

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC – THỰC PHẨM

GIÁO TRÌNH

MÔN HỌC: PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH LƯỢNG
THỰC THỰC PHẨM

NGHỀ: KIỂM NGHIỆM CHẤT LƯỢNG LƯƠNG THỰC,
THỰC PHẨM

TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG – TRUNG CẤP



(Ban hành kèm theo Quyết định số: 761/QĐ-CDLTTP-ĐT ngày 17 tháng 08 năm 2017 của Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Lương thực Thực phẩm)

Đà Nẵng, năm 2017

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

LỜI GIỚI THIỆU

Giáo trình môn học Phân tích chỉ tiêu chất lượng cơ bản lương thực thực phẩm là giáo trình được biên soạn để sử dụng trong giảng dạy và học tập của học sinh, sinh viên nghề Kiểm nghiệm chất lượng lương thực thực phẩm, trình độ cao đẳng và trung cấp.

Giáo trình nhằm cung cấp cho sinh viên những kiến thức cơ sở về các phương pháp phân tích các chỉ tiêu cảm quan, chỉ tiêu lý hóa và chỉ tiêu vi sinh của lương thực thực phẩm.

Giáo trình này gồm các nội dung sau:

Chương 1. Phân tích, đánh giá cảm quan

Chương 2. Phương pháp phân tích chỉ tiêu lý hóa

Chương 3. Phương pháp phân tích chỉ tiêu vi sinh

Mặc dù, đã rất cố gắng nhưng giáo trình vẫn không tránh khỏi thiếu sót, rất mong sự góp ý của quý bạn đọc.

Đà Nẵng, ngày.....tháng..... năm 2017

Tham gia biên soạn

1. Trần Thị Minh Hương (chủ biên)

2. Ngô Thị Song

MỤC LỤC

LỜI GIỚI THIỆU	1
MỤC LỤC	2
CHƯƠNG 1: PHÂN TÍCH, ĐÁNH GIÁ CẢM QUAN	5
Mục tiêu:	5
A. Nội dung	5
1. Khái niệm về phân tích, đánh giá cảm quan.....	5
1.1. Khái niệm phân tích cảm quan	5
1.2. Khái niệm đánh giá cảm quan	5
2. Tính khách quan và chủ quan của phương pháp	5
3. Cơ sở khoa học của phân tích cảm quan	6
3.1. Hệ thống các giác quan và cảm giác nhận được.....	6
3.2. Ngưỡng cảm giác	10
4. Kỹ thuật chung đánh giá các chỉ tiêu cảm quan	11
4.1. Kỹ thuật đánh giá màu sắc, hình thái bên ngoài.....	11
4.2. Kỹ thuật đánh giá mùi	11
4.3. Kỹ thuật đánh giá vị	11
4.4. Kỹ thuật đánh giá cấu trúc, trạng thái	12
5. Các phép thử cảm quan	12
5.1. Nhóm phép thử phân biệt	12
5.2. Nhóm phép thử phân tích mô tả	15
5.3. Nhóm phép thử thị hiếu.....	17
5.4. Phép thử cho điểm chất lượng sản phẩm theo TCVN 3215- 79	19
6. Các yêu cầu cần thiết trong đánh giá cảm quan	21
6.1. Phòng thí nghiệm đánh giá cảm quan	21
6.2. Dụng cụ cảm quan.....	22
6.3. Hội đồng đánh giá cảm quan.....	23
6.4. Nhân viên phòng đánh giá cảm quan	23
6.5. Người đánh giá cảm quan.....	23
6.6. Mẫu và chuẩn bị mẫu	24
6.7. Thanh vị.....	27
6.8. Bồi dưỡng độc hại	27
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	27
C. Ghi nhớ	28
CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU LÝ HÓA	29
Mục tiêu:	29
A. Nội dung	29
1. Xác định độ ẩm.....	29

1.1. Phương pháp sấy khô đến trọng lượng không đổi.....	29
1.2. Phương pháp chưng cất với dung môi.....	31
2. Xác định độ tro.....	32
2.1. Xác định tro toàn phần.....	32
2.2. Xác định tro không tan trong HCl.....	34
3. Xác định hàm lượng acid – kiềm.....	35
3.1. Xác định hàm lượng acid.....	35
3.2. Xác định hàm lượng kiềm.....	36
4. Xác định hàm lượng NaCl.....	37
4.1. Nguyên tắc: Theo phương pháp Morh.....	37
4.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất.....	37
4.3. Tiến hành.....	37
4.4. Tính kết quả.....	38
5. Xác định hàm lượng nitơ.....	38
5.1. Xác định hàm lượng nitơ toàn phần.....	38
5.2. Xác định hàm lượng protein.....	41
5.3. Xác định hàm lượng nitơ formol.....	42
5.4. Xác định hàm lượng amoniac.....	45
6. Xác định hàm lượng lipid.....	46
6.1. Xác định lipid tự do bằng phương pháp Soxhlet.....	46
6.2. Xác định chất béo bằng phương pháp Adam – Rose – Gottlieb.....	48
7. Xác định hàm lượng glucid.....	49
7.1. Xác định hàm lượng đường khử.....	49
7.2. Xác định hàm lượng saccharose.....	56
7.3. Xác định hàm lượng tinh bột.....	58
7.4. Xác định hàm lượng cellulose.....	59
B. Câu hỏi và bài tập thực hành.....	61
C. Ghi nhớ.....	62
CHƯƠNG 3: PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU VI SINH.....	63
Mục tiêu:.....	63
A. Nội dung.....	63
1. Quy trình chung phân tích một chỉ tiêu vi sinh.....	63
1.1. Chuẩn bị phòng thí nghiệm và dụng cụ phân tích vi sinh.....	63
1.2. Pha chế môi trường vi sinh.....	66
1.3. Chuẩn bị mẫu phân tích.....	69
1.4. Cấy mẫu vi sinh vật.....	69
1.5. Nuôi ủ.....	72
1.6. Quan sát, đọc và tính kết quả.....	72

2. Các phương pháp định tính vi sinh vật.....	72
2.1. Phương pháp quan sát trên kính hiển vi	72
2.2. Phương pháp lọc màng.....	73
2.3. Phương pháp quan sát hình thái khuẩn lạc	74
.....	75
.....	75
2.4. Phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng.....	75
3. Các phương pháp định lượng vi sinh vật	75
3.1. Phương pháp xác định khối lượng khô	75
3.2. Phương pháp đo độ đục.....	76
3.3. Phương pháp đếm trực tiếp số lượng tế bào.....	76
3.4. Phương pháp đếm khuẩn lạc	78
3.5. Phương pháp đếm số có xác xuất lớn nhất MPN	80
3.6. Phương pháp màng lọc.....	81
4. Phương pháp phân tích một số chỉ tiêu vi sinh thường gặp	82
4.1. Xác định vi sinh vật tổng số	82
4.2. Xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	85
4.3. Xác định <i>Coliforms</i> tổng số.....	87
4.4. Xác định <i>E. Coli</i>	91
4.5. Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí sinh H ₂ S.....	96
B. Câu hỏi và bài tập thực hành.....	98
C. Ghi nhớ	99
HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔN HỌC	100
I. Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học.....	100
II. Mục tiêu của môn học.....	100
III. Tài liệu tham khảo	101

GIÁO TRÌNH MÔN HỌC

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM

Mã môn học: 100103 - 170103

CHƯƠNG 1: PHÂN TÍCH, ĐÁNH GIÁ CẢM QUAN

Mục tiêu:

- Nêu được khái niệm phân tích, đánh giá cảm quan và cơ sở khoa học của phân tích cảm quan;
- Trình bày được các phép thử cảm quan và kỹ thuật chung đánh giá các chỉ tiêu cảm quan của LTTP;
- Nêu được các yêu cầu cần thiết trong đánh giá cảm quan;
- Lựa chọn được phép thử cảm quan phù hợp với mục đích phân tích, đánh giá;

A. Nội dung

1. Khái niệm về phân tích, đánh giá cảm quan

1.1. Khái niệm phân tích cảm quan

Phân tích cảm quan là kỹ thuật sử dụng các cơ quan cảm giác của con người để tìm hiểu, mô tả và định lượng các chỉ tiêu cảm quan của một sản phẩm thực phẩm như màu sắc, mùi, vị và cấu trúc.

Trong phân tích cảm quan, các giác quan của con người được sử dụng như một dụng cụ đo. Các giác quan làm nhiệm vụ nhận thông tin như là màu sắc, mùi, vị, qua phân tích xử lý và đưa ra kết quả dưới dạng các giá trị ước lượng, so sánh và mô tả. Sau đó các kết quả này sẽ được xử lý bằng phương pháp toán thống kê.

Các tính chất cảm quan của sản phẩm khi phân tích cảm quan được nhận biết một cách khách quan, vốn có của sản phẩm bằng các cơ quan cảm giác mà không phụ thuộc vào người thử

1.2. Khái niệm đánh giá cảm quan

Đánh giá cảm quan là một phương pháp khoa học dùng để gọi lên, đo đạc, phân tích và giải thích các cảm nhận của con người đối với sản phẩm thông qua các giác quan là thị giác, khứu giác, xúc giác, vị giác và thính giác (Stone và Sidel, 1993).

Đánh giá cảm quan ngoài mục đích phân tích sản phẩm theo các tính chất cảm quan vốn có còn bao hàm cả nội dung thị hiếu đối với các tính chất hoặc sản phẩm đó.

2. Tính khách quan và chủ quan của phương pháp

Tính khách quan hay chủ quan của một phương pháp được ISO định nghĩa như sau:

- Phương pháp khách quan là phương pháp mà trong đó hệ quả của những ảnh hưởng của con người khi thao tác được tối thiểu hóa.

- Phương pháp chủ quan là phương pháp trong đó hệ quả của những ảnh hưởng của con người khi thao tác không được tối thiểu hóa.

Theo định nghĩa này tính khách quan hay chủ quan không phải là kết quả đó được đưa ra bởi con người hay bởi thiết bị mà vấn đề là ảnh hưởng của con người lên quá trình đó có được tối thiểu hóa không.

Những kết quả nhận được trong đánh giá cảm quan thường mang tính chủ quan vì những kết quả đó thường bị ảnh hưởng bởi cách phân tích, đánh giá riêng biệt của từng người. Những người tham gia công tác cảm quan cần được huấn luyện, khi đó sẽ loại bỏ những thủ thuật cá nhân. Hơn nữa việc lựa chọn chính xác phép thử sẽ làm giảm hiệu ứng của những ảnh hưởng bên ngoài, chúng ta sẽ thu được những kết quả khách quan. Những kết quả này sau đó nếu được xử lý một cách đúng đắn sẽ đưa đến những kết luận chính xác.

3. Cơ sở khoa học của phân tích cảm quan

3.1. Hệ thống các giác quan và cảm giác nhận được

3.1.1. Hệ thống các giác quan

Việc nhận được những tính chất cảm quan của thực phẩm là nhờ hoạt động của các giác quan. Hệ thống các giác quan của con người bao gồm: Thị giác, thính giác, xúc giác, vị giác và khứu giác. Tính chất vật lý, giải phẫu và tâm lý của các bộ phận giác quan được trình bày ở bảng 1.1.

Bảng 1.1. Tính chất vật lý, giải phẫu và tâm lý của các bộ phận giác quan

Hệ thống cảm giác	Bản chất tác nhân kích thích	Cơ quan tiếp nhận	Nơi hình thành	Độ lớn tâm lý
Thị giác	Quang tử	Võng mạc (nơi tiếp nhận hình ảnh)	Võng mạc (nơron)	Kích thước độ chói. Thông tin màu
Thính giác	Rung của khí	Dây thần kinh ốc tai (tế bào ốc tai)	Lõi ốc tai	Chiều cao cường độ âm sắc
Xúc giác: - Sự nhạy cảm xúc giác - Sự nhạy cảm cảm giác vận động - Sự nhạy cảm nhiệt - Sự nhạy cảm hóa học nói chung	Ứng lực cơ học Nhiệt Phần tử khí tiếp xúc trực tiếp	Da và lớp nhầy Cơ bắp, gân và dây chằng Da và lớp nhầy Lớp nhầy	Nếp nhăn vỏ não	Gồ ghề tính se Cứng đàn hồi dẻo Nóng lạnh Nhọn chày kích thích
Vị giác	Phần tử trong dung dịch muối	Các chồi dây thần kinh vị giác của lưỡi	Lõi của chòm thần kinh riêng	Chua đắng
Khứu giác	Phần tử ở pha khí	Lớp nhầy	Hành não khứu giác	Cường độ mùi hương thơm

3.1.2. Thông tin cảm giác

Để phân tích, đánh giá các tính chất cảm quan của thực phẩm, cần trải qua các bước: đầu tiên là tiếp nhận thông tin, sau đó truyền thông tin qua hệ cảm giác (các giác quan) và cuối cùng là xử lý thông tin. Nguyên lý chung của việc tiếp nhận, truyền và xử lý thông tin của các hệ thống giác quan là tương tự nhau.

Trước hết phải có cơ chế kích thích như các chất hóa học trong mùi, vị, ánh sáng trong kích thích thị giác, âm thanh trong kích thích thính giác, nhiệt độ hay trạng thái trong xúc giác.

Cơ quan thụ cảm của giác quan là những trung tâm bề mặt. Trên trung tâm bề mặt có hệ thống truyền tin và truyền dưới dạng điện. Quá trình vận chuyển thông tin xảy ra khá phức tạp qua những khớp thần kinh để tới bán cầu đại não.

Cường độ của chất kích thích được xác định bởi tần số của dòng điện còn bản chất kích thích được xác định bởi một cơ chế khá phức tạp.

3.1.2.1. Mùi

Mùi là cảm giác hóa học gây ra bởi sự tác động của các phân tử chất bay hơi sau khi vào mũi hòa tan trong chất lỏng của niêm dịch mũi với những cơ quan thụ cảm nằm trên lông mao của màng nhầy khứu giác.

- Một số khái niệm về thuật ngữ mùi

+ Mùi ngửi: là cảm giác nhận được do các chất bay hơi trực tiếp qua đường mũi.

+ Mùi cảm: là cảm giác nhận được do các chất bay hơi vừa qua đường mũi, vừa qua đường hốc miệng lên mũi.

+ Mùi chính: là mùi chủ yếu đặc trưng của chất bay hơi.

+ Mùi thoảng: là mùi nhẹ hay phụ của một tập hợp chất bay hơi.

+ Mùi khuyết: là mùi có trong tập hợp chất bay hơi bị các mùi khác che lấp đi nên không thể cảm nhận được ngay, phải có biện pháp xử lý mới có thể nhận biết dễ dàng.

- Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng cảm thụ của khứu giác bao gồm: Thể trạng mỗi người, lứa tuổi, giới tính, các giác quan khác, thời gian, tình trạng lúc đói hay no, môi trường ngoại cảnh: độ tinh khiết của không khí, nhiệt độ, độ ẩm của không khí, ánh sáng .v.v...

3.1.2.2. Vị

Vị là một trong những chỉ tiêu rất quan trọng đối với chất lượng thực phẩm. Cảm giác về vị rất phong phú. Vị là một cảm giác hóa học gây ra bởi các phân tử hay ion trong dung dịch khi tiếp xúc với các cơ quan thụ cảm vị. Ở người, các cơ quan thụ cảm này nằm trên mặt lưỡi, trong vòm miệng và yết hầu.

Tế bào tiếp nhận vị chủ yếu và nhạy nhất ở trên bề mặt lưỡi và được tập hợp tạo thành những cấu trúc gọi là nụ (gai) vị giác có đường kính khoảng 0,04mm. Không có tế bào tiếp nhận đặc biệt cho mỗi loại vị. Thay vào đó mỗi tế bào tiếp nhận vị có thể truyền những xung điện theo dây thần kinh đến bộ não một số hoặc tất cả các vị. Những tế bào tiếp nhận vị luôn luôn bị phá hủy bởi sự mài mòn và thay thế bằng những tế bào mới. Đời sống của những tế bào mới tiếp nhận vị khoảng 2 tuần lễ.

