

Số: 170/QĐ-UB

TP. Hồ Chí Minh, ngày 23 tháng 7 năm 1985

QUYẾT ĐỊNH

V/V BAN HÀNH HAI TIÊU CHUẨN VỀ XIRO THỰC PHẨM – PHƯƠNG PHÁP THỬ LÝ HÓA, KÝ HIỆU 53 TCV 69 – 85. PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH VẬT, KÝ HIỆU 53 TCV 73 – 85

ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

– Căn cứ Luật Tổ chức Hội đồng Nhân dân và Ủy ban Nhân dân đã được Quốc hội thông qua ngày 30-6-1983;

– Căn cứ Nghị định số 141/HĐBT ngày 24 tháng 8 năm 1982 của Hội đồng Bộ trưởng ban hành điều lệ về công tác Tiêu chuẩn hóa;

– Căn cứ Thông tư số 188/KHKT-TT ngày 05-6-1966 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước về xây dựng, xét duyệt, ban hành, quản lý tiêu chuẩn kỹ thuật địa phương của sản phẩm công nghiệp, nông nghiệp;

– Xét yêu cầu cần thiết của công tác quản lý kỹ thuật ở thành phố Hồ Chí Minh;

– Theo đề nghị của đồng chí Chủ nhiệm Ủy ban Khoa học và kỹ thuật thành phố Hồ Chí Minh,

QUYẾT ĐỊNH

Điều 1: Nay ban hành kèm theo quyết định này, hai tiêu chuẩn địa phương về Xiro thực phẩm – Phương pháp thử Lý Hóa, Ký hiệu 53 TCV 69-85 – Phương pháp thử vi sinh vật ký hiệu 53 TCV 73-85.

Điều 2: Hai tiêu chuẩn này là căn cứ để đánh giá chất lượng sản phẩm trong phạm vi sản xuất (thuộc các cơ sở Quốc doanh, công tư hợp doanh, tập thể và cá thể) cũng như trong lưu thông phân phối.

Điều 3: Các cơ quan quản lý phải đôn đốc, theo dõi, kiểm tra để đề nghị khen thưởng những cơ sở thực hiện tốt tiêu chuẩn đã ban hành và xử lý nghiêm minh những cơ sở làm ăn gian dối.

Điều 4: Hai tiêu chuẩn trên có hiệu lực từ ngày 01 tháng 8 năm 1985 và phải được nghiêm chỉnh chấp hành trong toàn thành phố.

Điều 5: Các đồng chí Chánh Văn phòng Ủy ban Nhân dân thành phố, Chủ nhiệm Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật, Thủ trưởng các Sở, Ban, Ngành thành phố, Chủ tịch Ủy ban Nhân dân các Quận, Huyện và các cơ sở có liên quan đến sản

xuất và kiểm nghiệm về Xiro thực phẩm trong thành phố có trách nhiệm thi hành quyết định này.

TM.ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ

KT. CHỦ TỊCH

PHÓ CHỦ TỊCH THƯỜNG TRỰC

Lê Văn Triết

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

TIÊU CHUẨN ĐỊA PHƯƠNG
XIRO THỰC PHẨM
PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH VẬT
53 TCV 73 – 85

Cơ quan biên soạn:

CHI CỤC TIÊU CHUẨN – ĐO LƯỜNG – CHẤT LƯỢNG TP. HỒ CHÍ MINH.

Cơ quan trình duyệt:

ỦY BAN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Cơ quan xét duyệt và ban hành:

ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Quyết định ban hành:

Số 170/QĐ-UB ngày 23 tháng 7 năm 1985.

TIÊU CHUẨN ĐỊA PHƯƠNG

Nhóm M

| | | |
|--|--|---|
| CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM ————— ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH | XIRÔ THỰC PHẨM PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH VẬT | 53 TCV 73 – 85 ————— Có hiệu lực Từ 1-5-1985 |
|--|--|---|

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thử các chỉ tiêu vi sinh vật của xirô thực phẩm.

1. Phương pháp lấy mẫu:

Phương pháp lấy mẫu theo đúng quy định trong 53 TCV...

2. Phương pháp thử:

2.1 Điều kiện thử.

2.1.1 Nơi làm việc, cách làm việc, các môi trường và dụng cụ thử phải đảm bảo các yêu cầu và chế độ vô khuẩn.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ, phẩm nhuộm cơ bản.

- Tủ ấm 37°C.
- Bếp cách thủy
- Que cấy
- Pipet Pasteur
- Pipet 20ml, 2ml, 1ml
- Lame, lamelle
- Đèn cồn hay đèn gaz
- Phẩm nhuộm dùng cho phương pháp nhuộm Gram.

2.2. Chuẩn bị mẫu thử:

2.2.1. Lắc đều chai mẫu bằng cách dốc ngược chai nhiều lần. Dùng cồn lau sạch chai mẫu.

2.2.2. Dùng pipet lấy 20ml mẫu thử cho vào 80ml nước cất hoặc dung dịch đệm. Lắc trộn mẫu pha loãng cho đều.

2.2.3. Trường hợp mẫu có từ hai đơn vị chứa trở lên, dùng pipet để hút nước mẫu, số lượng mẫu lấy bằng nhau ở mỗi đơn vị chứa, tất cả được cho vào một bình cầu có bi thủy tinh đã tiệt khuẩn để làm mẫu thử trung bình. Mẫu thử

trung bình không dưới 100ml. Lắc trộn mẫu thử trung bình cho đều. Tiếp tục pha loãng mẫu trung bình theo 2.2.2.

2.2.4. Trường hợp cầu, pha loãng nước mẫu thành dung dịch 1/10, 1/100, 1/1000 bằng nước cất hoặc dung dịch đệm.

Chú thích: chỉ pha loãng mẫu khi tiến hành thử.

