

BACILLUS COAGULANS

Định nghĩa

Bacillus coagulans là vi khuẩn sinh acid lactic, Gram dương, hình que, sinh bào tử, hiếu khí đến vi hiếu khí. Nguyên liệu *Bacillus coagulans* chứa bào tử của các chủng được chỉ định thuộc loài *Bacillus coagulans*. Các tá dược như chất độn hay chất pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành phải có không ít hơn 100% số lượng vi khuẩn sống *Bacillus coagulans* so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng GBI-30, 6086: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6080 là chủng đặc trưng và thuần chủng thuộc loài *Bacillus coagulans*.

Chủng Unique IS-2: *Bacillus coagulans* Unique IS-2 là chủng đặc trưng và thuần chủng thuộc loài *Bacillus coagulans*.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng cho chủng *Bacillus coagulans* GBI-30, 6080 và chủng *Bacillus coagulans* Unique IS-2.

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: Các bào tử nhỏ, hình bầu dục, có thể co rút và ở cuối mỗi tế bào sinh dưỡng hình que. Số lượng tế bào sinh dưỡng có bào tử tùy thuộc vào điều kiện sinh trưởng.

B. Phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic

Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TAE 1X: Xem phụ lục 1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.

Thuốc thử pha mẫu: Sử dụng thuốc thử PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent¹. Có thể sử dụng phương pháp chiết DNA trực tiếp hoặc bộ kit tách chiết DNA vi khuẩn phù hợp khác.

Dung dịch mẫu DNA: Lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch BC cao nấm men glucose (Glucose Yeast Extract BC agar) thu được trong mục Định lượng. Lấy 100 µl thuốc thử pha mẫu vào ống ly tâm 2,0 ml có nắp vặn. (Lưu ý: Quá trình lấy thuốc thử pha mẫu được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Dùng que cấy vô khuẩn lấy các tế bào từ một khuẩn lạc bề mặt và phân tán vào thuốc thử pha mẫu trong ống. Đậy nắp ống và trộn đều bằng máy lắc xoáy trong 10 đến 30 s hoặc cho đến khi tế bào phân tán thành hỗn dịch đồng nhất trong thuốc thử pha mẫu. Đun nóng hỗn dịch trong bể ổn nhiệt ở 100 °C trong 10 min, sau đó ly tâm hỗn dịch trên ở 16000 × g trong 3 min. Chuyển phần dịch nổi phía trên sang một ống ly tâm mới. Dung dịch này chứa DNA của *Bacillus coagulans*. Trước khi tiến hành thử nghiệm, pha loãng dung dịch DNA sau tách chiết bằng nước vô khuẩn để thu được dung dịch mẫu DNA có nồng độ như yêu cầu trong bảng 2.

Cập mẫu : Xem Bảng 1.

Bảng 1: Các cặp mồi và tiêu chuẩn chấp nhận

Chủng	Cặp mồi	Trình tự mồi	Tiêu chuẩn chấp nhận*
GBI - 30, 6086	Cặp mồi 301	Mồi xuôi (5'-3') AAGAAGTGGATGTGGGCCGTTC Mồi ngược (5'-3') CTTTTGCCATGCCAGCATCC Nhiệt độ biến tính của cặp mồi: 65,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 376 đến 399 cặp base.
	Cặp mồi 210243	Mồi xuôi (5'-3') GCCTGATGCAGGGCTTTTCCT Mồi ngược (5'-3') CCGTCCGCTTCCGTTAAGCCG Nhiệt độ biến tính của cặp mồi: 70,0 °C.	Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 1253 đến 1331 cặp base.
	Cặp mồi 31125	Mồi xuôi (5'-3') TTATAGGCGGTAGCAGGGATC Mồi ngược (5'-3') CGATTGTTTTTCCGAAGCA. Nhiệt độ biến tính của cặp mồi: 61,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 329 đến 339 cặp base.
Unique IS - 2	1	Mồi xuôi (5'-3') GTCAAGGTCATCAGCTATCTGC Mồi ngược (5'-3') TCAGTGGTCACGAACATCTCA Nhiệt độ biến tính của cặp mồi: 64,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 480 đến 504 cặp base.
	2	Mồi xuôi (5'-3') GTCTGCGAAAGTTGAGTTATAGTTTAAAGA ATG Mồi ngược (5'-3') ATGATGTGCCAGTTTGTGCGATGATATTAAA CTG Nhiệt độ biến tính của cặp mồi: 62,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 280 đến 297 cặp base.
	3	Mồi xuôi (5'-3') GATGAAAGACATTTGGGGTCGGAGATG Mồi ngược (5'-3') TCAGTGGTCCCGAGATGTTCTAAAAGAC Nhiệt độ biến tính của cặp mồi: 65,0 °C.	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 440 đến 452 cặp base.