- 5 vị cơ bản

+ Ngọt: có nhiều chất gây cảm giác, phần lớn là các chất hữu cơ như đường, glycol, alcol, aldehyde, cetone, este, amino acid và một vài muối vô cơ. Vị ngọt cơ bản được đặc trưng bởi dung dịch đường saccharose nồng độ 20g/l.

+ Mặn: do các muối phân ly gây ra. Vị mặn của các muối khác nhau cũng khác nhau. Các ion dương gây cảm giác vị mặn là chính, các ion âm thì có vai trò yếu hơn. Vị mặn cơ bản được đặc trưng bởi dung dịch muối ăn có nồng độ từ 2g/l.

+ Chua: do acid gây ra, cường độ cảm giác chua tỷ lệ logarit nồng độ ion H^+ . Nồng độ ion này càng mạnh thì gây ra cảm giác chua càng nhiều. Vị chua cơ bản đặc trưng bởi dung dịch citride acid nồng độ 0,7g/l.

+ Đắng: do nhiều chất gây ra và hầu hết cũng là những chất hữu cơ, trong số đó có những chất mạch dài chứa nitơ và các alkaloid (cafeine, strychnine, nicotine, quinine .v.v...). Vị đắng được đặc trưng bởi dung dịch cafeine nồng độ 0,7g/l. Một số chất lúc đầu thì gây ra cảm giác ngọt nhưng sau đó lại gây ra cảm giác đắng (saccharin). Khi cảm giác đắng mạnh thì làm cho người và động vật tổng thức ăn ra ngoài. Đây có thể là mục đích quan trọng của cảm giác này vì nhiều chất độc gây chết có trong thực vật là các alkaloid có vị rất đắng.

+ Umami: vị bột ngọt, rau quả, vị ngọt thịt.

- Một số hiện tượng thường xảy ra đối với cơ quan vị giác

+ Hiện tượng thích nghi: là hiện tượng giảm khả năng nhạy cảm nhất thời của cơ quan vị giác.

+ Hiện tượng mệt mỏi: là hiện tượng mà chất kích thích có nồng độ lớn sẽ tạo nên sự hủy hoại thần kinh. Sự hủy hoại này không hồi phục ngay được.

+ Hiện tượng bù trừ: là hiện tượng khi phối hợp hai vị cơ bản với nhau lớn hơn nồng độ ngưỡng cảm. Tăng nồng độ một trong hai vị này sẽ xảy ra hiện tượng vị này lấn át vị kia hoặc kích thích vị kia.

+ Hiện tượng cạnh tranh (trương phản): là hoạt động phối hợp của hai hay nhiều chất kích thích gây ra một mức cảm giác thấp hơn những tác động của mỗi kích thích riêng biệt.

+ Hiện tượng tiêu tan cảm giác: là do hai vị tác động đồng thời trên lưỡi, trong đó một vị bị chìm đi dù có nồng độ cao hơn nồng độ ngưỡng cảm.

+ Hiện tượng hòa hợp: là hiện tượng xảy ra khi phối hợp nhiều vị khác nhau.

Ngọt + chua

Ngọt + mặn

Ngọt + đắng

Đắng + chua

Đắng + mặn

+ Hiện tượng nguy trang về vị: là sự giảm cường độ hoặc thay đổi cường độ của một vị bởi một vị khác.

+ Hiện tượng cảm giác về vị: là hiện tượng khi trộn hai hay ba vị cơ bản với nhau, sẽ tạo ra một vị khác hẳn với những vị trên.

- Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng cảm thụ của vị giác

+ Tuổi tác

+ Thời gian trong ngày

+ Trạng thái cơ thể

+ Nhiệt độ

+ Trạng thái kết cấu: chất tạo vị hòa tan trong nước dễ nhận vị hơn chất hòa tan trong dầu.

+ Điều kiện ăn uống, nghỉ ngơi: sau khi ăn một giờ, ngưỡng cảm sẽ giảm, khả năng nhạy cảm kém, trước khi ăn rất nhạy cảm với vị, ngưỡng sẽ tăng.

+ Hình thái bên ngoài của sản phẩm cũng kích thích cảm giác.

+ Kỹ thuật cảm nhận vị tùy thuộc vào từng sản phẩm nhưng phải tạo được một hợp chất của thực phẩm và nước bọt trải đều lên các tế bào vị giác.

3.1.2.3. Màu sắc, hình thái bên ngoài

Màu sắc là một chỉ số quan trọng của giá trị cảm quan. Màu sắc của các sản phẩm thực phẩm không chỉ có giá trị về mặt hình thức mà còn có tác dụng sinh lý rõ rệt. Màu sắc thích hợp sẽ giúp cho cơ thể đồng hóa thực phẩm dễ dàng.

Mắt là cơ quan thị giác, báo cho cơ thể những cảm giác về màu sắc, hình dạng, các tính chất bề mặt và cấu trúc, trạng thái của thực phẩm như mức độ trơn, bóng, độ nhớt, độ đục .v.v...

Nguồn kích thích thị giác là ánh sáng. Mắt người nhận rõ chùm tia sáng có màu sắc từ tím chuyển sang lam, lục, vàng da cam rồi đến màu đỏ trong bước sóng khoảng 380÷740nm. (Vùng bước sóng nhỏ hơn 380nm là vùng tia cực tím, vùng lớn hơn 740nm là vùng hồng ngoại). Các nghiên cứu gần đây cho thấy ở “nón” (là đuôi gai của thần kinh thị giác ngoại biên) có thể cảm thụ với 3 màu đơn: đỏ, lam, lục. Nếu 3 màu này tác động đồng thời thì ta có cảm giác trắng và nếu chúng hỗn hợp theo các tỉ lệ khác nhau, ta sẽ có đủ các sắc độ màu của thiên nhiên. Thị giác tiếp nhận loại kích thích vật lý, chứ không phải kích thích hóa học.

- Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng cảm thụ của thị giác

Hình dáng, trạng thái của mẫu, cách chuẩn bị và cách trình bày mẫu, dụng cụ. Dụng cụ phải tuyệt đối đồng nhất về vật liệu, kích thước, màu sắc. Ví dụ cùng một loại rượu và lượng rượu ta sẽ thấy màu sắc khác nhau nếu chứa trong hai ly có thể tích khác nhau hay kích thước và các khuyết tật về dạng bên ngoài của rau quả sẽ được ghi nhận khác nhau tùy theo lượng sản phẩm được bày ra đĩa.

3.1.2.4. Trạng thái và cấu trúc

Trạng thái và cấu trúc của sản phẩm thực phẩm được cảm nhận bởi cơ quan xúc giác.

Cơ quan xúc giác là da, niêm mạc, bề mặt lưỡi và răng. Cơ quan xúc giác báo cho cơ thể những cảm giác về tiếp xúc, va chạm, nóng, lạnh, đau, cấu trúc của vật rắn và nhớt. Trong đánh giá cảm quan thực phẩm, ta quan tâm đến cảm giác nhiệt và cảm giác va chạm.

Cảm giác nhiệt: là cảm giác về nóng và lạnh. Cảm giác về nóng lạnh liên quan đến sự mất hay tăng nhiệt lượng (calo) chứ không phải nhiệt độ cao hay thấp. Nếu giảm mất nhiều calo, ta cảm thấy lạnh chứ không hẳn vì lạnh (nhiệt độ) mà ta thấy lạnh (sốt cúm 40°C nhưng vẫn phải đắp chăn vì lạnh).

Cảm giác va chạm: xuất hiện khi da và niêm mạc ngoài tiếp xúc với một vật lạ, hoặc khi bị đè, kéo. Các giác quan có sự bổ sung, hỗ trợ và thay thế (một phần) cho nhau, xúc giác và thính giác còn có cùng một gốc. Khi gõ nhẹ lên da với tần số đùng nhanh quá, da có khả năng nhận ra từng lần va chạm riêng lẻ, nhưng nếu gõ trên 40 lần mỗi giây thì da cảm thấy sự va chạm như liên tục. Nếu tần số rung từ 16 trở lên, tai có thể nghe được âm thanh do vật rung phát ra. Như vậy nếu tần số rung từ 16÷40, ta vừa nghe được, lại vừa nhận ra bằng xúc giác.

Trong miệng bề mặt lưỡi và phần cơ xung quanh vòng miệng nhạy cảm với hình dạng, cấu trúc và tính chất bề mặt của sản phẩm.

Răng có tác dụng xác định cấu trúc của vật khi nhai.

Ngoài ra, cấu trúc của thực phẩm còn được xác định thông qua thính giác. Âm thanh tạo ra khi bề gãy hoặc cắn vỡ sản phẩm cho ta biết được độ giòn của sản phẩm.

3.2. Ngưỡng cảm giác

3.2.1. Khái niệm

Khi thử nếm, mỗi một mức kích thích cho ta một cảm giác khác nhau. Ví dụ khi nếm chè ướp hương nhài ở nồng độ hương rất thấp, chúng ta chỉ có thể biết là có ướp hương nhưng chưa dám khẳng định là hương nhài hay hương sen. Khi nồng độ hương cao hơn, chúng ta nhận được cường độ hương càng lớn, nhưng phải cần một nồng độ đủ lớn để có thể phân biệt được nó với cường độ thơm trước đó. Mỗi một mức cảm giác nhận được đó gọi là ngưỡng cảm giác.

Ngưỡng cảm giác là giá trị của một kích thích cảm giác cần thiết để đạt đến một cảm giác đặc trưng nào đó. Đối với mùi vị, các giá trị ngưỡng được đo bằng nồng độ của các chất kích thích trên một chất mang nào đó.

Ngưỡng cảm giác có vai trò quan trọng trong đánh giá cảm quan. Người ta thường dùng nó để đánh giá tính nhạy cảm của các thành viên trong hội đồng cảm quan. Việc huấn luyện có thể cho phép giảm ngưỡng cảm và giảm độ phân tán giữa các thành viên. Người có ngưỡng cảm thấp, câu trả lời sẽ mang lại nhiều thông tin hơn và độ chính xác sẽ cao hơn.

3.2.2. Các loại ngưỡng cảm giác

- Ngưỡng cảm phát hiện: Là giá trị của một kích thích cảm giác cần thiết để gây ra được một cảm giác.

Ví dụ: Cho một loạt mẫu, hai mẫu đầu tiên là mẫu nước tinh khiết, còn các mẫu sau chứa dung dịch đường với nồng độ tăng dần. Nếm các mẫu theo thứ tự đến khi phát hiện ra dung dịch đường khác với nước tinh khiết thì ngay tại giá trị đó của dung dịch đường gọi là ngưỡng cảm phát hiện.

- Ngưỡng cảm xác định: Là giá trị của một kích thích cảm giác nhỏ nhất cho phép xác định bản chất của kích thích đó.

Ví dụ: Tiếp tục nếm các dung dịch trên với nồng độ tăng dần đến khi nhận thức được nó có vị ngọt. Tại giá trị đó của dung dịch đường gọi là ngưỡng cảm xác định.

- Ngưỡng cảm cuối cùng: Là giá trị tối đa của kích thích mà vượt qua đó cường độ cảm giác không tăng nữa.

Người thử phân biệt được hai dung dịch đường nồng độ 68% và 69%, nhưng không thể phân biệt được sự khác nhau giữa hai cốc 69% và 70%, cốc nào có cường độ ngọt lớn hơn. Vậy, ngưỡng cảm cuối cùng của người thử này là 69%.

- Ngưỡng sai biệt: Là sự khác nhau nhỏ nhất về cường độ vật lý của một kích thích để có thể nhận biết được sự khác nhau đó.

Ví dụ: Người thử nhận được 3 cốc nước đường với các nồng độ như sau: 8%; 8,87%; 9%. Khi nếm người thử nhận thấy giữa cốc 1 và 2, hoặc giữa 2 và 3 không có sự khác nhau, còn khi nếm cốc 1 và 3 thì nhận thấy cốc 3 ngọt hơn cốc 1. Vậy người thử có ngưỡng sai biệt nhỏ nhất là 1% tại nồng độ 8,87%.

Giá trị ngưỡng cảm này khác nhau ở những nồng độ khác nhau. Việc huấn luyện có thể làm giảm ngưỡng cảm và giảm độ phân tán giữa các thành viên. Người có ngưỡng cảm thấp, câu trả lời sẽ mang lại nhiều thông tin hơn và sẽ có ý nghĩa hơn. Ngưỡng cảm giác có vai trò quan trọng trong đánh giá cảm quan. Thông qua nó để ghi nhận các kết quả trả lời của hệ thống giác quan và đánh giá độ tin cậy của những trả lời đó.

4. Kỹ thuật chung đánh giá các chỉ tiêu cảm quan

4.1. Kỹ thuật đánh giá màu sắc, hình thái bên ngoài

+ Các chỉ tiêu về màu sắc, hình dáng, tính đồng đều và một phần về cấu tạo trạng thái của sản phẩm là quan sát bằng mắt.

+ Phải qui định rõ các điều kiện khi quan sát và trình tự kiểm nghiệm.

Ví dụ: Nếu lắc chai xirô hoặc nước ngọt để xem độ trong trước, ta sẽ không quan sát được trạng thái ban đầu (lớp bột hoặc lớp dầu trên mặt) của sản phẩm, không thể khui chai bia ra, đánh giá màu sắc, mùi, vị xong mới đánh giá độ bọt vì như thế khí CO₂ bị bay đi rất nhiều.

4.2. Kỹ thuật đánh giá mùi

+ Sản phẩm phải được chứa đựng trong dụng cụ có cùng hình dáng, kích thước, thể tích không khí trên bề mặt thoáng phải như nhau.

+ Mùi phải để cách sản phẩm một khoảng cách như nhau đối với tất cả các mẫu.

+ Có thể ngửi nước lọc để làm giảm mùi đọng lại trên mũi trong thời gian đánh giá cảm quan. Khả năng nhận biết và cường độ mùi nhận được phải thuộc trực tiếp vào nồng độ chất bay hơi chứa trên bề mặt chất mang.

+ Khi so sánh cường độ mùi của các mẫu, sản phẩm phải được chứa trong dụng cụ có cùng hình dạng, kích thước. Thể tích không khí trên bề mặt thoáng phải như nhau. Khi ngửi, mũi phải để cách sản phẩm một khoảng cách như nhau đối với tất cả các mẫu.

4.3. Kỹ thuật đánh giá vị

Kỹ thuật cảm nhận vị tùy thuộc vào từng sản phẩm:

+ Rượu, bia .v.v... khi nếm phải “súc” sản phẩm trong miệng, có thể rít khí qua kẽ răng để chất lỏng tràn đều trên bề mặt lưỡi và có thể tới yết hầu.

+ Đối với nước mắm: nếm một lượng nhỏ ở đầu lưỡi.

+ Đối với các chất rắn: phải cắn, nhai nhỏ, cho nước bọt hòa tan và trải đều trên bề mặt lưỡi.

+ Đối với sản phẩm cho vị đắng chát như nước chè, cafe, kẹo chocolate, rượu vang: việc đưa sản phẩm về cuối lưỡi và nuốt một ít sản phẩm là quan trọng vì các vị này nhận biết mạnh ở cuối lưỡi .v.v ... và sau cùng, trước khi nhổ bỏ, phải chép miệng liên tiếp vài lần hoặc ngậm một lượng thích hợp kéo dài trong một thời gian cần thiết để thụ cảm vị được tối đa.