2.3. Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí:

2.3.1. Phương pháp thử theo quy định ở phần 2.3 trong 53 TC 49 – 79.

2.4. Xác định *Escherichia coli*.

2.4.1. Nội dung: cấy mẫu vào môi trường canh thang lactoza. Khi có phản ứng dương sẽ tiếp tục phân lập trên môi trường EMB hoặc Mac Conkey. Sau đó xác định *Escherichia coli* bằng những phản ứng IMVIC.

2.4.2. Phương tiện thử.

2.4.2.1. Môi trường.

- Canh thang lactoza
- EMB (hoặc Mac Conkey)
- Nước Pepton
- Thạch thường
- KIA
- Clark Lubs
- Citrate Simmons

2.4.2.2. Thiết bị, dụng cụ, phẩm nhuộm.

- Thiết bị, dụng cụ và phẩm nhuộm theo quy định ở phần 2.1.2.
- Ống nghiệm cỡ 14 x 140mm đã tiệt khuẩn.

2.4.2.3. Thuốc thử.

- Kovac
- Dung dịch đỏ methyl 0,2%
- Dung dịch α – naphthol 5%
- Dung dịch KOH 40%
- Dung dịch amonium sulfat đồng.

2.4.3. Tiến hành thử.

2.4.3.1. Cấy 1ml nước mẫu ở phần 2.2.3 vào một ống môi trường canh thang lactoza. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ.

Chú thích: Trên môi trường EMB, khuẩn lạc nghi ngờ có màu xanh đen với ánh kim loại.

Trên môi trường Mac Conkey, khuẩn lạc nghi ngờ có màu đỏ.

2.4.3.3. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ riêng rẽ nhuộm Gram để kiểm tra và chuyển sang thạch thường (hoặc KIA). Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ.

Cách cấy trên môi trường KIA:

- Dùng que cấy ria trên mặt môi trường
- Sau đó, dùng que cấy thẳng đâm một đường thẳng giữa ống môi trường và xuyên sâu đến đáy.

Chú thích: Trên môi trường thạch thường, vi khuẩn nghi ngờ cho khuẩn lạc tròn đều, đường kính từ 1 – 2mm, đẹp, trắng, bóng.

Trên môi trường KIA, vi khuẩn nghi ngờ sẽ làm phần nghiêng và phần đế của môi trường đổi từ màu đỏ sang màu vàng, có khí và không làm đen môi trường.

2.4.3.4. Phản ứng sinh Indol

a) Cấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ từ thạch thường (hoặc KIA) vào môi trường nước peptone. Ủ 37°C trong 24 giờ.

b) Cho 0,5ml thuốc thử Kovac vào nước Pepton.

c) Quan sát phản ứng: phản ứng dương khi có màu tím đỏ xuất hiện trên lớp thuốc thử.

2.4.3.5. Phản ứng MR

a) Cấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ vào thạch thường (hoặc KIA) vào môi trường Clark Lubs. Ủ trong 37°C trong 48 – 96 giờ.

b) Dùng pipet hút 5ml canh khuẩn Clark Lubs cho vào một ống nghiệm cỡ 14x140mm (để dùng cho phản ứng VP).

c) Cho 5 giọt đỏ methyl 0,2% vào canh khuẩn còn lại.

d) Quan sát phản ứng: phản ứng dương khi môi trường có màu đỏ ngay sau khi cho thuốc thử vào.

2.4.3.6. Phản ứng VP.

a) Phương pháp 1

– Cho 3ml dung dịch α – naphthol 5% và 1ml dung dịch KOH 40% vào canh khuẩn Clark Lubs ở phần 2.4.3.5.b

– Quan sát phản ứng: phản ứng dương khi có màu đỏ xuất hiện trong vòng 15 – 20 phút.

b) Phương pháp 2

– Cho 5ml dung dịch ammonium sulfat đồng vào canh khuẩn Clark Lubs ở phần 2.4.3.5.b

– Quan sát phản ứng: phản ứng dương khi có màu đỏ xuất hiện trong vòng 20 phút.

2.4.3.7. Phản ứng Citrate.

a) Cây chuyên vi khuẩn từ thạch thường (hoặc KIA) vào môi trường citrate Simmons. Ủ 37°C trong 24.

b) Quan sát phản ứng: phản ứng dương khi môi trường đổi sang màu xanh dương.

2.4.4. Kết luận:

Xác định có *Escherichia coli* khi phát hiện trực khuẩn Gram âm với các đặc tính sinh hóa như sau:

| Indol | MR | VP | Citrate |
|-------|----|----|---------|
| + | + | - | - |

Chú thích: Có một vài loài *Escherichia coli* cho phản ứng Indol âm.

2.5. Xác định *Streptococcus faecalis*.

2.5.1. Nội dung: Cây mẫu vào canh thang axit glucoza. Sau đó, xác định *Streptococcus faecalis* bằng cách khảo sát sự phát triển trên môi trường có 40% mật, trong môi trường có 6,5% NaCl.

2.5.2. Phương tiện thử:

2.5.2.1. Môi trường:

- Canh thang axit glucoza
- Thạch SF
- Thạch 40% mật
- Canh thang glucoza 6,5% muối.

2.5.2.2. Thiết bị, dụng cụ, phẩm nhuộm theo quy định ở phần 2.1.2

2.5.3. Tiến hành thử.

2.5.3.1. Cây 1ml nước mẫu ở phần 2.2.3 vào canh thang axit glucoza. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ.

2.5.3.2. Tiếp tục phân lập trên thạch SF. Ủ 37°C trong 24 giờ và quan sát khuẩn lạc.

Chú thích: Trên thạch SF, khuẩn lạc nghi ngờ có dạng tròn, nhỏ, biên đều, bóng trắng và làm môi trường đổi từ màu tím sang vàng.

2.5.3.3. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ riêng rẽ nhuộm Gram để kiểm tra hình thái. Nếu có chuỗi cầu Gram dương, tiếp tục khảo sát các tính chất sau.

2.5.3.4. Tính chất phát triển trên thạch 40% mật.

Cấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ trên thạch SF vào thạch 40% độ mật. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ và quan sát sự phát triển của vi khuẩn. Vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường 40% độ mật khi có khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường.

