men có 5 % D-lactat, 95 % L-lactat.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng với chủng *Lactocaseibacillus casei* Lc-11.

Định tính

A. Định tính bằng kính hiển vi

Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Định lượng và nhuộm soi dưới kính hiển vi

Tiêu chuẩn chấp nhận: trực khuẩn hình que, thẳng, đứng thành cặp hoặc chuỗi có độ dài khác nhau

B. Phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic

Các hóa chất, dung môi sử dụng trong kỹ thuật PCR phải đạt chất lượng quy định trong Phụ lục 1.26.

Hỗn dịch mẫu: Chuẩn bị hỗn dịch mẫu probiotic trong dung dịch đệm *TE 1X (TT)* có nồng độ 100 mg/ml

Cặp mồi: Mồi xuôi (5'-3') TGCCCATAGCATACTGGACC và mồi ngược (5'-3') ACCCGAGCCTTTGCCAA. Pha loãng mồi bằng dung dịch đệm đến nồng độ 100 µM, tiếp tục pha loãng bằng dung dịch đệm đến nồng độ 25 µM, bảo quản ở -20 °C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 12 µL PCR master mix¹, 1 µL dung dịch mồi xuôi (25 µM), 1 µL dung dịch mồi ngược (25 µM) và 10 µL nước vô khuẩn, 1 µL mẫu thử.

Mẫu chứng âm: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 µL nước vô khuẩn.

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 µL khuôn DNA của chủng chuẩn *Lactocaseibacillus casei* Lc-11 hoặc thay thế cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Lactocaseibacillus casei* Lc-11 bằng cặp mồi đặc trưng cho loài *Lactocaseibacillus casei*.

Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương với cùng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 7 min; Bước 2: ủ ở 95 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở 57 °C trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 1 min. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C. **Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Lactocaseibacillus casei* Lc-11 bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Lactocaseibacillus casei* thì phải chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mồi được chọn.**

Phân tích sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm bằng hệ thống điện di tự động kèm bộ kit DNA (automated on-chip electrophoresis system). Tiến hành điện di theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngoài ra, có thể tiến hành phương pháp điện di gel. Sử dụng gel agarose (TT) 2 % (kl/tt) trong dung dịch đệm *TAE 1X (TT)*. Nhuộm gel bằng dung dịch *ethidium bromid* (TT) 0,5 mg/mL và tiếp tục rửa gel bằng nước. Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel phù hợp khác.

Thận trọng: *Ethidium bromid* (TT) là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến. Sử dụng thiết bị bảo hộ cá nhân thích hợp (đeo găng tay nitril) khi tiếp xúc thuốc thử này.

Sử dụng thang chuẩn DNA phù hợp để xác định kích thước của các băng điện di DNA được nhân bản bởi các cặp mồi đặc hiệu. Để thuận lợi cho việc so sánh kích thước các sản phẩm khuếch đại gen, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên bản gel.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với số cặp base đặc hiệu như ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận nếu sử dụng khuôn DNA của chủng chuẩn. Nếu sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài, kết quả phản ứng PCR phải có sản phẩm khuếch đại tương ứng với cặp mồi theo các tài liệu đã công bố.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại nào. Nếu kết quả không như mong đợi, tiến hành lại phản ứng PCR với các mẫu thử, mẫu chứng âm, mẫu chứng dương.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 176 cặp base.

Định lượng

Tiến hành theo chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26, mục Định lượng các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Lactocaseibacillus casei*.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn *Lactocaseibacillus casei* Lc-11 không được ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn. Số lượng vi khuẩn được ghi theo đơn vị CFU/g.

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Tổng số nấm: Không quá 10^2 CFU/g (Phụ lục 13.6).

Tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic: Không quá 5×10^3 CFU/g (Phụ lục 1.26).

Escherichia coli : Không được có trong 10 g (Phụ lục 13.6).

Salmonella: Không được có trong 40 g (Phụ lục 13.6).

Listeria: Không được có trong 25 g (Phụ lục 1.26).

Bảo quản

Bảo quản trong bao bì có chất liệu phù hợp, kín, bền chắc, không quá 4 °C.

Ghi nhãn

Phải ghi tên chi, loài, chủng và số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/g hoặc CFU/liều hoặc tương đương trên nhãn sản phẩm.

¹ AmpliTaq Gold 360 Master Mix của ThermoFisher Scientific (www.thermofisher.com) hoặc tương đương.