+ Không nên giữ sản phẩm trong miệng lâu vì dưới tác dụng của enzyme trong nước bọt mà bản chất vị có thể bị thay đổi, ví dụ từ vị nhạt của tinh bột có thể chuyển thành vị ngọt của đường.

4.4. Kỹ thuật đánh giá cấu trúc, trạng thái

+ Xác định độ cứng hay mềm của sản phẩm có thể xác định bằng cách bắm, bẻ, bóp bằng đầu ngón tay hoặc cắn nhai bằng miệng. Để xác định độ cứng của hạt cafe rang hay kẹo lạc có thể cắn, thông qua độ cứng có thể xác định độ ẩm của sản phẩm.

+ Trong kiểm nghiệm cảm quan, các đầu ngón tay và lòng bàn tay dùng để kiểm nghiệm về trạng thái và cấu trúc của sản phẩm (độ chắc của tôm sống, tôm luộc, độ mịn của bột, mắm ruốc .v.v...). Ở đây có sự phối hợp rất chặt chẽ giữa cảm giác ở ngón tay, lòng bàn tay và mắt đôi khi cả tai và lưỡi nữa. Ví dụ: kết hợp việc dùng tay, dùng mắt, dùng lưỡi và nghe âm thanh (khi nhai con tôm luộc) sẽ dễ dàng nhận biết độ săn chắc của thịt tôm luộc.

5. Các phép thử cảm quan

5.1. Nhóm phép thử phân biệt

Các phép thử phân biệt được dùng khi chuyên gia cảm quan muốn xác định xem liệu hai mẫu nào đó có khác nhau về mặt cảm giác hay không. Hai mẫu có thể khác nhau về bản chất hóa học, nhưng con người lại không thể nhận ra sự khác biệt này. Nếu sự khác nhau giữa các mẫu là rất lớn và rõ ràng lúc đó các phép thử phân biệt không còn tác dụng. Khi kiểm tra sơ qua và thấy rằng hai mẫu là khác nhau có thể nhận biết được đối với tất cả những người thử, các kỹ thuật này sẽ không nên sử dụng nữa. Trong trường hợp đó cần thực hiện phép thử cho điểm để xác định độ lớn chính xác của sự khác nhau giữa các mẫu. Phép thử phân biệt hiệu dụng nhất khi sự khác nhau giữa các mẫu là khó nhận thấy.

5.1.1. Phép thử so sánh cặp

Phép thử so sánh cặp có hai dạng: Phép thử so sánh cặp đôi định hướng (phép thử bắt buộc lựa chọn một trong hai mẫu) và phép thử so sánh cặp đôi sai biệt (phép thử sai biệt đơn giản hay phép thử giống/ khác nhau)

Để quyết định lựa chọn một trong hai phép thử trên phụ thuộc vào mục đích nghiên cứu. Với cả hai loại phép thử so sánh cặp đôi, xác suất lựa chọn một sản phẩm cụ thể mà chỉ dựa trên sự suy đoán là bằng 1/2.

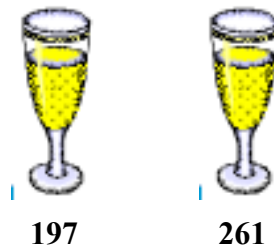
Trong quá trình làm thí nghiệm, người thử sẽ nhận được các cặp mẫu, họ phải chỉ ra trong mỗi cặp mẫu này mẫu nào là mẫu có tính chất cảm quan đang cần tìm hiểu mạnh hơn (ví dụ như ngọt hơn). Trong trường hợp người thử không nhận ra mẫu nào hơn, họ vẫn đưa ra câu trả lời bằng cách lựa chọn ngẫu nhiên một trong hai mẫu. Phương pháp xử lý thống kê kết quả của phép thử này phải tính đến trường hợp vừa nêu, nghĩa là mỗi người thử xác suất họ đưa ra một câu trả lời đúng một cách ngẫu nhiên là 50%.

5.1.1.1. Phép thử so sánh cặp đôi định hướng

Trong trường hợp này người thử muốn xác định các mẫu thử có hay không sự khác nhau về một thuộc tính nào đó, như độ ngọt, màu vàng, độ giòn .v.v... Hai mẫu thử được đặt trước người thử một cách đồng thời và người thử được yêu cầu phải xác định mẫu nào mạnh hơn về một thuộc tính cảm quan cụ thể nào đó.

Người thử phải hiểu một cách rõ ràng các thuộc tính do chuyên gia cảm quan đưa ra và do đó người thử nên được huấn luyện thực hiện công việc được mô tả trong phiếu đánh giá cảm quan. Thứ tự trình bày mẫu trong phép thử này có hai khả năng (AB, BA). Thứ tự này phải được hiện một cách ngẫu nhiên đối với tất cả các thành viên, bảo đảm rằng các thành viên đều được thử mẫu A hay mẫu B đầu tiên với số lần như nhau.

Kết quả của phép thử so sánh cặp đôi định hướng chỉ ra hướng khác nhau cụ thể giữa hai mẫu thử. Chuyên gia cảm quan phải chắc chắn rằng hai mẫu thử chỉ khác nhau về một đặc tính cảm quan cụ thể duy nhất. Đây thường là vấn đề của phép thử phân biệt trong đánh giá cảm quan thực phẩm. Bởi vì thay đổi một thông số một cách thường xuyên sẽ ảnh hưởng đến nhiều tính chất cảm quan khác của sản phẩm. Ví dụ bỏ một chút đường trong bánh xốp sẽ làm cho bánh ít ngọt hơn nhưng nó cũng có thể làm thay đổi cấu trúc và màu sắc của bánh. Trong trường hợp này, phép thử so sánh cặp đôi định hướng sẽ không thích hợp để sử dụng.



Mẫu nào ngọt hơn?

Hình 1.1. Minh họa phép thử so sánh cặp đôi định hướng

5.1.1.2. Phép thử so sánh cặp đôi sai biệt

Trong phép thử này người thử chỉ cần so sánh hai mẫu và quyết định xem chúng giống hay khác nhau. Bất kỳ ai cũng có thể thực hiện việc so sánh này một cách dễ dàng và đối với thành viên hội đồng cũng vậy. Vì vậy người thử phải được huấn luyện để hiểu rõ công việc được mô tả trong phiếu đánh giá cảm quan, nhưng họ không cần phải được huấn luyện để đánh giá các đặc tính cảm quan cụ thể.

Phép thử so sánh cặp đôi sai biệt có bốn khả năng trình bày mẫu (AA, BB, AB, BA). Các khả năng này phải được thực hiện ngẫu nhiên đối với tất cả người thử và xuất hiện cùng một số lần như nhau.

Kết quả của phương pháp cặp đôi sai biệt chỉ cho biết người thử có thể phân biệt giữa các mẫu hay không. Nói cách khác nhà khoa học cảm quan sẽ chỉ biết rằng các mẫu được cảm nhận khác nhau, nhưng không biết các mẫu khác nhau về thuộc tính nào.

5.1.2. Phép thử tam giác

Phép thử tam giác được sử dụng nhằm xác định sự khác nhau giữa hai sản phẩm mà không cần bản chất của sự khác nhau đó. Trong trường hợp có nhiều sản phẩm cần đánh giá tiến hành phép thử tam giác trên từng cặp sản phẩm.

Trong phép thử tam giác, người thử sẽ nhận ba mẫu, trong đó hai mẫu giống nhau (gọi là các mẫu lặp lại). Người thử được mời thử các mẫu và tìm ra mẫu nào là không lặp lại (mẫu khác với hai mẫu còn lại).

Phép thử này được áp dụng trong trường hợp sự khác nhau giữa hai sản phẩm là tương đối nhỏ. Nếu người thử không xác định được mẫu không lặp lại thì họ vẫn phải chọn ra một mẫu bất kỳ, như vậy xác suất để người thử đó lựa chọn được câu trả lời đúng một cách ngẫu nhiên là 1/3 số câu trả lời đúng khi người thử không cảm nhận được sự khác nhau giữa các mẫu.



Hình 1.2. Minh họa về phép thử tam giác

5.1.3. Phép thử 2-3

Phép thử 2-3 được sử dụng nhằm xác định sự khác nhau một cách tổng thể giữa hai sản phẩm mà không quan tâm đến việc chúng khác nhau ở đâu.

Khi thực hiện phép thử, người thử sẽ nhận được một mẫu gọi là mẫu kiểm chứng, và hai mẫu khác. Người thử được biết trước là trong hai mẫu này có một mẫu giống với mẫu kiểm chứng. Họ được mời thử nếm và tìm ra mẫu giống với mẫu kiểm chứng.

Trong phép thử này, xác suất đưa ra câu trả lời đúng ngẫu nhiên của người thử trong tình huống họ không cảm nhận được sự khác biệt giữa các mẫu là 1/2. Phép thử 2-3 được dùng nhiều hơn phép thử tam giác trong trường hợp sản phẩm có dư vị mạnh, vì nó đòi hỏi ít lần thử nếm hơn.



Hình 1.3. Minh họa về phép thử 2-3

Phép thử này được áp dụng trong quá trình lựa chọn và huấn luyện hội đồng đánh giá cảm quan vì nó có thể đo được ngưỡng phát hiện của người thử. Ví dụ, trong trường hợp nhà sản xuất muốn thay đổi hàm lượng đường trong một hỗn hợp đồ uống, người ta muốn kiểm tra người thử có nhận ra sự khác biệt giữa các mẫu sản phẩm thí nghiệm với mẫu kiểm chứng. Sử dụng phép thử này cho phép ta xác định được khoảng chênh lệch hàm lượng đường nhỏ nhất mà vượt qua khoảng đó, thì người thử sẽ phát hiện được.

5.1.4. Phép thử A – không A

Phép thử A-không-A về bản chất là một dãy phép thử cặp đôi sai biệt hay phép thử sai biệt đơn giản. Phép thử A-không-A còn gọi là phép thử về tính tương hợp cho phép xác định xem liệu một sản phẩm có giống với một mẫu chuẩn hay không.

Trước tiên người thử sẽ được làm quen để nhận biết mẫu chuẩn A, mẫu này sau đó được lấy đi. Tiếp theo người thử sẽ nhận được một dãy các mẫu đã được mã hóa, trong đó

bao gồm cả mẫu giống với mẫu chuẩn trước (A) và mẫu không giống (KA). Người thử được yêu cầu cho biết đâu là mẫu A và KA. Do người thử không được thử hai mẫu đồng thời (mẫu đang thử và mẫu chuẩn), họ phải nhớ, so sánh hai mẫu và quyết định xem chúng giống hay khác nhau.

Phép thử này người thử phải được huấn luyện để hiểu công việc được mô tả trong phiếu đánh giá, nhưng họ không cần phải được huấn luyện để đánh giá các tính chất cảm quan cụ thể nào. Thông thường người thử cũng được huấn luyện qua việc tiếp xúc với các mẫu được gọi là “A” và “không A” trước khi bắt đầu phép thử.

Phép thử A-không-A giống như phép thử cặp đôi, có bốn tổ hợp mẫu (AA, BB, AB, BA). Các tổ hợp này phải được trình bày ngẫu nhiên cho tất cả thành viên hội đồng, mỗi tổ hợp xuất hiện với một số lần như nhau. Phép thử này là một phía khi người làm thí nghiệm biết chính xác câu trả lời cho câu hỏi được đặt ra với người thử, có nghĩa là biết trước hai mẫu là giống nhau hay khác nhau. Giả thuyết không của phép thử này cũng giống như giả thuyết không của phép thử so sánh cặp đôi sai biệt. Giả thuyết đối ngẫu của phép thử này cho rằng nếu các mẫu được nhận biết là khác nhau, số lần tập hợp cho biết chính xác rằng các mẫu giống nhau hay khác nhau thường lớn hơn 1/2.

Kết quả của phép thử này chỉ cho biết thành viên có phân biệt được một cách có nghĩa giữa các mẫu hay không, khi các mẫu không xuất hiện một cách đồng thời. Cũng giống như phép thử cặp đôi sai biệt, tính chất cảm quan không được chỉ rõ. Nói cách khác người cảm quan chỉ biết rằng các mẫu được nhận biết khác nhau nhưng không biết các mẫu khác nhau khác nhau về tính chất nào.

Phép thử A-không-A thường được sử dụng khi người làm thí nghiệm không thể chuẩn bị hai mẫu giống nhau về màu sắc, hình dạng hay kích thước, ngay cả khi màu sắc, hình dạng hay kích thước của các mẫu không liên quan tới mục đích của nghiên cứu. Tuy nhiên rất khó nhận biết sự khác nhau về màu sắc, hình dạng hay kích thước và sự khác biệt là rõ ràng khi các mẫu được xuất hiện đồng thời. Nếu sự khác nhau có thể nhận biết được, người thử có khả năng nhớ và sẽ quyết định dựa trên sự sai khác này.

5.2. Nhóm phép thử phân tích mô tả

Trong phân tích cảm quan, phân tích mô tả là phương pháp tinh tế nhất. Kỹ thuật này cho phép nhà khoa học cảm quan mô tả sản phẩm một cách trọn vẹn, giúp nhận biết thành phần cơ bản và các thông số của quá trình chế biến, hoặc xác định các tính chất cảm quan liên quan tới thị hiếu người tiêu dùng. Có nhiều phương pháp phân tích mô tả. Mức độ khách quan cũng như mức độ định tính hoặc định lượng của các mô tả phụ thuộc vào kỹ thuật sử dụng chúng.

Nhóm này gồm phép thử mô tả mùi vị, phân tích mô tả định lượng và phép thử mô tả cấu trúc.

Nhóm phép thử mô tả đã chứng tỏ được vai trò là một công cụ đánh giá cảm quan cung cấp nhiều thông tin và toàn diện nhất. Có thể áp dụng phép thử này vào việc mô tả các đặc tính của một chuỗi đa dạng các biến đổi của sản phẩm và các vấn đề nghiên cứu trong phát triển sản phẩm thực phẩm. Những thông tin này có thể liên hệ với các thông tin về sự chấp nhận của người tiêu dùng và với các số đo bằng máy nhờ các kỹ thuật thống kê như hồi qui và tương quan.

- Đặc điểm nhóm phép thử mô tả

Phép thử gồm hai hay nhiều mẫu và người thử được mời xác định xem các mẫu này khác nhau ở những đặc tính nào và độ lớn của sự khác nhau này bằng bao nhiêu? Phép thử mô tả cũng được sử dụng để mô tả chi tiết các tính chất cảm quan của một số sản phẩm để nghiên cứu các tính chất đặc trưng của sản phẩm đó.

- Phương pháp tiến hành gồm 3 bước:

+ Lựa chọn các đặc tính cần đánh giá

+ Thực hiện các phép thử sơ bộ để các thành viên thống nhất cách sử dụng thang cường độ đã đưa ra

+ Đánh giá cường độ của các đặc tính đã chọn trên thang

Nếu các đặc tính cảm quan của sản phẩm chưa biết thì bắt đầu từ bước đầu tiên, còn nếu các đặc tính này đã biết thì bắt đầu từ bước 2. Người thử tham gia vào phép thử này phải được học và được huấn luyện “làm việc” trên các tính chất cảm quan cần đánh giá.

Trước hết cần lựa chọn các đặc tính cần đánh giá (ví dụ 12 tính chất: màu vàng, hình dạng sắc nét, độ giòn, mùi bơ, mùi cháy khét, vị ngọt, vị mặn, vị béo ngậy, tính dễ tan, nhão, sạn bụi, hậu vị). Sau đó xác định thang cường độ (thang 9 điểm). Người thử sẽ nhận được phiếu cho điểm và các mẫu sản phẩm cần đánh giá, nếm từng mẫu và xác định cường độ của từng chỉ tiêu yêu cầu trên thang 9 điểm. Hình 1.4 minh họa phiếu trả lời của phép thử mô tả.