*Phải đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận đối với mỗi cặp mồi để đạt yêu cầu định tính đến mức chủng.

Dung dịch mồi:**

Chủng GBI-30, 6086: Pha mồi đến nồng độ 0,3 µM bằng *nước vô khuẩn* và bảo quản ở - 20 °C đến - 80 °C. Ngay trước khi sử dụng, pha loãng mồi với *nước vô khuẩn* (1 : 5, tt/tt).

Chủng Unique IS-2: Pha mồi đến nồng độ 10 µM bằng *nước vô khuẩn* và bảo quản ở - 20 °C đến - 80 °C.

** Nồng độ mồi trong thành phần phản ứng PCR có thể được tối ưu hoá tùy thuộc vào điều kiện thử nghiệm của từng phòng thí nghiệm.

Chuẩn bị mẫu thử và thiết lập chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: Xem bảng 2.

Với mỗi cặp mồi đặc hiệu, tiến hành phản ứng PCR với các mẫu thử bằng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp.

Bảng 2: Chuẩn bị mẫu thử và thiết lập chu trình nhiệt cho phản ứng PCR

Chủng	Cặp mồi	Chuẩn bị mẫu thử	Chu trình nhiệt
GBI-30, 6086	Cặp mồi 301, 210243 và 31125	Đối với mỗi cặp mồi đặc hiệu, chuẩn bị dung dịch chứa 7,5 µL PCR master mix ² , 1 µL dung dịch mồi xuôi** (khoảng 0,06 µM), 1 µL dung dịch mồi ngược** (khoảng 0,06 µM), 4,5 µL nước vô khuẩn và 1 µL dung dịch mẫu DNA (khoảng 10 đến 100 ng).	Bước 1: ủ ở 98 °C trong 30 s. Bước 2: ủ ở 98 °C trong 10 s. Bước 3: ủ ở nhiệt độ biến tính của cặp mồi đặc hiệu trong 10 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 45 s. Lặp lại các bước 2 đến 4 trong 30 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4°C.
Unique IS-2	1, 2 và 3	Đối với mỗi cặp mồi đặc hiệu, chuẩn bị dung dịch chứa 10 µL PCR master mix ² , 1 µL dung dịch mồi xuôi** (khoảng 10 µM), 1 µL dung dịch mồi ngược** (khoảng 10 µM), 7,0 µL nước vô khuẩn và 1 µL dung dịch mẫu DNA (khoảng 50 đến 90 ng).	Bước 1: ủ ở 98 °C trong 30 s. Bước 2: ủ ở 98 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở nhiệt độ biến tính của cặp mồi đặc hiệu trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 đến 4 trong 30 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.

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

Mẫu chứng dương: Đối với từng chủng, chuẩn bị tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 µL dung dịch mẫu DNA bằng 1 µL dung dịch DNA của chủng đối chiếu tương ứng, hoặc thay các cặp mồi đặc hiệu cho các chủng đối chiếu bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans*.

Tiến hành: tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương với chu trình nhiệt mô tả như Bảng 2. **Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu của chủng đối chiếu tương ứng bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans* 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 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) 2,0% (kl/tt) trong dung dịch đệm TAE 1X (TT).

Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/ml và rửa gel bằng nước.

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 khi tiếp xúc thuốc thử này. Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel phù hợp khác.

Sử dụng thang chuẩn DNA phù hợp để xác định kích thước của các băng DNA được nhân bản bởi các cặp mồi đặc hiệu khác nhau (Bảng 1). 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.

Nếu sử dụng DNA của chủng đối chiếu làm mẫu chứng dương, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại có số cặp base đặc hiệu như quy định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận (Bảng 1). Nếu sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans*, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại có số cặp base đặc hiệu như trong 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 phản ứng PCR mẫu chứng âm và/hoặc mẫu chứng dương không như mong muốn, tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu chứng dương và mẫu chứng âm.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Xem Bảng 1.

Định lượng

Dung dịch pepton: Chuẩn bị dung dịch *pepton* (TT) 0,1% (kl/tt) và điều chỉnh pH 7,0 bằng dung dịch *acid lactic* (TT). Tiệt khuẩn dung dịch trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Dung dịch khoáng vi lượng (Trace mineral solution): Chuẩn bị dung dịch có thành phần như bảng 3, pha trong nước trao đổi ion hoặc sử dụng dung dịch thương phẩm có sẵn.