2.5.3.5. Tính chất phát triển của môi trường có 6,5% NaCl.

Cấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ trên môi trường SF vào canh thang glucoza 6,5% NaCl. Ủ 45°C trong 24 – 48 giờ và quan sát sự phát triển của vi khuẩn.

Chú thích: Trên môi trường canh thang glucoza 6,5% NaCl, vi khuẩn *Streptococcus faecalis* thường mọc thành những hạt nhỏ, trắng và lắng xuống đáy ống làm môi trường vẫn trong như lúc chưa cấy.

2.5.4. Kết luận:

Xác định có *Streptococcus faecalis* khi phát hiện chuỗi cầu Gram dương có các tính chất sau:

- Phát triển trên môi trường thạch 40% mật
- Phát triển trên canh thang glucoza 6,5% NaCl.

2.6. Xác định *Clostridium perfringens*

2.6.1. Nội dung: Cấy mẫu vào môi trường Tarôsi có paraffin đặc rồi đun 85°C trong 15 phút. Khi có hiện tượng sinh hơi sẽ tiếp tục phân lập trong thạch VF và xác định *Clostridium perfringens* bằng cách khảo sát các tính chất sinh SH₂ và đông sữa.

2.6.2. Phương tiện thử:

2.6.2.1. Môi trường

- Tarôsi
- Thạch VF
- Canh thang VF
- Thạch Wilson Blair
- Môi trường sữa.

2.6.2.2. Dụng cụ, thiết bị và phẩm nhuộm

- Dụng cụ, thiết bị và phẩm nhuộm cơ bản theo quy định ở phần 2.1.2.
- Đũa thủy tinh.

2.6.2.3. Hóa chất đã tiệt khuẩn

- Dung dịch sulfit natri 20%
- Dung dịch ammonium sulfat sắt 5%
- Dầu paraffin

2.6.3. Tiến hành thử

2.6.3.1. Cấy 1ml nước mẫu ở phần 2.2.3 vào môi trường Tarôsi có paraffin đặc. Cho vào bếp cách thủy 85°C trong 15 phút. Ủ 37°C trong 24 – 96 giờ. Quan sát hiện tượng sinh hơi đẩy đĩa paraffin lên.

2.6.3.2. Dùng đĩa thủy tinh đốt nóng xuyên qua đĩa paraffin để phân lập trong thạch VF. Cách phân lập trong thạch VF:

– Đun cách thủy từ 4 – 6 ống thạch VF ở 100°C trong 20 phút. Làm nguội dưới vòi nước đến $45 - 50^{\circ}\text{C}$.

– Dùng pipet Pasteur nhúng vào canh thang Tarôsi rồi cấy lần lượt từ ống thứ nhất đến ống cuối và làm lạnh ngay dưới vòi.

2.6.3.3. Ủ 37°C trong 24 – 96 giờ. Quan sát hình thái khuẩn lạc.

Chú thích: Trong thạch VF, khuẩn lạc nghi ngờ có hình hạt đậu, hình tim và cách mặt thạch ít nhất từ 2 -3 cm.

2.6.3.4. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ riêng rẽ nhuộm Gram. Nếu có trực khuẩn Gram dương, to tiếp tục cấy chuyển sang canh thang VF. Ủ 37°C trong 24 giờ để khảo sát các tính chất sau đây.

2.6.3.5. Tính chất sinh SH_2

a) Đun cách thủy môi trường Wilson Blair ở 100°C trong 20 phút. Làm nguội dưới vòi nước đến $45 - 50^{\circ}\text{C}$. Cho vào mỗi ống môi trường 2 giọt sulfite natri 20% và 1 giọt ammonium sulfat 5% xoay nhẹ ống môi trường để các hóa chất hòa đều vào môi trường.

b) Cấy canh thang VF vào môi trường trên theo cách phân lập trong thạch VF. Ủ 37°C trong 24 giờ và quan sát khuẩn lạc. Vi khuẩn sinh lạc SH_2 sẽ cho những khuẩn lạc màu đen.

2.6.3.6. Tính chất là đông sữa

a) Đun cách thủy môi trường sữa ở 100°C trong 20 phút. Làm nguội dưới vòi nước đến $45 - 50^{\circ}\text{C}$. Cho vào môi trường từ 1 – 2ml dầu paraffin.

b) Cấy 1ml canh thang VF vào môi trường trên, chú ý không để bọt khí từ pipet vào môi trường. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ và quan sát hiện tượng đông sữa.

2.6.4. Kết luận:

Xác định có *Clostridium perfringens* khi phát hiện có trực khuẩn Gram dương to với các tính chất sau:

- Có khuẩn lạc đặc trưng trong thạch VF.
- Có khả năng sinh SH_2 .
- Có khả năng làm đông sữa.

Chú thích: Trường hợp xác định vi khuẩn kỵ khí sinh SH₂ bằng môi trường Wilson Blair:

a) Đun chảy môi trường Wilson Blair và cho vào 4ml sulfit natri 20%, 10 giọt ammonium sulfat sắt 5% vào môi trường theo cách hướng dẫn ở phần 2.6.3.5.a.

b) Cây 10ml nước mẫu ở phần 2.2.3 vào môi trường (có thể cây nước mẫu pha loãng 1/10, 1/100,...). Đun cách thủy ở 75°C trong 15 phút rồi làm đông môi trường dưới vòi nước. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ và đếm các khuẩn lạc màu đen.

c) Vi khuẩn kỵ khí sinh SH₂ trong

$$1\text{ml Xiro} = \frac{X \times D}{10}$$

X: Số khuẩn lạc màu đen có trong ống

D: Độ pha loãng của nước mẫu dùng để cấy.

2.7. Xác định Staphylococcus aureus.

2.7.1. Nội dung: Cây mẫu canh thang 7,5% NaCl. Sau đó, xác định Staphylococcus aureus bằng cách khảo sát các tính chất lên men manitol trên môi trường Chapman và làm đông huyết tương.