- Xử lý kết quả:

Người điều hành thí nghiệm ghi lại điểm của từng thành viên hội đồng vào một bảng tổng hợp và tính giá trị trung bình cho từng mẫu đối với từng chỉ tiêu. Giá trị trung bình này được biểu diễn trên đồ thị dạng cột, đường gấp khúc hoặc hoa gió. Còn bảng tổng hợp để tính toán, so sánh sự khác nhau có nghĩa của hai mẫu theo chuẩn thể tích (đối với một chỉ tiêu) hoặc chuẩn F (với tất cả các chỉ tiêu). Các kết quả được biểu diễn dạng đồ thị hay hoa gió.

Trong kiểu hoa gió các tính chất tốt của sản phẩm được biểu diễn ở phần nằm trên trục ngang (mùi bơ, vị ngọt), còn tính chất xấu ở dưới (nhão, sạn bụi). Khi chỉ có một sản phẩm người ta thường biểu diễn kiểu hình bán khuyên, còn nhiều sản phẩm biểu diễn kiểu biểu đồ.

Nhìn vào kết quả biểu diễn trên hoa gió, có thể nhận ra hai đặc tính của sản phẩm:

+ Tính chất nào là tính chất nổi bật trong số các tính chất nghiên cứu, đó là những tính chất có giá trị cường độ cảm quan lớn.

+ Trong số các tính chất nghiên cứu (nhất là những tính chất đặc trưng), hai sản phẩm khác nhau ở tính chất nào

PHIẾU TRẢ LỜI
Phép thử mô tả

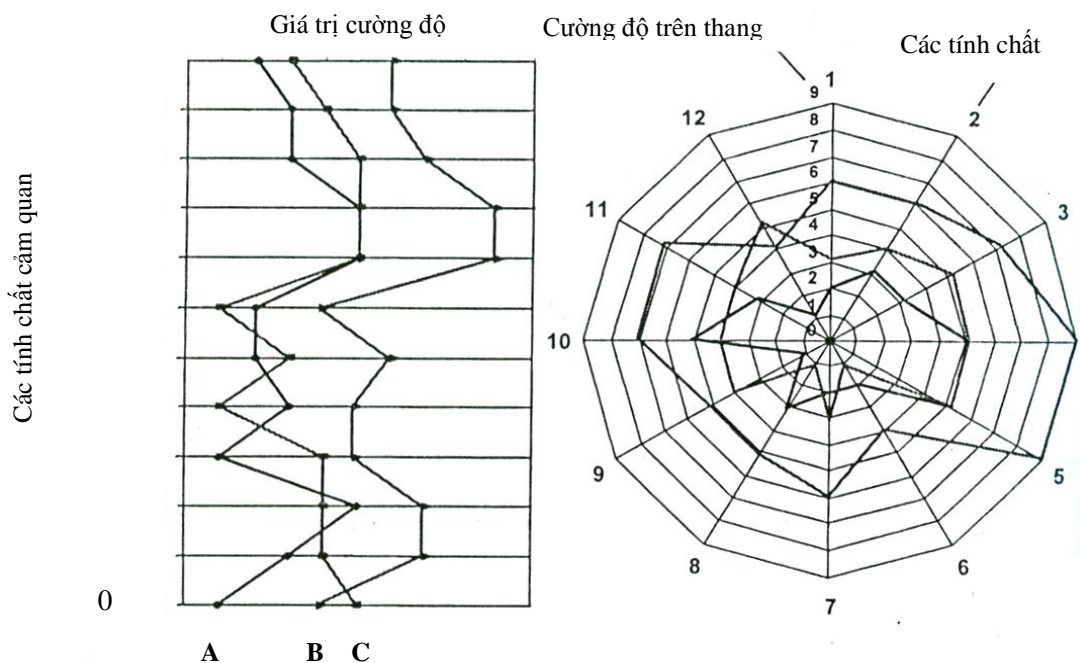
Họ và tên: _____ Ngày thử: _____

Bạn nhận được 3 loại bánh quy A, B, C. Hãy xác định cường độ của các tính chất cảm quan của mỗi loại bánh trên thang điểm.

	Cường độ thấp					Cường độ cao			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Màu vàng	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2. Hình dạng sắc nét	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3. Độ giòn	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4. Mùi cháy khét	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5. Mùi bơ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6. Vị ngọt	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
7. Vị béo ngậy	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8. Vị mặn	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
9. Dễ tan	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10. Nhão	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11. Sạn bụi	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12. Hậu vị	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Nhận xét

Hình 1.4. Minh họa phép thử mô tả



Hình 1.5. Đồ thị dạng gấp khúc và dạng hoa gió biểu diễn kết quả trong phép thử mô tả.

5.3. Nhóm phép thử thị hiếu

Trong nghiên cứu các sản phẩm thực phẩm và các sản phẩm tiêu dùng, có hai cách tiếp cận chính với phép thử thị hiếu: đo mức độ ưu tiên và mức độ chấp nhận.

Trong phương pháp đo mức độ ưu tiên, người tiêu dùng phải đưa ra một lựa chọn. Chỉ một sản phẩm được chọn ra từ hai hay nhiều sản phẩm. Các phép đo mức độ ưu tiên có thể được tiến hành trực tiếp hoặc gián tiếp

Phương pháp đo mức độ chấp nhận có thể được tiến hành trên các sản phẩm đơn giản và không đòi hỏi phải so sánh với một sản phẩm khác.

5.3.1. Các phép thử ưu tiên

5.3.1.1. Phép thử ưu tiên cặp đôi

Với phép thử này người thử nhận được hai mẫu đã được mã hóa. Hai mẫu này được giới thiệu cho người thử cùng lúc, người thử được yêu cầu xác định ra mẫu mà họ thích hơn. Thông thường để đơn giản hóa việc phân tích và giải thích số liệu, người thử phải có một lựa chọn (lựa chọn bắt buộc), mặc dù cũng có khả năng có một tùy chọn không có lựa chọn ưu tiên.

Phép thử ưu tiên cặp đôi có hai trật tự phục vụ mẫu có thể (AB, BA). Hai trật tự này nên được bố trí ngẫu nhiên cho tất cả người thử, với số người nhận mẫu A trước cân bằng với số người nhận mẫu B trước. Đối với phép thử ưu tiên cặp đôi, xác suất lựa chọn của một sản phẩm cụ thể là 1/2.

5.3.1.2. Phép thử ưu tiên không bắt buộc

Phép thử này được sử dụng trong trường hợp một người quyết định sử dụng tùy chọn “không có lựa chọn ưu tiên”. Lựa chọn không ưu tiên có thể cung cấp những thông tin đáng giá bên trong trạng thái tâm lý người tiêu dùng.

5.3.1.3. Phép thử so hàng mức độ ưu tiên

Trong phép thử này, người tiêu dùng được yêu cầu sắp xếp một vài sản phẩm theo một trật tự giảm dần hoặc tăng dần theo mức độ ưu tiên hoặc mức độ ưa thích. Những người tham gia thí nghiệm thường không được cho phép xếp hơn một mẫu vào một vị trí trong quá trình so hàng, do đó phép thử này là lựa chọn bắt buộc.

Phép thử ưu tiên cặp đôi chính là cấp thấp hơn của phép thử so hàng mức độ ưu tiên. Trong phép thử ưu tiên cặp đôi, người thử chỉ được yêu cầu so hàng hai mẫu. Phép thử so hàng xác định chiều hướng của sự ưu tiên đối với sản phẩm nhưng không cho biết được sự khác biệt tương ứng trong mức độ ưu tiên giữa các sản phẩm, kết quả không biểu lộ kích cỡ của sự ưu tiên giữa hai sản phẩm kế tiếp nhau.

Phép thử so hàng mức độ ưu tiên trong quan điểm người tiêu dùng là đơn giản, có thể hoàn thành nhanh chóng và không cần nhiều nỗ lực. Các cấp phân hạng được dựa trên một trình tự liên quan nằm ở trong một nhóm sản phẩm cụ thể, do vậy người tiêu dùng không cần dựa vào trí nhớ.

Bất lợi của phép thử so hàng mức độ ưu tiên là các số liệu từ các tập hợp những sản phẩm gộp chồng lên nhau khác nhau nên không thể so sánh được, vì sự phân hạng được dựa trên trình tự liên quan nằm bên trong sản phẩm. So hàng mức độ ưu tiên về ngoại hình và cấu trúc (đánh giá bằng mắt và bằng tay) thì khá đơn giản, nhưng các so sánh đa mùi vị bao gồm việc so hàng mùi và vị giữa các mẫu có thể khiến người thử rất mệt mỏi.

5.3.2. Phép thử chấp nhận

Là phép thử được thực hiện trên số đông người tiêu dùng (từ vài trăm cho đến hàng ngàn người) để tìm hiểu mức độ hài lòng, ưa thích của họ đối với sản phẩm nghiên cứu. Điều quan trọng khi tiến hành phép thử này là công việc qui hoạch đối tượng người thử hay còn gọi

là lựa chọn nhóm người tiêu dùng mục tiêu của sản phẩm. Các yếu tố nên quan tâm đó là: lứa tuổi, giới tính, thu nhập, thói quen tiêu dùng và thậm chí cả phân bố địa lý, văn hóa .v.v... Phép thử này thường được tổ chức tại các nơi bán và giới thiệu sản phẩm hay mẫu sản phẩm sẽ được gửi đến tận gia đình người thử.

Phép thử này yêu cầu người thử được mời thử nếm sản phẩm nhưng thay vào việc đánh giá cường độ của một tính chất cảm quan nào đó họ sẽ “đo” mức độ ưa thích, hài lòng của mình đối với sản phẩm bằng thang điểm đã được định nghĩa trước thông qua các thuật ngữ mô tả cấp độ hài lòng, ưa thích

5.4. Phép thử cho điểm chất lượng sản phẩm theo TCVN 3215- 79

Phép thử cho điểm chất lượng sản phẩm này được sử dụng để đánh giá tổng quát mức chất lượng của một sản phẩm so với tiêu chuẩn hoặc so với một sản phẩm cùng loại trên tất cả các chỉ tiêu cảm quan: màu sắc, mùi, vị, trạng thái. Chất lượng của mỗi chỉ tiêu được đánh giá bằng điểm, giá trị điểm tăng theo mức tăng của chất lượng.

Phép thử phân tích cảm quan sản phẩm thực hiện theo tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 3215-79. Đây là tiêu chuẩn sử dụng hệ điểm 20, xây dựng trên một thang điểm thống nhất 6 bậc và 5 điểm (từ 0 đến 5), trong đó điểm 0 ứng với chất lượng sản phẩm “bị hỏng”, còn từ điểm một đến điểm 5 ứng với mức khuyết tật giảm dần. Ở điểm 5 sản phẩm coi như không có sai lỗi và khuyết tật nào, trong tính chất đang xét, sản phẩm có tính tốt đặc trưng và rõ rệt cho chỉ tiêu đó (bảng 1.2).

Do các chỉ tiêu có vai trò đối với chất lượng chung của sản phẩm ở mức khác nhau nên các giá trị cho được đối với mỗi chỉ tiêu được nhân thêm một giá trị tương ứng gọi là hệ số trọng lượng. Các chỉ tiêu có vai trò lớn thì có hệ số trọng lượng cao hơn. Việc xác định hệ số trọng lượng cho mỗi chỉ tiêu của mỗi loại sản phẩm là rất khó. Các hệ số này thường được xác định theo kinh nghiệm, phương pháp điều tra kết hợp với phương pháp chuyên gia trên cơ sở thống kê. Hệ số quan trọng của các chỉ tiêu của một số sản phẩm thực phẩm được trình bày ở bảng 1.3.

Quy trình đánh giá phải được thực hiện trong phòng phân tích cảm quan đạt yêu cầu. Việc chuẩn bị mẫu phải phù hợp với từng loại sản phẩm theo quy định chặt chẽ. Hội đồng gồm từ 5 đến 12 chuyên gia có hiểu biết về sản phẩm được đánh giá. Hội đồng có chủ tịch và thư ký để lãnh đạo hội đồng trong quá trình làm việc. Khi đánh giá, các thành viên làm việc độc lập, cho điểm vào phiếu và nộp cho thư ký sau giờ làm việc.

Bảng 1.2. Bậc đánh giá trong phép thử cho điểm theo TCVN 3215-79

Bậc đánh giá	Điểm chưa có trọng lượng	Cơ sở đánh giá
1	5	Trong chỉ tiêu đang xét, sản phẩm có tính chất tốt đặc trưng và rõ rệt cho chỉ tiêu đó, sản phẩm không có sai lỗi và khuyết tật nào.
2	4	Sản phẩm có khuyết tật nhỏ hoặc sai lỗi nhỏ hoặc có cả hai, nhưng không làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm đó.
3	3	Sản phẩm có khuyết tật hoặc sai lỗi hoặc có cả hai, số lượng và mức độ của khuyết tật sai lỗi làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm, nhưng sản phẩm vẫn đạt tiêu chuẩn.
4	2	Sản phẩm có khuyết tật hoặc sai lỗi hoặc có cả hai, số lượng và mức độ của khuyết tật sai lỗi làm cho sản phẩm không đạt mức chất lượng quy định trong tiêu chuẩn, nhưng sản phẩm vẫn còn khả năng bán được.
5	1	Sản phẩm có khuyết thể tích hoặc sai lỗi ở mức độ trầm trọng, không đạt mục đích sử dụng chính của sản phẩm đó. Song sản phẩm vẫn chưa bị coi là "hỏng". Sản phẩm đó không thể bán được, nhưng sau khi tái chế thích hợp vẫn có thể sử dụng được.
6	0	Sản phẩm có khuyết tật và sai lỗi ở mức độ rất trầm trọng, sản phẩm bị coi là "hỏng", không sử dụng được nữa.

Đối với mỗi sản phẩm cụ thể sẽ có một bảng 5 điểm 6 bậc tương ứng.

Bảng 1.3. Bảng hệ số trọng lượng của một số sản phẩm thực phẩm TCVN 3215-79

Rượu	Bia	Nước giải khát có CO ₂	Nước quả	Quả nước đường
Vị : 2,0 Mùi : 1,2 Độ trong, màu sắc : 0,8	Vị : 2,0 Bọt : 0,8 Mùi : 0,8 Độ trong, màu : 0,4	Mùi : 1,2 Vị : 1,8 Độ trong : 0,6 Màu : 0,4	Mùi, vị : 2,0 Màu : 1,2 Hình thái : 0,8	Mùi, vị : 1,6 Hình thái : 1,2 Màu sắc cái : 0,8 Nước : 0,4
Bánh ngọt	Kẹo	Chè	Sản phẩm đông lạnh	Thuốc lá đầu lọc
Màu : 0,6 Mùi : 0,5 Vị : 1,5 Hình thái trong : 1,0 Hình thái ngoài : 0,4	Mùi, vị : 2,2 Hình thái : 0,8 Trạng thái trong : 1,0	Màu nước : 0,4 Mùi : 1,2 Vị : 1,2 Ngoại hình: 0,8 Bã : 0,4	Màu : 0,8 Mùi, vị : 1,2 Băng : 0,5 Tạp chất : 0,5 Trạng thái vật lý : 1,0	Màu sợi : 0,8 Mùi : 1,0 Vị : 1,2 Nặng sọc : 0,6 Cháy : 0,4

Để phân cấp chất lượng, TCVN 3215-79 quy định các cấp chất lượng đối với các sản phẩm thực phẩm có điểm chung và điểm trung bình chưa có trọng lượng đối với một số chỉ tiêu tương ứng bảng 1.4. Sản phẩm đạt chất lượng khi điểm trung bình chưa có trọng lượng của mỗi chỉ tiêu cảm quan bất kỳ phải đạt ít nhất là 2,8 điểm và điểm số chung ít nhất phải là 11,2 đối với một sản phẩm. Nếu một chỉ tiêu nào đó có điểm 0 thì nên tiến hành đánh giá lại chỉ tiêu đó. Khi hội đồng đã thống nhất cho một chỉ tiêu nào đó điểm 0 thì điểm chung bằng 0 và sản phẩm coi như hỏng. Nếu thành viên nào cho điểm lệch quá 1,5 điểm so với điểm trung bình chưa có trọng lượng của hội đồng thì điểm của thành viên đó bị loại.