Bảng 3: Dung dịch khoáng vi lượng

Thành phần	Nồng độ (mg/ml)
Natri clorid	10,0
Sắt (II) sulfat	18,0
Mangan sulfat	16,0
Kẽm sulfat	1,6
Đồng sulfat	1,6
Cobalt (II) sulfat	1,6

Lưu ý: Dung dịch có màu hơi hồng, bảo quản lạnh không quá 2 tháng. Có thể dùng các muối có dạng ngậm nước khác miễn là nồng độ muối khoáng được duy trì đúng trong dung dịch cuối cùng.

Môi trường thạch BC cao nấm men glucose: Chuẩn bị môi trường có thành phần như bảng 4, hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 4: Môi trường thạch BC cao nấm men glucose

Thành phần	Khối lượng
Cao nấm men	5,0 g
Pepton	5,0 g
D-Glucose khan	5,0 g
Dikali hydrophosphat	0,5 g
Kali dihydrophosphat	0,5 g
Magnesi sulfat	0,3 g
Dung dịch khoáng vi lượng	1,0 ml
Nước	1000 ml

Hòa các thành phần trên trong 1 lít *nước* trong bình nón hoặc cốc có dung tích phù hợp. Bổ sung 15,0 g *thạch* (TT). Điều chỉnh pH 6,3 bằng dung dịch *acid lactic* (TT). Đun hỗn hợp đến sôi, vừa đun vừa khuấy trên bếp nóng cho đến khi môi trường tan hoàn toàn. Hấp tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Chuẩn bị và tiến hành thử nghiệm trên 2 hỗn dịch mẫu độc lập.

Hỗn dịch mẫu: Chuyển 1,0 g bột mẫu probiotic vào túi polyetylen vô khuẩn (túi dập mẫu). Thêm 199 ml dung dịch pepton đã tiệt khuẩn vào túi. Trộn bằng máy lắc cơ học đến khi thu được hỗn dịch đồng nhất hoặc sử dụng máy dập mẫu (stomacher) với tốc độ 150 đến 200 rpm trong 5 min.

Lưu ý: Trong một số trường hợp, cần tăng lượng mẫu probiotic để thu được kết quả định lượng chính xác. Đối với mẫu probiotic có liều dùng (serving size) từ 2 g đến 50 g thì lấy 2 g đến 50 g bột mẫu probiotic thêm vừa đủ 200 ml dung dịch pepton (độ pha loãng từ 2 g/200 ml đến 50 g/200 ml), hoặc thêm vừa đủ 300 ml dung dịch pepton (độ pha loãng từ 2 g/300 ml đến 50 g/300 ml). Đối với mẫu probiotic có liều dùng lớn hơn 50 g, lấy lượng mẫu probiotic bằng một nửa liều dùng hoặc lấy mẫu probiotic đại diện khoảng dưới 50 g, thêm vừa đủ 200 đến 300 ml dung dịch pepton.

Kiểm tra pH của hỗn dịch mẫu. Nếu pH dưới 7,0, điều chỉnh pH đến $8,5 \pm 0,2$ bằng *dung dịch natri hydroxyd 5 N* (TT). Nếu pH trên 8,7, điều chỉnh pH đến $8,5 \pm 0,2$ bằng dung dịch *acid lactic* (TT) 5 N. Chuyển 20 đến 30 ml hỗn dịch đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml vô khuẩn có nắp. Ủ ống trong bể ổn nhiệt ở 75 °C trong đúng 30 min, sau đó làm nguội xuống 45 °C. Chuyển 1,0 ml hỗn dịch này vào ống nghiệm vô khuẩn chứa 9 ml dung dịch pepton. Trộn kỹ bằng máy lắc xoay, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng $0,5 \times 10^{-3}$. Tiếp tục pha loãng như trên đến khi thu được hỗn dịch mẫu ở độ pha loãng cuối cùng dự kiến chứa khoảng 25 CFU/ml. Tiến hành thử nghiệm với hỗn dịch mẫu ở 3 nồng độ pha loãng cuối. Cần trộn hỗn dịch mẫu với môi trường trong 10 đến 20 min sau bước chuẩn bị hỗn dịch mẫu.

Lưu ý: Có thể xử lý mẫu probiotic bằng quy trình khác với hướng dẫn trên nếu được chứng minh là phù hợp.