2.7.2. Phương tiện thử.

2.7.2.1 Môi trường.

– Canh thang 7,5% NaCl.

– Thạch thường.

– Canh thang thường

– Chapman

2.7.2.2. Thiết bị dụng cụ và hóa chất.

– Thiết bị, dụng cụ và hóa chất cơ bản theo quy định ở phần 2.1.2.

– Ống nghiệm cỡ 10 x 100 mm đã tiệt khuẩn

2.7.2.3. Huyết tương nhỏ

2.7.3. Tiến hành thử

2.7.3.1. Cây 1 ml nước ở phần 2.2.3 vào môi trường canh thang 7,5% NaCl. Ủ 37°C trong 24 giờ.

2.7.3.2. Tiếp tục phân lập trên thạch thường. Ủ 37°C trong 24 giờ quan sát khuẩn lạc.

Chú thích trên thạch thường, khuẩn lạc nghi ngờ tròn đều, phòng bóng, màu vàng kim.

2.7.3.3. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ riêng rẽ nhuộm Gram để kiểm tra và chuyển sang canh thang thường. Ủ 37°C trong 24 giờ để khảo sát các tính chất sau đây.

2.7.3.4. Tính chất lên men manitol.

a) Cấy một giọt canh thang thường lên môi trường Chapman. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ và quan sát sự đổi màu của môi trường.

b) Phản ứng dương khi môi trường chuyển sang màu vàng.

2.7.3.5. Tính chất là đông huyết tương

a) Cho vào 2 ống nghiệm cỡ 10 x 100mm, mỗi ống 0,5ml huyết tương nhỏ.

b) Cho vào ống thứ nhất 0,5ml canh thang thường đã cấy vi khuẩn.

c) Cho vào ống thứ hai 0,5ml canh thang thường không cấy vi khuẩn (ống chứng âm).

d) Đặt cả hai ống vào bếp chung cách thủy 37°C. Quan sát sự đông huyết tương sau mỗi 30 phút trong 4 giờ đầu, vào giờ thứ 6 và giờ thứ 24.

đ) Phản ứng dương khi huyết tương đông lại so với ống chứng âm.

2.7.4. Kết luận:

Xác định có *Staphylococcus aureus* khi phát hiện tụ cầu Gram dương với tính chất sau:

– Lên men manitol

– Làm đông huyết tương.

2.8. Xác định vi khuẩn làm đục (*Bacillus* spp)

2.8.1. Nội dung: Cấy mẫu vào canh thang thường, đun 85° trong 15 phút. Sau đó xác định *Bacillus* spp bằng phản ứng catalaza.

2.8.2. Phương tiện thử:

2.8.2.1. Môi trường.

– Canh thang thường

– Thạch thường.

2.8.2.2. Thiết bị dụng cụ và phẩm nhuộm cơ bản theo quy định ở phần 2.1.2.

2.8.2.3. Hóa chất: nước oxy già 3%

2.8.3. Tiến hành thử

2.8.3.1. Cấy 1ml nước mẫu ở phần 2.2.3 vào môi trường canh thang thường. Cho vào bếp cách thủy 85°C trong 15 phút. Ủ 37°C trong 24 – 48 giờ.

2.8.3.2. Tiếp tục phân lập trên thạch thường. Ủ 37°C trong 24 giờ rồi nhuộm Gram để kiểm tra hình thái. Chọn khuẩn lạc của trực khuẩn Gram dương để thực hiện phản ứng catalaza.

2.8.3.3. Phản ứng catalaza.

a) Cho 1 giọt nước oxy già 3% lên một lame sạch. Dùng que cấy cấy lấy vi khuẩn của khuẩn lạc nghi ngờ hòa vào nước oxy già trên lame và quan sát phản ứng.

b) Phản ứng dương khi có bọt khí sinh ra.

2.8.4. Kết luận:

Xác định có *Bacillus* spp khi phát hiện trực khuẩn Gram dương cho phản ứng catalaza dương.

2.9. Xác định có tế bào nấm men sống.

Theo phương pháp thử quy định ở phần 2.7 trong 53 TCV 49 – 79.

PHẦN PHỤ LỤC

A. Dung dịch pha loãng mẫu:

Dung dịch A (dung dịch dự trữ):

KH_2PO_4 34g

Nước cất 1000ml

Hòa tan KH_2PO_4 vào 500ml nước cất. Chỉnh pH = 7,2 với dung dịch NaOH 1N. Cho nước cất đủ 1000ml.

Dung dịch B (dung dịch sử dụng):

Lấy 1,25 ml dung dịch A cho vào 1000ml nước cất. Phân ra 80 ml dung dịch B cho vào mỗi bình cầu hoặc erlen 250 ml. Hấp 121°C trong 15 phút.

B. Thuốc thử:

1. Dung dịch Amonium sulfat đồng:

CuSO_4 1g

NH_4OH đậm đặc 40g

KOH 10% cho đủ 1000 ml.

Hòa tan CuSO_4 vào trong NH_4OH , thêm dung dịch KOH vào. Bảo quản trong chai nút vặn.

2. Dung dịch KOH 40%:

KOH 40g

Nước cất 100ml

3. Thuốc thử Kovac:

Pha chế theo điều 4 phần phụ lục của 53 TCV 49 – 79.

4. Dung dịch đỏ methyl 0,2%:

| | |
|-----------|-------|
| Đỏ methyl | 0,1g |
| Cồn 95° | 300ml |
| Nước cất | 200ml |

5. Dung dịch α - naphтол:

| | |
|--------------------|-------|
| α - naphтол | 5g |
| Cồn tuyệt đối | 100ml |

Chú thích: Dung dịch phải được pha mới mỗi ngày.

C. Môi trường:

1. Canh thang thường:

Pha chế theo điều 13 TCVN 186 – 66. Phân chia vào mỗi ống 10ml môi trường.