Bảng 1.4. Bảng phân cấp chất lượng sản phẩm theo TCVN 3215-79

Cấp chất lượng	Điểm chung	Yêu cầu về điểm trung bình chưa có trọng lượng
Loại tốt	18,6 ÷ 20,0	Các chỉ tiêu quan trọng nhất $\geq 4,7$
Loại khá	15,2 ÷ 18,6	Các chỉ tiêu quan trọng nhất $\geq 3,8$
Loại trung bình	11,2 ÷ 15,1	Mỗi chỉ tiêu $\geq 2,8$
Loại kém	7,2 ÷ 11,1	Mỗi chỉ tiêu $\geq 1,8$
Loại rất kém	4 ÷ 7,1	Mỗi chỉ tiêu $\geq 1,0$
Loại hỏng	0 ÷ 3,9	

6. Các yêu cầu cần thiết trong đánh giá cảm quan

6.1. Phòng thí nghiệm đánh giá cảm quan

Một phòng thí nghiệm cảm quan theo tiêu chuẩn cần có bốn phòng chức năng như sau:

- Văn phòng
- Phòng chuẩn bị mẫu:

+ Phòng chuẩn bị mẫu đặt liền ngay phòng cảm quan, có cửa thông với phòng cảm quan và có kính để quan sát hoạt động trong phòng cảm quan. Phòng được thiết lập theo nguyên tắc phòng thí nghiệm hóa và có hệ thống thông gió để thổi mùi ra ngoài. Vách, tường, mặt bàn .v.v... lát gạch men hoặc bọc nhựa trắng.



Hình 1.6. Phòng chuẩn bị mẫu

+ Trang thiết bị: Tùy theo sản phẩm được đánh giá, các thiết bị, dụng cụ cần trang bị nhằm phục vụ việc xử lý, chuẩn bị mẫu trước khi đánh giá (bảng 1.5)

Bảng 1.5. Các dụng cụ xử lý và chuẩn bị mẫu

- Cân phân tích	- Ly, cốc, chai, lọ
- Cân đồng hồ 1kg	- Ly uống nước, súc miệng, ống nhỏ
- Tủ sấy	- Khay tráng men trắng
- Bếp điện	- Dao, thớt, muống, nĩa bằng inox
- Lò nướng	- Kẹp, cái khui
- Xoong chảo	- Kệ để ráo các dụng cụ
- Máy xay	- Giá máng dụng cụ, ly, cốc
- Dụng cụ khuấy trộn	- Tủ chứa dụng cụ áo khăn
- Tủ lạnh để bảo quản mẫu	- Tủ chứa hóa chất
- Cối sứ	- Tủ chứa mẫu
- Dụng cụ thủy tinh để pha chế	- Tủ chứa thiết bị, dụng cụ đánh giá

+ Bàn để chuẩn bị mẫu phải sạch, dễ lau rửa và rộng đủ để bày số lượng mẫu và các dụng cụ cảm quan cho một buổi (thông thường là 10 mẫu, hội đồng 5÷12 người).

- Phòng họp

- Phòng phân tích và đánh giá cảm quan: Phòng đánh giá cảm quan phải thoáng, sạch, không có mùi lạ, không bị ồn. Nên bố trí phòng này biệt lập với các phòng khác để kiểm soát được người ra vào phòng đánh giá.

Diện tích phòng khoảng 25m², có thể thông khí dễ dàng (cửa kín, quạt .v.v...), nhiệt độ phòng 20÷25°C; độ ẩm 75÷90%. Việc thiết kế phòng, vật liệu xây cất và vật dụng trong phòng đảm bảo không tạo mùi và không bị nhiễm mùi từ nơi khác bay vào. Toàn bộ tường, trần, cửa và sàn nên màu trắng không bóng. Nên sử dụng các màu sắc không rõ ràng hoặc không làm mất tập trung. Sử dụng tối đa ánh sáng thiên nhiên nhưng không để mặt trời chiếu thẳng vào phòng. Bố trí đèn để đảm bảo cường độ ánh sáng tại bàn làm việc. Phòng cảm quan cần phải được giữ yên lặng để tạo điều kiện cho sự tập trung của các thành viên.

Số lượng ghế trong các khu vực thử thường từ 3÷25 và phụ thuộc vào diện tích cho phép.

6.2. Dụng cụ cảm quan

Nhằm đạt mục đích chung là các mẫu khi cung cấp cho cảm quan viên phải đồng nhất và không gây ấn tượng gì về cơ sở sản xuất hoặc một thành kiến nào khác, các mẫu phải được chuẩn bị cẩn thận và chứa trong các dụng cụ đúng qui định và giống nhau. Tất cả các dụng cụ và đồ dùng phục vụ trong buổi đánh giá phải rửa, giặt sạch trước và sau khi đánh giá. Không được dùng xà phòng thơm để giặt, rửa, không được lau mà phải sấy khô hoặc để khô dụng cụ trên các giá bằng nhựa hay tốt nhất bằng thủy tinh, sành sứ, thép không gỉ.

Trước lúc sử dụng phải kiểm tra lại cẩn thận, đảm bảo các dụng cụ và đồ dùng không có mùi vị gì khác lạ. Dụng cụ phải bằng thủy tinh không màu hay màu trắng. Có thể bằng vật liệu khác không màu hay màu trắng nhưng phải dễ làm sạch, không giữ mùi vị và không ảnh hưởng đến màu sắc, trạng thái mùi vị của sản phẩm.

Dụng cụ cung cấp cho những cảm quan viên trong hội đồng phải giống nhau về hình dạng, kích thước và vật liệu.

Một số dụng cụ trong phòng đánh giá cảm quan:

- Muỗng, nĩa, kẹp trắng thép không gỉ
- Cốc để cảm quan chất lỏng làm bằng thủy tinh tốt không màu, có nắp đậy
- Chai thủy tinh tốt không màu, có nút nhám để đánh giá màu sắc độ trong
- Cốc đánh giá bia, rượu, trà, bình pha trà
- Đĩa cá nhân bằng sứ, sắt tráng men hay thủy tinh trắng.



Hình 1.7. Ly thủy tinh dùng đánh giá cảm quan

6.3. Hội đồng đánh giá cảm quan

Hội đồng cảm quan phải có ít nhất là 5 người và nhiều nhất là 12. Ưu tiên chọn cảm quan viên với số lượng lẻ. Hội đồng phải có chủ tịch và thư ký để lãnh đạo trong quá trình làm việc. Trong trường hợp ít người, cán bộ của phòng cảm quan có thể là thư ký hội đồng, người này có hoặc không tham gia đánh giá.

6.4. Nhân viên phòng đánh giá cảm quan

Người phụ trách phòng đánh giá cảm quan là những người chịu trách nhiệm về chất lượng cảm quan của sản phẩm trước khi đưa ra thị trường. Họ phải là người hiểu biết về sản phẩm. Nếu làm việc trong các xí nghiệp phải có kinh nghiệm trong sản xuất, nắm vững công nghệ, có trình độ đào tạo về kỹ thuật phân tích cảm quan, có kiến thức về tâm lý học, sinh lý người, toán thống kê, công nghệ thực phẩm, công nghệ thông tin và thậm chí là kỹ thuật nấu ăn.

Nhân viên phục vụ phòng đánh giá cảm quan đều cần có kiến thức tốt về phòng thí nghiệm phân tích. Việc chuẩn bị mẫu đòi hỏi một kỹ năng cao vì các cơ quan cảm giác của con người rất nhạy cảm.

Cuối cùng cả người phụ trách điều hành thí nghiệm lẫn nhân viên phục vụ phải nắm được những nguyên lý tập luyện nâng cao khả năng đánh giá cho nhóm hay hội đồng khi cần thiết. Họ phải tuyệt đối tôn trọng những quy định trong phân tích và phải rất trung thực với kết quả phân tích được.

6.5. Người đánh giá cảm quan

Người đánh giá cảm quan còn gọi là cảm quan viên là những người không có bệnh tật về các giác quan, đều có thể tham gia đánh giá cảm quan thực phẩm. Giới tính, lứa tuổi và

tính nghiệm hút đều có ảnh hưởng phần nào đến kết quả cảm quan. Những người có ngưỡng cảm thấp sẽ cho các kết quả tin cậy hơn.

Trước khi tham gia với tư cách là thành viên của hội đồng đánh giá cảm quan, cảm quan viên phải thực hiện những điều đã được cơ quan tổ chức hội đồng qui định. Cảm quan viên phải có khả năng đánh giá khách quan, có khả năng phân biệt cảm giác, có kiến thức chuyên môn tốt và sử dụng từ ngữ mô tả, khả năng lặp lại. Tất cả các cảm quan viên phải được kiểm tra trình độ định kỳ, 6 tháng hoặc 1 năm 1 lần.

Trước khi đánh giá 30 phút:

- Không được ăn uống và hút thuốc, không dùng son phấn, nước hoa, xà phòng thơm.
- Nếu bị mệt, cảm cúm, nhức đầu thì không tham gia buổi thử hôm đó

Trong thời gian đánh giá cảm quan:

- Không nói chuyện gây ồn trong phòng
- Sử dụng triệt để thời gian làm việc, không ra khỏi phòng sớm
- Không tự tiện vào phòng chuẩn bị mẫu

6.6. Mẫu và chuẩn bị mẫu

6.6.1. Yêu cầu đối với mẫu

- Số mẫu và lượng mẫu

Số mẫu cần lấy phụ thuộc vào đặc tính của sản phẩm, tuy vậy số mẫu cũng phải lấy đủ để cho hội đồng có thể đánh giá và có được cái nhìn toàn diện về chất lượng của sản phẩm.

Số mẫu được qui định cho một lần thử thay đổi tùy theo từng loại sản phẩm, số chỉ tiêu đánh giá, mục đích đánh giá, phương pháp đánh giá và thời gian đánh giá.

Đối với một chuyên gia chuyên nghiệp, có thể đánh giá 100 mẫu trà, cà phê trong một ngày. Đối với hội đồng cảm quan, do phải được phục vụ giống nhau và phải báo điểm số mẫu tối đa là 10 mẫu /1 lần đánh giá. Đối với các sản phẩm độc hại, nhiệt độ lạnh, các chỉ tiêu đánh giá cần thời gian lau và cảm quan viên dễ bị mệt mỏi như rượu, thuốc lá, kem .v.v... số mẫu tối đa là 5 mẫu /1 lần. Ngoài ra để tránh mệt mỏi cho cảm quan viên, trong một lần đánh giá không được đánh giá quá 3 loại sản phẩm. Nếu không có qui định gì khác, số mẫu được đánh giá trong một buổi không nên quá 10 mẫu.

Số lượng sản phẩm hoặc số đơn vị bao gói sản phẩm cần thiết cho một mẫu cảm quan được qui định cụ thể cho từng sản phẩm. Trong trường hợp không thể lấy toàn bộ một đơn vị sản phẩm thì lấy mẫu với khối lượng từ 30÷50 g đối với sản phẩm rắn và 25ml đối với sản phẩm dạng lỏng. Nguyên tắc chung là lượng mẫu đủ cho các cảm quan viên đánh giá tất cả các chỉ tiêu theo qui trình cảm quan cho mỗi loại sản phẩm.

- Bao gói

Nếu mẫu không có sẵn bao bì riêng, việc bao gói mẫu phải theo các qui định của từng sản phẩm nhằm bảo vệ chất lượng của mẫu trong quá trình vận chuyển, bảo quản. Thông thường mẫu chứa trong chai lọ thủy tinh có nút kín, hộp kim loại, thủy tinh có nắp kín hoặc bao PE nguyên chất. Ngoài ra bao bì phải có nhãn, ghi rõ họ tên, loại sản phẩm và các chi tiết cần thiết khác.

- Vận chuyển, bảo quản

Trong trường hợp mẫu cần phải đóng gói thì chất lượng bao gói phải thích hợp cho việc bảo quản và vận chuyển mẫu. Các điều kiện về vận chuyển và bảo quản mẫu phải theo

các qui định của từng sản phẩm nhằm bảo đảm tình trạng chất lượng của mẫu không được biến đổi cho đến khi đánh giá cảm quan. Thông thường cho đến lúc xử lý mẫu để đánh giá, mẫu được bảo quản ở nơi khô ráo, thoáng mát, nhiệt độ thường, không có mặt trời chiếu thẳng. Đối với sản phẩm dễ hỏng ở nhiệt độ cao, nhất là các sản phẩm đông lạnh, phải chú ý đến yêu cầu về nhiệt độ của dụng cụ chứa mẫu và bảo quản mẫu cho đến khi đánh giá.

5.6.2. Chuẩn bị mẫu

Việc chuẩn bị mẫu để đánh giá cảm quan phải theo qui định đối với từng sản phẩm. Các mẫu kiểm tra phải đại diện cho tập hợp mẫu. Các mẫu phải được trình bày dưới dạng vô danh. Phải loại bỏ tất các thông tin, tên thương mại, nhãn hiệu, nguồn gốc, ký hiệu trên bao bì hoặc sản phẩm .v.v...

Cảm quan viên không biết gì về lô hàng, đợt sản xuất, nơi sản xuất hay sự thay đổi gì về qui trình công nghệ hoặc biết càng ít càng tốt. Mục đích để cảm quan viên đánh giá cảm quan một cách khách quan đối với mẫu.

- Vệ sinh bao bì

Trước khi chuẩn bị mẫu, phải lau rửa sạch bao bì, tránh rơi vãi, tránh bụi hoặc tạp chất rơi vào sản phẩm trong quá trình chuẩn bị.

- Nhiệt độ giới thiệu mẫu

Nhiệt độ của các mẫu phải đồng nhất và không thay đổi trong quá trình đánh giá. Nhiệt độ quá cao hay quá thấp làm ảnh hưởng đến tính nhạy cảm của những cảm quan viên. Nhiệt độ mẫu thử được qui định cho từng sản phẩm. Phải để mẫu thử ở nhiệt độ đánh giá trước khi tiến hành đánh giá.

Nhiệt độ yêu cầu cho phép thử và thời gian chờ có thể sẽ gây khó khăn đối với một số sản phẩm như thịt. Một trong các biện pháp thực hiện là giữ các sản phẩm này trong thùng chứa giữ nhiệt. Đối với các sản phẩm sữa, đặc biệt là sữa uống, các tính chất cảm quan có thể bị thay đổi khi sản phẩm được làm nóng lên nhiệt độ cao hơn nhiệt độ bảo quản. Trong một số ít các phép thử yêu cầu về độ nhạy và khả năng phân biệt, nhiệt độ thử của mẫu sẽ cho phép xác định sự khác biệt tốt hơn. Khi sữa uống được thử ở 15°C, khả năng nhận biết về hương vị sẽ tốt hơn ở nhiệt độ bình thường. Còn đối với các sản phẩm kem nên lưu giữ ở nhiệt độ -15°C÷-13°C trong ít nhất 12 giờ trước khi thử với lý do kem rất khó lấy nếu ở nhiệt độ lạnh hơn, còn nếu nhiệt độ cao hơn kem sẽ chảy.