Tiến hành: Với mỗi nồng độ pha loãng, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào ba đĩa Petri vô khuẩn kích thước 15 mm × 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 15 đến 20 ml *môi trường thạch BC cao nấm men glucose* đã tan chảy vào mỗi đĩa. Đậy nắp đĩa Petri, sau đó xoay nhẹ các đĩa để trộn đều hỗn dịch mẫu vào môi trường thạch.

Chuẩn bị một đĩa mẫu trắng chỉ chứa *môi trường thạch BC cao nấm men glucose* và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch pepton trộn với *môi trường thạch BC cao nấm men glucose*. Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, lật ngược đĩa và ủ các đĩa ở 38 °C đến 42 °C trong 48 h. Sau thời gian ủ, đếm số lượng khuẩn lạc trên các đĩa mẫu thử và các đĩa mẫu trắng. Lựa chọn các đĩa có 25 đến 250 khuẩn lạc để tính kết quả. Chỉ đếm các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái như sau: khuẩn lạc trên bề mặt có đường kính từ 1 đến 5 mm, màu trắng đến kem, lồi, có bờ đều và bề mặt nhẵn; khuẩn lạc bên trong thạch có đường kính 0,5 đến 1 mm, giống các chấm nhỏ màu kem. Tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc của các đĩa có cùng nồng độ pha loãng, sau đó tính số khuẩn lạc theo đơn vị CFU/g.

Đối với mẫu probiotic có khối lượng lớn hơn 1 g, có thể coi khối lượng mẫu probiotic là một đơn vị. Tính số khuẩn lạc trung bình trên mỗi đĩa, sau đó nhân số khuẩn lạc trung bình đếm được với nghịch đảo của hệ số pha loãng để thu được tổng số khuẩn lạc trong mẫu đó (CFU/mẫu probiotic). Để tính số lượng khuẩn lạc trong mỗi g mẫu probiotic (CFU/g), chia kết quả CFU/mẫu cho khối lượng mẫu probiotic thực tế.

Ví dụ: nếu khối lượng mẫu probiotic là 50 g và thể tích cuối cùng là 300 ml (50 g mẫu probiotic cộng với 250 ml dung dịch pepton), thì hệ số pha loãng đầu tiên là 1/300 (coi toàn bộ khối lượng mẫu

probiotic là một đơn vị). Nếu thực hiện thêm 5 lần pha loãng với tỉ lệ 1/10, hệ số pha loãng cuối cùng là $1/300 \times 1/10 \times 1/10 \times 1/10 \times 1/10 \times 1/10 = 1/300 \times 1/10^5$. Nếu số khuẩn lạc trung bình đếm được trên các đĩa của độ pha loãng cuối cùng là 200, thì số lượng khuẩn lạc trong 50 g mẫu probiotic là $200 \times 300 \times 10^5 = 6 \times 10^9$ CFU/50 g và số lượng khuẩn lạc trong mỗi gam mẫu probiotic là $6/50 \times 10^9 = 1,2 \times 10^8$ CFU/g.

Sự có mặt của bất kỳ khuẩn lạc nào không phù hợp với mô tả ở trên cho thấy hỗn dịch mẫu có thể bị tạp nhiễm và cần điều tra nguyên nhân. Dựa trên kết quả điều tra nguyên nhân, có thể loại bỏ kết quả hoặc tiến hành thử nghiệm lại. Cả hai đĩa trắng phải hoàn toàn không có bất kỳ loại khuẩn lạc nào. Trường hợp các đĩa trắng xuất hiện khuẩn lạc, toàn bộ quy trình phải được lặp lại, bao gồm cả việc chuẩn bị dung dịch pha loãng và môi trường, phụ thuộc vào đĩa trắng nào bị tạp nhiễm.

Giới hạn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 6 %.

(2 g đến 3 g, 100 °C, áp suất không quá 133,3 Pa, Phụ lục 9.6, 4 h)

Thử giới hạn nhiễm khuẩn

Lưu ý: Phương pháp vi sinh vật đề cập trong phép thử giới hạn nhiễm khuẩn là đại diện cho các phương pháp hiện đang được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp. Có thể sử dụng các phương pháp đã được thẩm định khác để thay thế cho các phương pháp được nêu trong phần này.

Tổng số nấm men

Chỉ áp dụng đối với chủng *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086.