2. Canh thang glucoza:

| | |
|------------------|----------|
| Cao thịt bò | 4,5g |
| Trypton | 15g |
| NaN ₃ | 0,2g |
| Glucoza | 7,5g |
| NaCl | 7,5g |
| Nước cất | 1.000 ml |

pH = 7,2

Phân chia vào mỗi ống 5ml môi trường. Hấp 110°C trong 20 phút.

3. Canh thang glucoza 6,5% NaCl:

| | |
|-------------|--------|
| Cao thịt bò | 4,5g |
| Trypton | 15g |
| Glucoza | 7,5g |
| NaCl | 65g |
| Nước cất | 1000ml |

pH = 7,2

Phân chia vào các ống nghiệm, mỗi ống 5ml. Hấp 110°C trong 20 phút.

4. Canh thang lactoza:

| | |
|-------------------|--------|
| Canh thang thường | 1000ml |
|-------------------|--------|

Lactoza 10g

Dung dịch đỏ phenol 0,2% 10ml

Phân chia vào mỗi ống 10ml môi trường. Hấp 110°C trong 20 phút.

5. Canh thang 7,5% CaCl:

Canh thang thường 1000ml

NaCl 75g

pH = 7,2 – 7,4

Phân chia vào mỗi ống 10ml môi trường. Hấp 121°C trong 15 phút.

6. Canh thang Tarôsi:

Pha chế theo điều 17 của TCVN 186 – 66. Phân chia vào ống nghiệm 16 x 160 mm, mỗi ống 5ml môi trường. Cho vào mỗi ống 5 ml môi trường 2g paraffin đặc. Hấp 121°C trong 30 phút.

7. Canh thanh VF:

Pha chế theo điều 18 và 19 của TCVN 186 – 66.

8. Chapman:

Canh thang thường 1000 ml

NaCl 75g

Manitol 10g

Agar 15g

Dung dịch đỏ phenol 02% 20 ml

pH = 7,4 – 7,5

Phân chia vào mỗi ống 7 – 10 ml môi trường. Hấp 110°C trong 20 phút.

9. Clark Lubs:

MgS₄ 0,2g

NH₄H₂PO₄ 1g

K₂HPO₄ 1g

Na₃C₆H₅O₇ 2g

NaCl 5g

Xanh bromothymol 0,08g

Agar 15g

Nước cất 1000ml

pH = 6,8

Phân chia vào ống nghiệm. Hấp 121°C trong 15 phút.

10. Clark Lubs:

| | |
|---------------------------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 5g |
| Pepton | 5g |
| Glucosa | 5g |
| Nước cất | 1000ml |

pH = 6,9

Phân chia 10ml môi trường vào mỗi ống nghiệm. Hấp 110°C trong 20 phút.

11.EMB:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Peptone | 10g |
| Lactoza | 10g |
| K ₂ HPO ₄ | 2g |
| Agar | 15g |
| Eosin | 0,4g |
| Xanh menthylen | 0,065g |
| Nước cất | 1000ml |

pH = 7,2

Phân chia vào mỗi ống nghiệm 15 ml – 18 ml (hoặc Petri). Hấp 110°C trong 20 phút.

12. Mac Conkey:

| | |
|-----------------|--------|
| Peptone | 20g |
| Lactoza | 10g |
| Muối mật | 5g |
| Tím bromocresol | 0,01g |
| Agar | 15g |
| Nước cất | 1000ml |

pH = 7,3

Phân chia vào ống nghiệm hoặc Petri như phần 12 – EMB. Hấp 110°C trong 20 phút.

13. Môi trường sữa.

Sữa đã bỏ phần kem, phân vào mỗi ống 9 ml môi trường. Hấp 110°C trong 20 phút.

Trường hợp dùng sữa bột:

| | |
|-------------------|--------|
| Sữa bột không kem | 15g |
| Nước cất | 100 ml |

Phân chia vào mỗi ống 9ml. Hấp 110°C trong 20 phút.

14. Nước pepton:

| | |
|----------|--------|
| Trypton | 10g |
| Nước cất | 1000ml |

Phân chia vào mỗi ống 10ml. Hấp 121°C trong 15 phút.

15. Thạch thường:

Pha chế theo điều 16 của TCVN 186 – 66.

16. Thạch VF:

Pha chế theo điều 20 của TCVN 186 – 66.

17. Thạch SF:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Peptone | 10g |
| Glucoza | 5g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5g |
| NaCl | 4g |
| NaN ₃ | 0,5g |
| Tím bromocresol 0,4% | 10 ml |
| Agar | 15g |
| Nước cất | 1000ml |

$$\text{pH} = 6,8 - 7$$

Phân chia vào ống nghiệm. Hấp 110°C trong 20 phút.

18. Thạch 40% mật:

| | |
|-------------------|--------|
| Canh thang thường | 300 ml |
| Mật bò | 200 ml |
| Agar | 7,5g |

19. Thạch Wilson Blair:

| | |
|--------------|---------|
| Thạch thường | 1000 ml |
| Glucoza | 20g |

$$\text{pH} = 7,5$$

Phân chia vào ống nghiệm 8 – 9 x 200 mm sao cho mực môi trường đến 2/3 chiều cao ống. Hấp 110°C trong 15 phút.

Dung dịch Sulfite natri 20% và dung dịch amonium sulfat sắt 5% được thanh khuẩn bằng nền lọc hay đun sôi 10 phút.

Chú thích: – Dung dịch sulfite natri chỉ pha khi sử dụng.

Hai dung dịch này chỉ cho vào môi trường trước khi sử dụng.

Môi trường Wilson Blair dùng để xác định vi khuẩn kỵ khí sinh SH_2 được pha chế với thạch thường có 3% agar và phân vào ống nghiệm 30 x 200 mm mỗi ống 40 ml môi trường.