Trong trường hợp các sản phẩm được thử ở nhiệt độ bình thường, chuyên gia cảm quan phải đo và ghi chép lại nhiệt độ của mỗi buổi thử. Đối với những sản phẩm được thử ở nhiệt độ khác so với nhiệt độ bình thường, nhiệt độ này cần phải được xác định rõ, cũng như phương pháp duy trì nhiệt độ, ví dụ bằng bể cát điều nhiệt, phích, bể nước điều nhiệt, bàn ấm, tủ lạnh, tủ đông .v.v.... Ngoài ra thời gian lưu giữ mẫu tại các thiết bị đặc biệt này cũng phải được nêu rõ.

- Chất độn/chất mang

Việc có sử dụng chất độn/chất mang hay không thường gây ra cho các chuyên gia cảm quan nhiều vấn đề phức tạp và cần phải được cân nhắc kỹ lưỡng. Chất độn/chất mang là nguyên liệu dùng để làm nền cho sản phẩm thử, nhưng cũng có thể quan niệm rộng hơn như là một loại thực phẩm được thử cùng với mẫu vì thế chúng được ăn (và nếm) đồng thời. Ví dụ như nhân kem trong bánh ngọt, bơ phết trên bánh mì, hoặc gia vị trong nước sốt.

Khi sử dụng chất độn/chất mang cần xem xét việc mất thông tin và mức độ cần thiết làm mẫu giống với thực tế. Trong một vài trường hợp, khi thời gian và nguyên liệu cho phép có thể thực hiện phép thử trên mẫu có và không có chất độn, cách này sẽ cho chúng ta biết mức độ khác nhau cũng như bản chất tương tác giữa mẫu cần thử và chất độn/chất mang.

- Trộn mẫu

Tùy từng loại sản phẩm, chỉ tiêu đánh giá và qui định trong tiêu chuẩn, việc chuẩn bị mẫu khác nhau:

Đối với các chỉ tiêu cần đánh giá trên một mẫu chung. Ví dụ: màu sắc, độ đồng đều về hình thái .v.v... Mở các đơn vị bao gói, đầu chung sản phẩm lại với nhau, trộn nhẹ, đặt lên khay, hoặc cốc thủy tinh, chuyển cho từng cảm quan viên, có thể tách riêng phần cái và phần nước để đánh giá riêng nếu có yêu cầu.

Đối với các chỉ tiêu cần đánh giá riêng (mùi, vị) hoặc đối với các sản phẩm không thể đầu trộn (các sản phẩm có CO₂ .v.v...) thì phải trao riêng cho từng cảm quan viên đánh giá.

Cấp cho mỗi cảm quan viên một đơn vị sản phẩm để tự mở và đánh giá. Trong trường hợp này, sản phẩm cũng phải được bóc bao bì ngoài hoặc xóa những ghi chú có thể làm cho người đánh giá biết những thông tin về sản phẩm.

Khi cần thiết, chia mẫu đánh giá thành nhiều phần nhỏ. Chú ý lượng mẫu chia cho mỗi cảm quan viên phải bằng nhau và giống nhau. Những mẫu lớn phải được cắt nhỏ ra, trộn đều trước khi chia.

- Mã hóa mẫu

Mẫu cần được dán nhãn và mã hóa một cách ngẫu nhiên bằng các con số có ba chữ số để tránh các yếu tố chủ quan và loại bỏ các thành kiến đối với sản phẩm (phụ lục 1).

- Phân nhóm và xếp thứ tự mẫu

Thông thường cảm quan viên được đưa đánh giá các mẫu theo sự phân nhóm và thứ tự trong một nhóm như sau:

+ Sản phẩm tốt trước, xấu sau.

+ Có mùi ít trước, mùi nhiều sau.

+ Lưu vị ít trước, lưu vị nhiều sau.

+ Độ ngọt, độ mặn, độ béo, độ rượu .v.v...tăng từ thấp đến cao.

Tuy nhiên, thói quen này có thể làm cho cảm quan viên có định kiến, do đó có thể thay đổi trình tự đánh giá. Ngoài ra tâm lý chung là nếu mẫu trước có điểm cao, các mẫu xấu thử sau thường bị cho điểm kém hơn bản chất của nó. Ngày nay người ta phục vụ mẫu cho cảm quan viên theo ngẫu nhiên trong cùng một nhóm sản phẩm. Trừ khi hai sản phẩm có nồng độ rất khác nhau thử mẫu có nồng độ yếu trước.

- Mẫu chuẩn để so sánh

Việc đánh giá cảm quan so sánh cho phép thực hiện bằng cách so sánh mẫu thử với mẫu chuẩn. Trong trường hợp cảm quan viên chưa thuộc mẫu chuẩn, mỗi lần cảm quan có thể đánh giá mẫu thử và mẫu chuẩn cùng một lúc.

Mẫu chuẩn là mẫu làm chuẩn để so sánh. Có thể là một ảnh chụp, sản phẩm tươi, sản phẩm cấp đông .v.v... các loại chuẩn này đều có nhược điểm là không thỏa mãn hết các yêu cầu về “chuẩn”. Mẫu chuẩn là mẫu có thể được chế tạo để đạt yêu cầu lý tưởng trong tiêu

chuẩn kỹ thuật, hoặc là một mẫu bình thường đã được hội đồng đánh giá các chỉ tiêu và điểm được xem là chuẩn.

Thông thường, đối với hội đồng đánh giá đã quen thuộc với sản phẩm và qui trình sản xuất, mẫu chuẩn thường được nhớ và ghi nhận trong trí nhớ và sự mô tả bằng văn bản tiêu chuẩn.

- Trình bày mẫu

Các mẫu trình bày cho những cảm quan càng đồng đều và giống nhau càng tốt. Lượng mẫu cho mỗi người phải bằng nhau và thông thường chiếm đến 1/3 hoặc 1/2 thể tích vật chứa. Nếu không quan tâm đến chỉ tiêu màu trên những mẫu có màu khác nhau, có thể dùng đèn màu khi thử. Thông thường mỗi cảm quan viên được nhận một khay có đựng mẫu thử, các dụng cụ, nước lọc, thức ăn thanh vị .v.v...

6.7. Thanh vị

Mục đích của thanh vị nhằm loại bỏ các phần còn lại của mẫu từ phép thử trước, làm cho vị giác trở lại trạng thái sạch. Thông thường trước khi đánh giá, cảm quan viên không được ăn các thức ăn có nhiều gia vị, có khả năng lưu vị hoặc gây vị như hành, tỏi. Cảm quan viên phải súc miệng sạch sẽ trước khi đánh giá. Sau mỗi mẫu phải sử dụng các thứ có khả năng trung hòa vị giác, làm mất hết cảm giác do mẫu còn lưu lại. Tùy theo sản phẩm đánh giá, các chất thanh vị sau đây có thể được dùng:

- Nước trắng không mùi, vị, thường là nước lọc.

- Bịch qui loại không đường, không bơ, ruột bánh mì lát, cơm trắng dùng để lòi cuốn các dư vị khi nhai sau mỗi lần đánh giá.

- Ngoài ra tùy theo yêu cầu cụ thể người ta có thể dùng các thứ sau để thanh vị đối với các dư vị đặc biệt: Sữa, phô mai, nước chanh loãng, bia, kem, nước suối, sô đa, táo hoặc táo pure không ngọt.

6.8. Bồi dưỡng độc hại

Ngoài sự mệt mỏi do phải tập trung tư tưởng và các giác quan để đánh giá, các cảm quan viên có thể bị giảm sút sức khỏe do thử một số sản phẩm có tính độc hại như rượu, thuốc lá. Do đó nên dùng các thức ăn, uống nhằm bồi dưỡng sức khỏe cho cảm quan viên sau khi làm việc, và nếu có thể thì tìm biện pháp trung hòa một phần những chất có hại đến sức khỏe.

Các đồ uống sau đây thường được sử dụng: Cà phê sữa, sữa dùng sau khi đánh giá thuốc lá. Cà phê đen, rượu vang, rượu nho, bia dùng sau khi cảm quan sản phẩm hải sản, đồ hộp, thịt, cá.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu 1. Hãy cho biết tên phép thử sẽ sử dụng trong các trường hợp được yêu cầu sau đây:

- a. Mô tả các tính chất đặc trưng của sản phẩm thực phẩm mà công ty đang sản xuất?
- b. Đánh giá mức chất lượng của sản phẩm thực phẩm mà công ty đang sản xuất?
- c. Xác định xem sản phẩm sữa mới của công ty có khác với sản phẩm sữa của 2 công ty khác đang được tiêu thụ rộng rãi trên thị trường?
- d. Xác định xem sản phẩm của công ty có được ưa thích hơn sản phẩm của đối thủ cạnh tranh không?

e. Xác định xem mùi của rượu vang được sản xuất bằng phương pháp truyền thống có giống với mùi của rượu vang sản xuất theo phương pháp mới mà công ty đang thử nghiệm không?

Câu 2. So sánh phép thử A không A và phép thử 2 - 3 ?

Câu 3. So sánh phép thử tam giác và phép thử 2 - 3 ?

C. Ghi nhớ

1. Khái niệm phân tích, đánh giá cảm quan
2. Khái niệm ngưỡng cảm giác và các loại ngưỡng cảm giác
3. Hệ thống giác quan và cảm giác nhận được
4. Đặc điểm, ứng dụng của các phép thử thuộc nhóm phép thử phân biệt, nhóm phép thử ưu tiên, nhóm phép thử thị hiếu.
5. Các yêu cầu cần thiết trong đánh giá cảm quan

CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU LÝ HÓA

Mục tiêu:

- Trình bày được nguyên tắc của các phương pháp xác định các chỉ tiêu lý hóa cơ bản của LTTP;
- Mô tả được qui trình phân tích, cách tính kết quả của các chỉ tiêu lý hóa của các loại LTTP;
- Lựa chọn được phương pháp phân tích phù hợp cho từng chỉ tiêu chất lượng;

A. Nội dung

1. Xác định độ ẩm

Xác định độ ẩm là một phân tích quan trọng và cơ bản đối với mọi sản phẩm thực phẩm.

Biết được độ ẩm là một điều quan trọng trong công tác phân tích, xác định giá trị dinh dưỡng và chất lượng thực phẩm cũng như trong sản xuất, bảo quản nông sản, thực phẩm.

Về phương diện dinh dưỡng, nếu độ ẩm càng cao, các chất dinh dưỡng khác càng thấp. Ví dụ: cùng 100g gạo, nếu độ ẩm là 14% thì có 7,6g protit, 1g lipit và 76,2g glucit; nếu độ ẩm là 20% thì có 7,0g protit, 0,9g lipit và 70,8g glucit.

Về phương diện xác định chất lượng thực phẩm và khả năng bảo quản, nếu độ ẩm vượt quá mức tối đa, thực phẩm sẽ mau hỏng. Ví dụ: độ ẩm tối đa của bột là 14%, nếu quá 14% bột sẽ chóng chua.

Về phương diện công nghệ: Biết được độ ẩm để có quyết định và biện pháp hợp lý về thu hoạch, phơi sấy, bảo quản và chế biến công nghiệp. Hàm lượng nước là chỉ số cần thiết để làm chủ được các nguy cơ gây hư hỏng trong thời gian cất giữ thực phẩm.

Hàm lượng nước trong thực phẩm cần được xác định để đảm bảo sự tuân thủ các qui định về tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm Đây là đại lượng có giá trị kinh tế lớn đối với các nhà sản xuất vì nước vốn là hợp chất rẻ tiền có thể bổ sung được vào thực phẩm đến mức tối đa cho phép. Ví dụ: Tiêu chuẩn sản phẩm phomai phải có độ ẩm $\leq 3\%$

Độ ẩm của một sản phẩm thực phẩm là hàm lượng nước có trong 100g sản phẩm.

Chất khô (nồng độ chất khô) là tất cả những gì còn lại sau khi tách ẩm từ mẫu nghiên cứu.

Có nhiều phương pháp khác nhau để xác định độ ẩm. Sau đây giới thiệu một số phương pháp thường dùng

1.1. Phương pháp sấy khô đến trọng lượng không đổi

1.1.1. Nguyên tắc:

Dùng sức nóng làm bay hơi nước trong sản phẩm. Cân sản phẩm trước và sau khi sấy, từ đó tính được độ ẩm của sản phẩm.

Đây là phương pháp đơn giản nhất và nhanh nhất để xác định độ ẩm.

Tuy nhiên phương pháp này có thể cho những kết quả sai số vì các chất dễ bay hơi như: cồn, tinh dầu, acid bay hơi cùng bay hơi với nước khi sấy hoặc có sự phân giải thành fufurol, amoniac khi sấy các thực phẩm có chứa nhiều đường đậm. Đối với các thực phẩm có

nhiều chất béo còn có thể xảy ra quá trình oxy hóa. Các sản phẩm chứa nhiều đường khi sấy sẽ bị caramen hóa.

1.1.2. Dụng cụ, thiết bị

- Tủ sấy điều chỉnh được nhiệt độ 105 – 110°C
- Cân phân tích
- Bình hút ẩm
- Chén sấy
- Bếp cách thủy, bếp điện



Hình 2.1. Cân phân tích



Hình 2.2. Bếp cách thủy



Hình 2.3. Tủ sấy.



Hình 2.4. Bình hút ẩm

1.1.3. Tiến hành

- Chén sấy được sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 105°C. Để nguội trong bình hút ẩm rồi đem cân để biết khối lượng G.
- Cân m (g) mẫu trong chén sấy (G₁).
- Cho chén sấy đựng mẫu thử vào tủ sấy ở nhiệt độ 105°C. Thời gian sấy là 2-3 giờ.
- Lấy chén ra để nguội trong bình hút ẩm rồi cân.
- Lại sấy tiếp trong 30 phút, lấy ra để nguội và cân. Làm như vậy cho đến khi đạt tới khối lượng không đổi. Ghi kết quả của lần cân cuối (G₂).

Lưu ý:

- Đối với một số sản phẩm khó sấy khô, để rút ngắn thời gian sấy cần nghiền nhỏ hay thái mỏng, có thể sử dụng nhiệt độ sấy cao đến 130°C hoặc trộn lẫn với cát khô, sạch (đã được xử lý bằng HCl) trong khi sấy.

- Đối với những sản phẩm có nhiều nước thì phải làm bốc hơi trên nồi cách thủy đến kiệt nước sau đó mới cho vào tủ sấy.

1.1.4. Tính kết quả

Độ ẩm (W) của sản phẩm thử tính bằng phần trăm theo công thức :

$$W = \frac{G_1 - G_2}{G_1 - G} \cdot 100(\%)$$

Trong đó :

G : Khối lượng chén sấy không, g

G₁ : Khối lượng chén sấy có mẫu thử trước khi sấy, g

G₂ : Khối lượng chén sấy có mẫu thử sau khi sấy, g

1.2. Phương pháp chưng cất với dung môi

1.2.1. Nguyên tắc:

Dùng một dung môi hữu cơ có 3 đặc tính sau:

- Có nhiệt độ sôi tương đương với nước
- Không tan trong nước
- Nhẹ hơn nước

Khi đun sôi dung môi đã trộn lẫn với sản phẩm thực phẩm, dung môi bốc hơi kéo theo nước có trong sản phẩm thực phẩm. Hơi dung môi và hơi nước gặp lạnh sẽ ngưng tụ thành lỏng và đọng lại ở ống đo có chia vạch, đọc thể tích nước trong ống đo, từ đó tính được độ ẩm của sản phẩm.