Dung dịch pepton: Chuẩn bị dung dịch *pepton* (TT) 0,1 % (kl/tt) và điều chỉnh pH 7,0 bằng dung dịch *acid hydrochloric* (TT). Tiệt khuẩn dung dịch trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch nấm men (*Yeast agar medium*): Chuẩn bị môi trường có công thức như trong Bảng 5 hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 5: Thành phần môi trường thạch nấm men Dicloran Glycerol 18 % (DG-18)

Thành phần	Khối lượng
Pepton	5,0 g
D-glucose	10,0 g
Kali dihydrophosphat	1,0 g
Magnesi sulfat	0,5 g
Dung dịch Dicloran* 0,2 % (kl/tt) pha trong ethanol	1,0 ml
Thạch	15,0 g
Cloramphenicol	0,1 g
Nước	800 ml

*Dicloran: 2,6-dicloro-4-nitroanilin

Hoà các thành phần trên trong 800 ml nước trong bình nón hoặc cốc có dung tích phù hợp. Đun đến sôi, vừa đun vừa khuấy trên bếp nóng cho đến khi môi trường tan hoàn toàn. Thêm nước vào môi

trường đến thể tích 1000 ml. Bổ sung 220 g *glycerol* (TT), sau đó tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường sau tiệt khuẩn có pH 5,6.

Chuyển 25 g mẫu probiotic vào túi đập mẫu (stomacher) vô khuẩn. Thêm 225 ml dung dịch pepton vô khuẩn vào túi và trộn đều với tốc độ khoảng 150 đến 200 rpm trong 2 min, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} . Có thể xử lý mẫu probiotic bằng quy trình khác với hướng dẫn trên nếu được chứng minh là phù hợp.

Chuyển 1,0 ml hỗn dịch mẫu trên vào ống nghiệm vô khuẩn chứa 9 ml dung dịch pepton, trộn kỹ bằng máy lắc xoáy thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-2} . Tiến hành trộn môi trường với hỗn dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} , thử nghiệm trong 10 đến 20 min sau bước chuẩn bị hỗn dịch mẫu.

Tiến hành: Với mỗi nồng độ pha loãng, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào 3 đĩa Petri vô khuẩn kích thước 15 mm x 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 20 đến 25 ml *môi trường thạch nấm men* đã tan chảy vào mỗi đĩa. Đậy nắp đĩa Petri, sau đó xoay nhẹ các đĩa để trộn đều hỗn dịch mẫu vào môi trường thạch. Chuẩn bị một đĩa mẫu trắng chỉ chứa *môi trường thạch nấm men* và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch pepton trộn với *môi trường thạch nấm men*.

Để yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, lật ngược đĩa và ủ các đĩa (trong tối) ở 25 °C trong 5 ngày. Đếm số lượng các khuẩn lạc nấm mọc trên đĩa. Nếu sau 5 ngày chưa xuất hiện khuẩn lạc, ủ tiếp các đĩa thêm 48 h và đếm số lượng khuẩn lạc. Trên *môi trường thạch nấm men*, khuẩn lạc nấm hình đĩa mọc riêng lẻ. Nếu số lượng khuẩn lạc lớn hơn 150 CFU, tiến hành thử nghiệm ở độ pha loãng cao hơn để thu được số đếm chính xác. Cả hai đĩa trắng không được có bất kì khuẩn lạc nào. Tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc của các đĩa có cùng nồng độ pha loãng sau đó tính số khuẩn lạc theo đơn vị CFU/g.

Nếu tất cả các đĩa ở cả hai độ pha loãng không có khuẩn lạc, báo cáo số lượng là < 10 CFU/g.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Tổng số nấm men không được quá 100 CFU/g.

Tổng số nấm

Không quá 10^2 CFU/g (chỉ áp dụng đối với chủng *Bacillus coagulans* Unique IS-2) (Phụ lục 13.6).

Vi sinh vật gây bệnh (Phụ lục 13.6)

Escherichia coli, *Salmonella*: Không được có trong 10 g.

Cần qui định thêm không được có *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Bacillus cereus* nếu nguyên liệu có nguy cơ tạp nhiễm các vi sinh vật này. Phương pháp phát hiện các vi sinh vật này phải là phương pháp tiêu chuẩn hoặc phương pháp đã được thẩm định.

Bảo quản

Bảo quản trong đồ đựng kín, để nơi khô ráo, thoáng mát.

Ghi nhãn

Phải ghi đầy đủ tên chi, loài, chủng kèm theo số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/g hoặc đơn vị tương đương.

Chú thích:

¹ Applied Biosystem PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent của Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) hoặc tương đương.

² New England Biolabs Phusion High-Fidelity PCR master mix với đệm GC (<http://www.neb.com>), Dream Taq PCR master Mix (2x) (<http://www.thermofisher.com>) hoặc tương đương.