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HCM

TIÊU CHUẨN ĐỊA PHƯƠNG
XIRÔ THỰC PHẨM
PHƯƠNG PHÁP THỬ LÝ HÓA
53 TCV 69 – 85

Cơ quan biên soạn:

CHI CỤC TIÊU CHUẨN – ĐO LƯỜNG – CHẤT LƯỢNG TP. HỒ CHÍ MINH.

Cơ quan trình duyệt:

ỦY BAN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Cơ quan xét duyệt và ban hành:

ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Quyết định ban hành:

Số 170/QĐ-UB ngày 23 tháng 7 năm 1985.

TIÊU CHUẨN ĐỊA PHƯƠNG

Nhóm M

| | | |
|---|---|---|
| CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH | XIRÔ THỰC PHẨM PHƯƠNG PHÁP THỬ LÝ HÓA | 53 TCV 69 – 85 Có hiệu lực Từ _____ |
|---|---|---|

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp lấy mẫu và kiểm nghiệm các chỉ tiêu tỷ trọng, axit, đường và saccarin của Xirô thực phẩm được sản xuất và tiêu dùng trong phạm vi thành phố.

1 – PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU:

1.1. Chất lượng của Xirô được xác định theo từng lô hàng đồng nhất, trên cơ sở lấy mẫu trung bình ở lô hàng đó.

1.2. Lô hàng đồng nhất bao gồm những sản phẩm có cùng một tên gọi, cùng loại (loại 1 hoặc loại 2), cùng một nguyên liệu sản xuất, cùng điều kiện sản xuất, cùng sản xuất một đợt, cùng khối lượng đựng trong bao bì cùng một kiểu, cùng giao nhận một lần.

1.3. Trước khi lấy mẫu phải xác định tính đồng nhất của lô hàng, kiểm tra với các chứng từ kèm theo, ghi nhận số lượng của lô hàng.

1.4. Vị trí lấy mẫu ở lô hàng được xác định một cách ngẫu nhiên, nhưng phải đảm bảo phân bố đồng đều và đại diện cho lô hàng. Nếu sản phẩm được đóng gói thành từng thùng và chất thành chông, phải tiến hành lấy mẫu ở ba lớp: trên, giữa và dưới các chông.

1.5. Số lượng mẫu lấy tại các điểm được ấn định với tỷ lệ 1% và từ số lượng này lấy ra mẫu trung bình nhưng không ít hơn 3 đơn vị chứa.

1.6. Trên các chai đựng mẫu phải được đóng nút chặt, niêm phong và dán nhãn. Nội dung nhãn phải ghi rõ:

- Tên sản phẩm
- Tên cơ sở sản xuất và địa chỉ
- Số lô hàng và số lượng của lô hàng
- Ngày tháng năm sản xuất hoặc vô bao bì
- Ngày tháng năm lấy mẫu
- Tên người lấy mẫu (hoặc tên người đại diện hội đồng lấy mẫu).

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ CẢM QUAN:

Áp dụng TCVN 3216 – 79

3. PHƯƠNG PHÁP THỬ LÝ HÓA:

3.1. Hóa chất:

Thuốc thử dùng cho việc kiểm nghiệm phải là loại tinh khiết phân tích.

3.2. Xác định tỷ trọng.

3.2.2. Nội dung:

Đo tỷ trọng của xirô theo phương pháp tỷ trọng kế sau khi đã điều chỉnh nhiệt độ của xirô về 20°C.

3.2.2. Dụng cụ.

– Ống đong dung tích 250ml

– Tỷ trọng kế chia vạch từ 1,0 – 1,4

Nhiệt kế chia 0,5° có phạm vi đo được từ 0°C – 50°C.

3.2.3. Tiến hành thử:

Rót Xirô vào ống đong theo thành ống (tránh tạo bọt khí). Thả từ từ tỷ trọng kế sạch và khô vào xirô để cho tỷ trọng kế nổi tự do, nhưng không chạm vào thành ống đong. Cắm nhập nhiệt kế vào xirô. Sau khi tỷ trọng kế đứng yên ghi tỷ trọng của xirô ở nhiệt độ 20°C.

3.3. Xác định hàm lượng axít:

3.3.1. Nội dung:

Dùng dung dịch Natri hidroxít 0,1N chuẩn lượng axít có trong xirô với chỉ thị màu là Bromothimola xanh.

3.3.2. Dụng cụ và thuốc thử:

– Buret 100ml chia vạch 0,05ml.

– Bình tam giác 250ml hay cốc thủy tinh 250ml

– Cân phân tích có độ chính xác 0,0001 g

– Natri hidroxít dung dịch 0,1N

– Bromothimola xanh dung dịch 0,05% trong etanola 60°.

3.3.3. Tiến hành thử:

– Cân 10g xirô vào bình tam giác hay cốc thủy tinh 250ml. Thêm khoảng 100ml nước cất và 5 giọt Bromothimola xanh vào bình. Lắc đều và dùng dung dịch Natri hidroxít 0,1N chuẩn cho đến khi chuyển màu của chỉ thị.

– Xác định hai phép song song để lấy kết quả trung bình. Kết quả của hai phép xác định không được chênh lệch nhau quá 01%.

Tiến hành một màu trắng theo đúng quy trình trên.

3.3.4. Tính kết quả:

Hàm lượng axít chuyển ra axít citric tính bằng % khối lượng xirô, theo công thức:

$$X = \frac{(V - V_1) \times K \times 0,007}{m} = 100$$

Trong đó: V: Thể tích dung dịch Natri hidroxit 0,1N tiêu tốn khi chuẩn độ mẫu thực, tính bằng ml.

V_1 : Thể tích dung dịch Natri hidroxit 0,1N tiêu tốn khi chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng ml.

K: Hệ số điều chỉnh dung dịch Natri hidroxit về đúng 0,1N.

0,007: Hệ số chuyển ra acid citric, tương ứng với 1ml dung dịch Natri hidroxit 0,1N.

m: Khối lượng mẫu thử, tính bằng g.