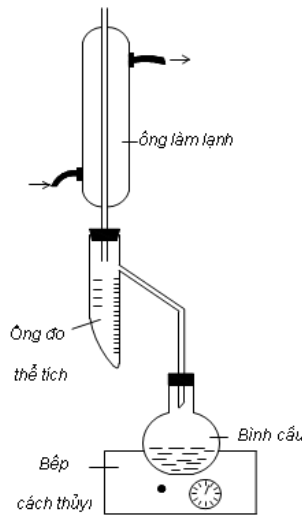
Các dung môi thường dùng:

Toluen (t_s = 111°C), Benzen (80°C), Xylen (140°C), CCl₄ (77°C).

Phương pháp chưng cất với dung môi khắc phục được các nhược điểm của phương pháp sấy khô nhưng nhược điểm chủ yếu của phương pháp là không tách được hoàn toàn nước có trong sản phẩm.

1.2.2. Dụng cụ, hóa chất

- Cân phân tích
- Bộ chưng cất với dung môi gồm:
 - + Bếp điện (bếp cách thủy)
 - + Bình cầu
 - + Ống ngưng tụ có chia vạch
 - + Ống làm lạnh
- Dung môi Toluen



Hình 2.5. Bộ chưng cất với dung môi

1.2.3. Tiến hành

- Cân chính xác m (g) mẫu cho vào bình cầu có chứa dung môi (100- 150ml).
- Lắp máy cất, đun bình cầu, dung môi sôi mạnh bốc hơi cuốn theo nước và ngưng tụ trong ống đo có chia vạch (điều chỉnh nguồn nhiệt sao cho có 100giọt/ phút).
- Tiếp tục đun cho đến khi mức nước trong ống đo không đổi, ngừng đun. Để nguội, đọc thể tích nước trong ống đo.

1.2.4. Tính kết quả

Độ ẩm được tính bằng %

$$X = \frac{N}{m} \times 100\%$$

Trong đó:

N: Khối lượng nước suy ra từ thể tích nước trong ống đo (g)

m: Khối lượng mẫu (g).

2. Xác định độ tro

2.1. Xác định tro toàn phần

Tro trong thực phẩm chính là hàm lượng chất vô cơ còn lại sau khi đốt cháy hoàn toàn các chất hữu cơ có trong thực phẩm.

Hàm lượng tro đại diện cho tổng lượng chất khoáng có trong thực phẩm.

2.1.1. Nguyên tắc

Dựa vào khả năng tách được các chất hữu cơ dễ cháy ra khỏi các chất vô cơ không cháy trong mẫu phân tích ở nhiệt độ cao. Nung cháy hoàn toàn hợp chất hữu cơ có trong thực phẩm ở nhiệt độ cao. Cân phần còn lại sẽ tính được hàm lượng tro toàn phần có trong thực phẩm.

2.1.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Chén nung
- Lò nung
- Bình hút ẩm

- Cân phân tích có độ chính xác 0,001g
- Kẹp an toàn để lấy vật còn nóng ra khỏi lò nung
- Bếp điện
- Dụng cụ chuẩn bị mẫu: Dao, cối chày sứ, máy nghiền
- Dung dịch HNO_3 đậm đặc



Hình 2.6. Chén nung bằng sứ



Hình 2.7. Chén nung bằng Niken



Hình 2.8. Lò nung



Hình 2.9. Kẹp chén nung

2.1.3. Tiến hành

- Nung chén đã rửa sạch trong lò nung ở 550°C đến trọng lượng không đổi, để nguội chén trong bình hút ẩm và cân (m_0)
- Cân chính xác 1 -3 g mẫu cho vào chén nung.
- Cho chén nung chứa mẫu vào lò nung (tăng nhiệt độ từ từ cho đến 600°C), giữ nhiệt độ này 3- 6 giờ đến khi tro trắng. Nếu lấy ra thấy tro còn đen, làm nguội, cho thêm vài giọt HNO_3 đđ rồi nung đến tro trắng.
- Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm và cân, tiếp tục nung 30 phút, lấy ra để nguội và cân đến khối lượng không đổi.

Chú ý:

- Khi xác định tro đối với sản phẩm dễ bốc cháy như đường, mỡ... phải đun nhẹ trên bếp điện trước cho đến khi thành than đen không bốc cháy nữa mới cho vào lò nung. (vd: mỡ heo có thể hình thành hỗn hợp dễ nổ trong lò nung, cháy phức lửa)
- Nếu là sản phẩm lỏng phải cô đặc đến khô mới cho vào lò nung (tránh bắn tung toé trong lò nung gây hao hụt mẫu)

- Khi chén nung còn nóng cho vào bình hút ẩm phải hé mở nắp bình, để chén nung nguội bớt mới đóng kín lại (cốc nóng sẽ ngưng nóng không khí trong bình hút ẩm và nắp đây có thể bị nhảy do không khí thoát ra).

2.1.4. Tính kết quả

Hàm lượng tro toàn phần tính theo %

$$X = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

Trong đó:

m_0 : khối lượng của chén nung (g)

m_1 : khối lượng của mẫu và chén trước khi nung (g)

m_2 : khối lượng của chén và tro sau khi nung (g)

2.2. Xác định tro không tan trong HCl

Những chất bản, đất đá lẫn vào trong thực phẩm là những chất có trong thành phần tro toàn phần của thực phẩm nhưng không tan trong HCl gọi là tạp chất hay tro không tan trong HCl.

2.2.1. Nguyên tắc

Nung mẫu đến khối lượng không đổi, lấy tro toàn phần cho vào HCl, sau đó lọc, phần tro không tan nằm lại trên giấy lọc, đem rửa sạch, nung và cân. Từ đó tính được hàm lượng tro không tan trong HCl.

2.2.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Chén nung
- Lò nung
- Bình hút ẩm
- Cân phân tích có độ chính xác 0,001g
- Kẹp an toàn để lấy vật còn nóng ra khỏi lò nung
- Bếp điện
- Dụng cụ chuẩn bị mẫu: Dao, cối chày sứ, máy nghiền
- Dung dịch HNO₃ đậm đặc
- Dung dịch HCl 10%
- Dung dịch AgNO₃ 0,1N

2.2.3. Tiến hành:

- Nung mẫu đến tro trắng (tro toàn phần), lấy ra để nguội, thêm vào 30ml HCl 10%.
- Đun cách thủy chén tro trong 30 phút. Lọc qua giấy lọc không tro, rửa cặn trên giấy lọc bằng nước cất đun sôi cho đến khi nước lọc không còn HCl (thử bằng AgNO₃ 10%).
- Đưa giấy lọc vào lại chén nung trên, nung trong lò nung ở 550⁰C đến trọng lượng không đổi. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm và cân.

2.2.4. Tính kết quả: Hàm lượng tạp chất tính bằng %

$$X = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

Trong đó:

m_0 : Khối lượng của chén nung (g)

m_1 : khối lượng của chén và mẫu trước khi nung (g)

m_2 : Khối lượng của chén + tạp chất sau khi nung (g)

*Ngoài cách sử dụng lò nung thường người ta có thể sử dụng lò nung vi sóng để xác định hàm lượng tro. Thời gian xác định ngắn hơn nhiều so với sử dụng lò nung. Lò nung vi sóng có thể đạt nhiệt độ đến 1200°C, có thể cài đặt nhiều chương trình thực hiện và tự động đun nóng, làm nguội.

3. Xác định hàm lượng acid – kiềm

3.1. Xác định hàm lượng acid

Xác định độ acid tổng số là xác định toàn bộ acid tự do có trong mẫu, nghĩa là toàn bộ acid hữu cơ cũng như acid vô cơ, acid dễ bay hơi cũng như khó bay hơi

3.1.1. Nguyên tắc

Nguyên tắc xác định dựa vào phản ứng trung hòa:



Dùng dung dịch NaOH 0,1N để chuẩn độ hết lượng acid có trong mẫu với chỉ thị tương ứng.

3.1.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Cân phân tích
- Phễu thủy tinh
- Cối chày sứ
- Bông thấm nước
- Buret, pipet
- Cốc thủy tinh
- Bình định mức 100ml
- Bình tam giác 250ml
- Dung dịch NaOH 0,1N
- Chỉ thị phenolphthalein 1%
- Nước cất

3.1.3. Tiến hành

- Cân 10g mẫu dạng khô (đặc) đã được nghiền nhỏ, hoặc dùng pipet lấy 10ml sản phẩm lỏng.

- Cho vào bình nón dung tích 200ml và 50ml nước cất. Để yên trong 2h, thỉnh thoảng lắc nhẹ bình nón cho acid tan hết vào nước.

- Đem lọc và hứng nước lọc vào cốc, rửa giấy lọc bằng nước cất nhiều lần.

- Chuẩn độ dung dịch mẫu bằng NaOH 0,1N với chỉ thị phenolphthalein đến khi dung dịch chuyển sang màu hồng nhạt. Nếu dung dịch lọc có màu đậm thì không chuẩn đến màu hồng nhạt mà chuẩn đến khi màu chuyển đột ngột, nghĩa là màu đang tới đến điểm trung hòa chuyển sang màu hồng sáng hơn

Trong sản xuất, để đáp ứng kịp thời thông báo kết quả, cũng có thể xác định acid tổng số bằng chuẩn độ trực tiếp (không lọc) đối với các sản phẩm không có màu đậm (hạt, bột).

3.1.4. Tính kết quả

Đối với sản phẩm khô: Hàm lượng acid tính bằng %

$$X = \frac{K \times a}{G} \times 100\%$$

Đối với sản phẩm lỏng: Hàm lượng acid tính bằng g/l

$$X = \frac{K \times a}{V} \times 1000(g/l)$$

Trong đó :

a: số ml NaOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ

G: lượng cân mẫu (g)

V : thể tích mẫu (ml)

K : Hệ số để tính ra loại acid tương ứng

Acid acetic K = 0,0060 Acid citric K = 0,0064

Acid lactic K = 0,0090 Acid tatric K = 0,0075

Acid malic K = 0,0067

Tùy theo mỗi sản phẩm sẽ tính được theo acid quy định theo loại sản phẩm đó.

3.2. Xác định hàm lượng kiềm

3.2.1. Nguyên tắc

Nguyên tắc xác định dựa vào phản ứng trung hòa:



Dùng dung dịch H_2SO_4 0,1N để chuẩn độ hết lượng kiềm có trong mẫu với chỉ thị tương ứng.

3.2.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Cân phân tích
- Ống đong, phễu thủy tinh
- Buret, pipet
- Bình định mức
- Dung dịch H_2SO_4 0,1N
- Chỉ thị Bromotymol xanh 0,5%
- Mặt kính đồng hồ
- Giấy lọc
- Cốc thủy tinh
- Bình nón 250ml

3.2.3. Tiến hành

- Cân 10g mẫu dạng khô (đặc) đã được nghiền nhỏ, hoặc dùng pipet lấy 10ml sản phẩm lỏng.
- Cho vào bình nón dung tích 200ml và 50ml nước cất. Để yên trong 2h, thỉnh thoảng lắc nhẹ bình nón cho kiềm tan hết vào nước.
- Đem lọc và hứng nước lọc vào cốc, rửa giấy lọc bằng nước cất nhiều lần.
- Chuẩn độ dung dịch mẫu bằng H_2SO_4 0,1N với chỉ thị Bromotymol xanh đến khi dung dịch chuyển từ màu xanh sang màu vàng.

3.2.4. Tính kết quả

Hàm lượng kiềm của sản phẩm được tính theo công thức:

$$X = \frac{V_1 \cdot 100}{G} \cdot \frac{V_0}{V} (\%)$$

Trong đó :

V_1 : số ml H_2SO_4 0,1N đã dùng để chuẩn độ

G: lượng cân mẫu (g)

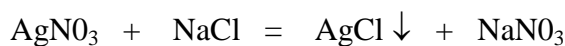
V_0 : thể tích mẫu bình định mức (ml)

V: thể tích dung dịch mẫu lấy chuẩn độ (ml)

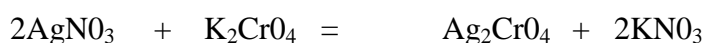
4. Xác định hàm lượng NaCl

4.1. Nguyên tắc: Theo phương pháp Morh

Dựa trên sự kết tủa phân đoạn, chuẩn độ NaCl bằng dung dịch chuẩn Nitrat bạc $AgNO_3$ 0,1N với chỉ thị Cromat kali K_2CrO_4 , khi dư một giọt $AgNO_3$ thì kết tủa màu đỏ gạch Ag_2CrO_4



(kết tủa trắng)



(dư 1 giọt) (kết tủa đỏ gạch)

Khi xuất hiện kết tủa đỏ gạch thì kết thúc định phân. Từ số ml $AgNO_3$ 0,1N tiêu tốn tính được hàm lượng NaCl có trong sản phẩm

4.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Cân phân tích
- Ống đong, phễu thủy tinh
- Buret, pipet
- Bình định mức
- Dụng cụ chuẩn bị mẫu: Dao, cối chày sứ, máy nghiền
- Dung dịch $Pb(CH_3COO)_2$ 10%
- Dung dịch $NaHCO_3$ 0,01N
- Dung dịch CH_3COOH 0,01N
- Dung dịch Nitrat bạc $AgNO_3$ 0.1N
- Chỉ thị Cromat kali K_2CrO_4 10%
- Giấy lọc
- Cốc thủy tinh
- Bình nón 250ml

4.3. Tiến hành

4.3.1. Chuẩn bị mẫu thử

Tùy theo dạng sản phẩm, chuẩn bị mẫu như sau:

- Đối với sản phẩm lỏng: lấy 5 - 10ml mẫu cho vào bình nón. Đối với sản phẩm có màu đậm thì phải pha loãng 5 - 10 lần.

- Đối với sản phẩm đặc: cắt hay xay nhỏ, cân 10 -15g và lắc với nước nóng khoảng 2h, sau đó lọc.

- Đối với chất khó chiết xuất: cân 20g, nung thành tro trắng, hòa tan trong nước cất.
- Đối với dung dịch đục: loại bỏ tạp chất bằng dung dịch $Pb(CH_3COO)_2$ sau đó lọc.

4.3.2. Trung hòa mẫu thử

Mẫu thử sau khi đã chuẩn bị, được cho thêm vào 20ml nước cất, 0,5ml phenolphthalein 1%. Nếu :

- Dung dịch trong bình nón không màu thì dùng $NaHCO_3$ 0,01N trung hòa cho đến khi có màu hồng. Sau đó, nhỏ vài giọt CH_3COOH 0,01N để mất màu hồng.
- Dung dịch trong bình nón có màu hồng thì dùng CH_3COOH 0,01N trung hòa cho đến khi mất màu hồng.

4.3.3. Chuẩn độ dung dịch mẫu

Sau khi đã có dung dịch mẫu thử trung tính, cho thêm vào bình nón 0,5ml K_2CrO_4 5%. Dùng dung dịch $AgNO_3$ 0,1N chuẩn độ dung dịch trong bình nón cho đến khi dung dịch có màu đỏ nâu. Ghi số ml $AgNO_3$ 0,1N tiêu tốn.

4.4. Tính kết quả

Đối với sản phẩm đặc: Hàm lượng NaCl tính bằng %

$$X = \frac{0.00585 \times V_1}{G} \times 100\%$$

Đối với sản phẩm lỏng: Hàm lượng NaCl tính bằng g/l

$$X = \frac{0.00585 \times V_1}{V} \times 1000(g/l)$$

Trong đó:

V_0 : số ml $AgNO_3$ đã dùng

G : lượng cân mẫu (g)

V : thể tích mẫu lấy để phân tích (ml)

5. Xác định hàm lượng nitơ

5.1. Xác định hàm lượng nitơ toàn phần

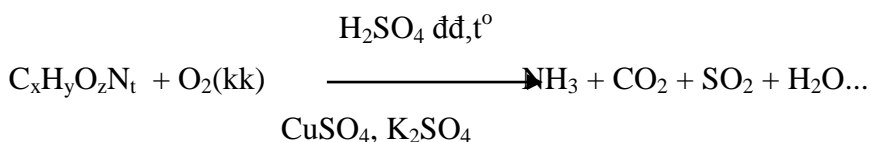
Trong thực phẩm, những hợp chất có chứa nitơ thường ở dưới dạng protein, amino acid, peptid... ngoài ra còn có muối amon (NH_4^+)... Xác định hàm lượng nitơ toàn phần là xác định hàm lượng tất cả các hợp chất có chứa nitơ. Xác định bằng phương pháp Kjeldahl.