3.4. Xác định hàm lượng đường thử:

3.4.1. Nội dung: hàm lượng đường khử được xác định theo phương pháp Bectrăng.

3.4.2. Dụng cụ và thuốc thử:

– Dụng cụ thông thường của Phòng thí nghiệm như pipet các loại, buret, bình nón, phễu, giấy lọc, cốc thủy tinh.

– Phễu thủy tinh G4 hoặc G5.

– Cân phân tích có độ chính xác 0,0001g.

– Bếp cách thủy.

– Nhiệt kế đo được đến 100°C

– Dung dịch Kali fexoxyanua 15%

– Dung dịch kẽm axetat 30%

– Dung dịch permangamat kali 0,1N.

– Thuốc thử Feling A:

Hòa tan 69,28g sunfat đồng ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) vào nước cất và thêm nước vừa đủ 1000ml.

– Thuốc thử Feling B:

Hòa tan 346g muối Kali – Natri tác trát trong 400 – 500 ml nước cất, mặt khác hòa tan 100g Natri hydroxit trong 200 – 300 ml nước cất. Trộn hai dung dịch với nhau và thêm nước cất vừa đủ 1000ml.

– Dung dịch sắt (III) sunfat $\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_2, 9\text{H}_2\text{O}$.

Hòa tan 50g sắt (III) sunfat trong một lượng nước đủ tan. Thêm từ từ vừa cho vừa lắc đều 200g axit sunfuric đậm đặc, để nguội và thêm nước vừa đủ 1000ml.

Dung dịch này không được chứa sắt (III) oxyt hoặc sắt (II) do đó cần oxy hóa chất sắt (II) bằng cách rỏ dung dịch KM_nO_4 0,1N vào cho đến khi có màu phớt hồng.

3.4.3. Chuẩn bị mẫu thử:

Cân 10g xirô trong cốc thủy tinh 50ml, hòa tan với một ít nước cất, đổ vào bình định mức dung tích 200ml. Rửa chén cân với nước cất, nước rửa dồn tất cả vào bình định mức. Cho nước cất đến khoảng ba phần tư bình, lắc đều. Cho thêm 5ml dung dịch Kali Ferexyanua 15% và 5ml dung dịch kẽm axetal 30% để khử tạp chất, lắc mạnh và thêm nước vừa đủ 200ml. Lắc đều, để lắng, lọc qua giấy lọc gấp khô, giữ nước lọc để định hàm lượng đường.

3.4.4. Tiến hành thử:

Trong bình nón dung tích 250ml cho vào:

- Dung dịch Feling A 10ml.
- Dung dịch Feling B 10ml.

Đun sôi cho 5,10 hay 20ml dung dịch lọc đã chuẩn bị ở phần 3.4.3 (tùy theo lượng đường khử có trong xirô nhiều hay ít) và thêm khoảng 20ml nước cất. Lắc đều đun nhẹ sau 2 – 3 phút toàn bộ dung dịch phải sôi, giữ ở nhiệt độ sôi đúng 3 phút.

Lấy bình ra, để nghiêng cho cặn đồng (1) oxit lắng xuống một phía. Dung dịch bên trên lớp cặn phải có màu xanh của đồng (II) hydroxit. Nếu dung dịch bên trên có màu lục, vàng hay nâu, nghĩa là không đủ lượng đồng cần thiết, phải làm lại và lấy một lượng dung dịch lọc ít hơn, cuối cùng cũng thêm nước cất cho có toàn bộ khoảng 50ml.

Khi kết tủa đồng (1) oxit lắng hết, gạn phần nước bên trên và lọc qua phễu lọc xốp G4 hoặc G5 cắm xuyên qua nút cao su của bình lọc chân không. Cho nước đun sôi vào bình nón và tiếp tục gạn lọc vào phễu cho đến khi nước trong bình nón hết màu xanh. Trong quá trình gạn lọc, chú ý tránh không cho kết tủa ròi vào phễu và luôn luôn giữ một lớp nước đã đun sôi trên bề mặt kết tủa trong bình nón và phễu.

Sau lần gạn cuối cùng, dùng ống đong cho vào bình nón một lượng dung dịch sắt (III) sunfat để hòa tan kết tủa đồng. Thay bình lọc mới, đồng thời cho thêm dung dịch sắt (III) vào phễu lọc để hòa tan kết tủa đồng (I) oxit trên bề mặt phễu. Tránh bình nón và cả phễu bằng dung dịch sắt (III) sunfat cho đến không còn vết đồng (I) oxit trong bình nón và trong phễu. Hút xuống bình lọc và tráng rửa lại bằng nước cất đun sôi cả xuống bình lọc. Chú ý là chỉ dùng khoảng 30 – 50ml sắt (III) sunfat để hòa tan hoàn toàn kết tủa đồng (I) oxit, tráng bình và rửa phễu.

Lấy bình lọc ra và chuẩn độ dung dịch sắt (II) hình thành bằng dung dịch KM_nO_4 cho tới khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây.

Tiến hành làm mẫu trắng theo đúng quy trình trên. Lấy số ml Kali permanganate 0,1N chuẩn mẫu thử trừ đi số ml KM_nO_4 chuẩn mẫu trắng rồi tra bảng 1 sẽ có lượng mg glucoza có trong số ml dung dịch thử.

Xác định hai phép song song để lấy kết quả trung bình. Kết quả hai phép xác định này không được chênh nhau quá 0,5%.

3.4.5. Tính kết quả:

Hàm lượng đường khử glucoza tính bằng % khối lượng xirô theo công thức:

$$X = \frac{ml.200}{m. V. 1000} = 100$$

Trong đó:

ml – khối lượng glucoza, tính bằng mg tương ứng với số ml KM_nO_4 0,1N đọc trong bảng 1.

m – Khối lượng mẫu thử, tính bằng gam.

V – Thể tích xirô đã pha loãng (dịch qua lọc) lấy để kết tủa oxit đồng (I).

1000 – Chuyển từ miligam sang gam.

200 – Độ pha loãng của mẫu thử.

3.5. Xác định hàm lượng đường toàn phần.

3.5.1. Nội dung:

Hàm lượng đường toàn phần được xác định theo phương pháp Bectrăng sau khi xirô đã thủy ngân.

3.5.2. Dụng cụ hóa chất:

- Giống như phần xác định hàm lượng đường khử.
- Bếp cách thủy.
- Axít clohidric đậm đặc = 1,18
- Natri hidrít dung dịch 20% và 1%

Bảng 1

| Glocoza (mg) | Dung dịch KM_nO_4 0,1N (ml) | Glucoza (mg) | Dung dịch KM_4O_4 0,1N (ml) |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| 10 | 3,21 | 27 | 8,39 |
| 11 | 3,52 | 28 | 8,70 |
| 12 | 3,83 | 29 | 8,99 |
| 13 | 4,14 | 30 | 9,30 |

| | | | |
|----|------|----|-------|
| 14 | 4,45 | 31 | 9,58 |
| 15 | 4,75 | 32 | 9,88 |
| 16 | 5,07 | 33 | 10,10 |
| 17 | 5,39 | 34 | 10,30 |
| 18 | 5,72 | 35 | 10,70 |
| 19 | 5,99 | 36 | 10,90 |
| 20 | 6,31 | 37 | 11,20 |
| 21 | 6,61 | 38 | 11,50 |
| 22 | 6,91 | 39 | 11,80 |
| 23 | 7,38 | 40 | 12,20 |
| 24 | 7,52 | 41 | 12,40 |
| 25 | 7,81 | 42 | 12,70 |
| 26 | 8,09 | 43 | 13,00 |

3.5.3. Tiến hành thử:

Cho vào bình nón dung tích 250ml, 2 hoặc 5ml dịch qua lọc (đã chuẩn bị ở phần 3.4.3) tùy theo lượng đường nhiều hay ít. Thêm nước cho vừa đủ 20ml và 0,5ml Axit clohidric đậm đặc.

Thủy phân xirô để chuyển sang saccaroza về glucoza bằng cách cho hẵng bình nón vào bếp cách thủy sôi trong 30 phút. Lấy ra làm nguội nhanh dưới vòi nước. Dùng dung dịch Natri hidroxyt 10% trung hòa trước, sau đó dùng dung dịch Natri hidroxit 1% với chỉ thị phenolphthalein.

Cho vào bình nón.

– 10 ml dung dịch Feling A

– 10 ml dung dịch Feling B

Tiến hành làm như phần đường khử.

Xác định hai phép song song để lấy kết quả trung bình. Kết quả của hai phép xác định này không được chênh nhau quá 0,5%.

3.5.4. Tính kết quả:

Hàm lượng đường toàn phần tính ra glucoza bằng % khối lượng xirô, theo công thức:

$$X = \frac{\text{ml. 200}}{\text{mV 1000}} 100$$

Trong đó:

ml – Khối lượng glucoza, tính bằng mg tương ứng với số ml KM_nO_4 , đọc trong bảng.

m – Khối lượng mẫu thử tính bằng g.

V – Thể tích xirô đã pha loãng (dịch qua lọc) lấy để kết tủa oxit đồng (I).

1000 – chuyển từ mg ra gam.

200 – Độ pha loãng của mẫu thử.

3.6. Xác định hàm lượng Saccarôza:

Hàm lượng saccarôza tính bằng % khối lượng xirô, theo công thức:

$$X = (A - B) \times 0,95$$

Trong đó:

A – Hàm lượng đường toàn phần trong 100g xirô.

B – Hàm lượng đường khử trong 100g xirô.

0,95 – Hệ số chuyển từ glucoza sang saccarôza.

3.7. Định tính saccarôza.

3.7.1. Nội dung:

Dùng ete etylic để chiết Saccarin, chuyển Saccarin về axit Salisilic và dùng dung dịch clorua sắt III pha loãng để định tính axit Salisilic.

3.7.2. Thuốc thử và dụng cụ:

- Axit axetic dung dịch 1%.
- Chì axetat, trung tính dung dịch 30%.
- Ete etylic.
- Natri hidroxit dung dịch 30%
- Axit sunfudric dung dịch 10%
- Axit Clohidric đậm đặc $d = 1,18$
- Peclorua sắt III dung dịch 0,5N
- Chén để kết tinh 100ml
- Bình lắng gạn
- Chén sứ đáy tròn
- Bếp cách thủy, lò nung.

3.7.3. Tiến hành thử:

Cho vào chén kết tinh 50ml xirô, làm bay hơi trên bếp cách thủy sôi để loại các chất bay hơi. Axit hóa nhẹ bằng vài giọt axit axêtic 1%. Thêm khoảng 10ml chì axetat 30% để loại tạp chất. Sau đó dùng axit sunfuric 10% để loại chì

axêttát thừa. Khuấy đều và lọc qua giấy lọc gấp. Dung dịch này được trích 3 lần, mỗi lần 25ml ête êtylic trong bình lắng gạn. Ête sau mỗi lần trích phải giữ trong chén có đáy tròn bằng sứ. Làm bay hơi ête cho cạn. Ném cạn còn lại, nếu có vị ngọt thực hiện tiếp phân định tính saccarin.

Hòa tan cạn trong chén với 2ml nước cất và 2 giọt Natri hidrít 30% làm bay hơi cho cạn trên bếp cách thủy sôi. Sau đó nung chén ở nhiệt độ 170 – 200°C trong 20 phút. Để nguội, hòa tan lại trong 2 ml nước cất, trung hòa với axit clohidric đậm đặc cho đến khi đổi màu giấy quì tím. Cho vài giọt peclorua sắt (III), 0,5N. Nếu có Saccarin dung dịch sẽ có màu tím.

Chú thích: Có thể dùng phương pháp sắc ký giấy, sắc ký bản mỏng để định tính saccarin.