5.1.1. Nguyên tắc

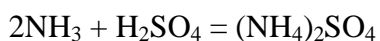
Vô cơ hóa các protein có trong mẫu bằng acid Sulfuric đậm đặc với sự có mặt của chất xúc tác (như $CuSO_4$, K_2SO_4 ...). Sản phẩm của quá trình vô cơ hóa mẫu là NH_3 . Định lượng NH_3 sẽ tính được hàm lượng Nitơ toàn phần.

Các phản ứng xảy ra trong quá trình:

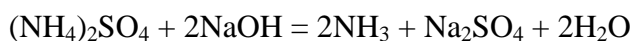
- Vô cơ hóa mẫu:



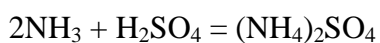
- NH_3 sinh ra kết hợp ngay với H_2SO_4 đđ có trong dung dịch



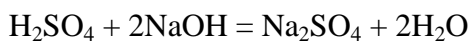
- Dùng kiềm mạnh đẩy NH_3 từ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ra dạng tự do



- Cát NH_3 và dùng H_2SO_4 0,1N (đã biết trước thể tích) để hấp thụ NH_3



- Chuẩn độ lượng H_2SO_4 dư bằng NaOH 0,1N với sự có mặt của chất chỉ thị



Từ thể tích NaOH 0,1N tiêu tốn sẽ xác định được hàm lượng Nitơ toàn phần.

5.1.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

5.1.2.1. Dụng cụ, thiết bị

- Cân phân tích
- Máy vô cơ hóa mẫu
- Máy hút khí độc
- Máy chưng cất đạm VAP20
- Bình Kjeldahl dung tích 500ml
- Pipet, buret, bình tia, bình tam giác



Hình 2.10. Bình Kjeldahl



Hình 2.11. Máy vô cơ hóa mẫu và bộ hút khí độc



Hình 2.12. Máy cất đạm

5.1.2.2. Hóa chất

- Dung dịch NaOH 30%

- Dung dịch NaOH 0,1N
- Dung dịch chuẩn H₂SO₄ 0,1N hoặc dung dịch HCl 0,1N
- Chỉ thị phenolphtalein 1%
- Chỉ thị metyla đỏ 0,2%
- Dung dịch H₂SO₄ đậm đặc (d = 1,84g/ml)
- Chất xúc tác: dùng hỗn hợp sau: (K₂SO₄, CuSO₄).
- Giấy quì
- Nước cất

5.1.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu:

Tùy hàm lượng protein có trong thực phẩm hoặc tùy theo dạng sản phẩm mà lấy mẫu thử như sau:

- a) Sản phẩm rắn:

- + Nếu hàm lượng protein trong mẫu nhiều: 0,3÷0,5g mẫu
- + Nếu hàm lượng protein thấp: 1÷2g mẫu.

Sản phẩm khô sau khi cân gói vào giấy lọc không tro, cho vào bình Kjeldahl.

- b) Sản phẩm ướt:

Tùy mẫu có ít hay nhiều protein mà cân lượng mẫu, thường cân 1g vào cốc. Chuyển mẫu vào bình Kjeldahl, cho nước cất tráng cốc và cho vào bình Kjeldahl (dùng càng ít nước càng tốt).

- c) Sản phẩm lỏng:

Dùng pipet hút chính xác 2÷10ml mẫu cho vào bình định mức 100ml rồi thêm nước cất đến vạch, lắc đều, lấy 10ml cho vào bình Kjeldahl.

- Chuẩn bị vô cơ hóa mẫu:

+ Cho tiếp vào bình Kjeldahl 2g hỗn hợp chất xúc tác (tỷ lệ K₂SO₄:CuSO₄ = 6:1) và 3ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc, dùng ít nước sạch tráng sạch cổ bình.

- Vô cơ hóa mẫu:

- + Lắp bình Kjeldahl vào máy vô cơ hóa mẫu.
- + Cài đặt các thông số của máy vô cơ hóa mẫu
- + Bật bộ xử lý khí độc
- + Đun mẫu

* Chú ý:

Nếu thực phẩm chứa nhiều nước, đun cho nước bốc hơi và hình thành khói trắng. Khi bọt tan, đun nhẹ, sau vài phút chuyển sang đun mạnh cho đến khi toàn bộ dung dịch trong bình Kjeldahl trong suốt, không màu hoặc có màu xanh lơ của dung dịch CuSO₄, để nguội. Thời gian vô cơ hóa khoảng 30 phút.

Giai đoạn vô cơ hóa mẫu trên bếp điện phải được đun từ từ, nếu đun mạnh dung dịch trong bình Kjeldahl sẽ trào ra thành bình.

- Chuẩn bị cất mẫu:

+ Bình tam giác 250ml: lấy chính xác 10ml dung dịch H₂SO₄ 0,1N và 3-5giọt chỉ thị metyla đỏ 1%.

+ Làm nguội bình Kjeldahl vô cơ hóa mẫu và chuyển mẫu thử đã vô cơ hóa vào bình Kjeldahl cất mẫu. Tráng bình Kjeldahl vô cơ hóa mẫu nhiều lần bằng nước cất.

+ Lắp ống Kjeldahl có chứa mẫu đã vô cơ hóa mẫu vào hệ thống cất đạm

+ Lắp bình tam giác 250ml hứng dung dịch vào đầu ống ngưng tụ sao cho đầu ống làm lạnh phải nhúng ngập hẳn vào dung dịch trong bình.

+ Kiểm tra bình chứa hóa chất NaOH 20%, nước cất, các đầu nối ống dẫn.

- Tiến hành cất đạm bằng máy cất đạm

- Chuẩn độ:

Chuẩn độ thể tích dung dịch H₂SO₄ 0,1N dư trong bình nón bằng dung dịch NaOH 0,1N cho đến khi dung dịch trong bình tam giác chuyển màu. Ghi thể tích dung dịch NaOH 0,1N đã dùng.

- Cất mẫu trắng:

Tiến hành xác định một mẫu trắng (không có sản phẩm) với lượng các hóa chất và thao tác như trên.

5.1.4. Tính kết quả

Hàm lượng nitơ toàn phần của sản phẩm dạng khô hay ướt tính bằng (%) theo công thức:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 100 \cdot V_o}{G \cdot V'}$$

Hàm lượng nitơ toàn phần của sản phẩm lỏng tính bằng (g/l) theo công thức:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 1000 \cdot V_o}{V \cdot V'}$$

Trong đó:

V_o : thể tích bình định mức (ml)

V' : thể tích dung dịch mẫu lấy để cất (ml)

V₁ : thể tích dung dịch NaOH 0,1N tiêu tốn để chuẩn mẫu trắng (ml)

V₂ : thể tích dung dịch NaOH 0,1N tiêu tốn để chuẩn mẫu thử (ml)

V : thể tích mẫu phân tích (ml)

G : khối lượng mẫu (g)

0,0014: khối lượng nitơ ứng với 1ml dung dịch NaOH 0,1N (g)

5.2. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định thông qua hàm lượng Nitơ toàn phần.

Từ hàm lượng Nitơ toàn phần sẽ tính được hàm lượng protein theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng protein} = \text{Hàm lượng Nitơ toàn phần} \times K$$

Trong đó: K là hệ số tương ứng với từng loại thực phẩm.

K = 6,25 : thực phẩm có nguồn gốc từ động vật

K = 6,38 : thực phẩm sữa

K = 8,00 : ngô

K = 6,00 : khoai tây

K = 5,70 : lúa mỳ, đậu

5.3. Xác định hàm lượng nitơ formol

Xác định hàm lượng Nitơ formol là xác định hàm lượng các acid amin và các muối amon có trong thực phẩm. Trong thực tế, lượng muối amon rất ít nên có thể xem xác định Nitơ formol chủ yếu là xác định acid amin.

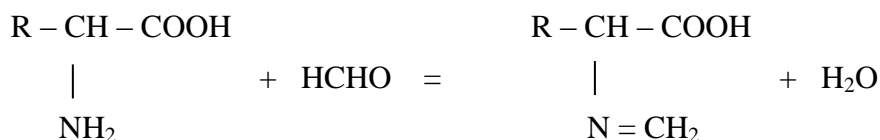
5.3.1. Phương pháp Soerensen

5.3.1.1. Nguyên tắc

Trong các phân tử amino acid đều có chứa nhóm amin (-NH₂) có tính base và nhóm cacboxyl (-COOH) có tính acid, nên trong dung dịch nó không thể hiện rõ tính acid hay base.

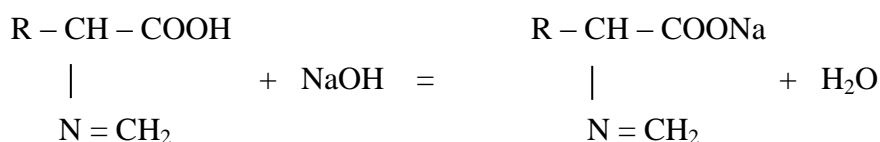
Nếu cho amino acid tác dụng với formol thì nhóm amin (-NH₂) sẽ kết hợp với formol thành nhóm -N=CH₂ làm cho tính base yếu đi rõ rệt và tính acid tăng lên rõ rệt. Do đó có thể chuẩn độ bằng chất chuẩn là kiềm và chất chỉ thị acid - base để kết thúc quá trình định phân.

Phản ứng giữa amino acid với formol:

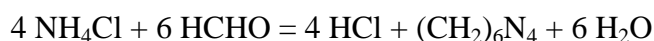


Để phản ứng này xảy ra hoàn toàn pH = 9,0÷9,5

Phản ứng chuẩn độ bởi kiềm:



Nếu trong sản phẩm có muối amon thì nó cũng tác dụng với formol tạo thành acid:



Acid tạo thành cũng tác dụng với kiềm (khi chuẩn độ). Do đó nếu trong dung dịch chỉ có amino acid thì nitơ formol là nitơ amino acid. Nếu trong dung dịch có cả amino acid lẫn muối amon thì nitơ formol là tổng số nitơ amino acid và nitơ muối amon.

Nếu trong dung dịch có các muối photphat hoặc cacbonat sẽ làm môi trường khó tăng đến 9÷9,5 làm ảnh hưởng đến độ chính xác của kết quả. Do đó cần loại bỏ các muối này bằng cách cho kết tủa với BaCl₂ và Ba(OH)₂.

Để kết thúc quá trình chuẩn độ, trong phương pháp này sử dụng phenolphtalein làm chất chỉ thị, điểm tương đương để chuẩn độ các amino acid bằng NaOH đến màu đỏ thẫm, nhằm đảm bảo điểm kết thúc định phân nằm trong khoảng pH = 9,0÷9,5.

Trong điều kiện này người ta coi nhóm cacboxyl được chuẩn độ bằng kiềm chính là số phân tử của amino acid có trong mẫu. Đối với amino acid dicacboxylide thì phải trung hòa trước nhóm cacboxylide tự do đến pH = 7. Từ thể tích dung dịch NaOH 0,2N đã dùng để chuẩn độ suy ra lượng nitơ có trong mẫu.

Do khó nhận biết lúc chuyển màu nên thường dùng dung dịch màu tiêu chuẩn để so sánh. Lấy 100ml Na₂HPO₄ 0,1N (pH = 9,3) và 0,5ml phenolphtalein 0,1% có màu đỏ tươi làm mẫu.

5.3.1.2. Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ

Dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm

- Hóa chất

+ Dung dịch formol trung tính: thông thường dung dịch formol bao giờ cũng có tính acid do formol bị oxy hóa bởi không khí thành formic acid. Do đó khi sử dụng cần trung hòa lại bằng dung dịch NaOH 0,1N với phenolphthalein làm chất chỉ thị cho đến khi có màu phớt hồng bền vững.

+ Chỉ thị phenolphthalein 0,1% trong cồn 90°

+ Dung dịch NaOH 0,2N; 0,1N

+ Dung dịch Ba(OH)₂ bão hòa trong cồn metylic

+ BaCl₂ tinh thể

+ Dung dịch Na₂HPO₄ 0,1N (chứa 17,91g Na₂HPO₄.12H₂O trong 1000ml nước)

5.3.1.3. Tiến hành

Cân chính xác cân chính xác 3÷5g mẫu đã xay nhuyễn cho vào bình định mức 100ml, cho thêm 50ml nước cất. Lắc mạnh bình trong 10 phút để hòa tan hết mẫu. Cho tiếp vào bình 2 ml phenolphthalein 0,5%, khoảng 2g BaCl₂ và từng giọt dung dịch Ba(OH)₂ cho tới khi dung dịch trong bình có màu hồng nhạt. Cho thêm 5ml dung dịch Ba(OH)₂ để kết tủa các muối photphat và cacbonat, thêm nước cất đến vạch định mức, lắc đều, để yên, lọc qua giấy lọc.

Dùng pipet lấy chính xác 20ml dung dịch mẫu trong bình định mức và 20ml dung dịch formol trung tính cho vào bình nón. Chuẩn độ dung dịch trong bình nón bằng dung dịch NaOH 0,2N cho đến khi xuất hiện màu đỏ tươi (pH = 9,0÷9,5). Ghi thể tích dung dịch NaOH 0,2N đã sử dụng.

5.3.1.4. Tính kết quả

Hàm lượng nitơ formol của sản phẩm dạng khô hay ướt tính bằng (%) theo công thức:

$$X = \frac{V \cdot 0,0028 \cdot 100 \cdot V_o}{G \cdot V'}$$

Hàm lượng Nitơ formol của sản phẩm lỏng tính bằng (g/l) theo công thức:

$$X = \frac{V \cdot 0,0028 \cdot 1000 \cdot V_o}{V_m \cdot V'}$$

Trong đó:

V_o: thể tích bình định mức (ml)

V': thể tích mẫu lấy để chuẩn độ (ml)

V: thể tích dung dịch NaOH 0,2N sử dụng (ml)

V_m: thể tích mẫu chất thử (ml)

G: khối lượng mẫu chất thử (g)

0,0028: lượng nitơ ứng với 1ml dung dịch NaOH 0,2N (g)

Chú ý:

Phương pháp này người phân tích khó nhận biết được điểm tương đương do sự chuyển màu của chỉ thị không đột ngột. Do đó để nhận biết chính xác sự đổi màu của chất chỉ thị thì mắt người phân tích phải tốt, nhận biết màu đỏ thẫm thành thạo và phải có dung dịch chuẩn.

5.3.2. Phương pháp hỗn hợp chỉ thị

5.3.2.1. Nguyên tắc

Nguyên tắc của phương pháp này giống với nguyên tắc của phương pháp Soerensen, chỉ khác phương pháp này sử dụng chỉ thị hỗn hợp phenolphtalein và bromothymol blue.

5.3.2.2. Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ

Dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm

- Hóa chất

+ Chỉ thị phenolphtalein 0,1%

+ Dung dịch NaOH 0,1N, 0,05N

+ Dung dịch HCl 0,1N

+ Formol trung tính

+ Bromothymol blue 0,04%

5.3.2.3. Tiến hành

Chuẩn bị dung dịch mẫu giống phương pháp Soerensen.

Dùng pipet lấy 10ml dung dịch mẫu đã chuẩn bị ở trên cho vào bình tam giác có dung tích 250ml, thêm vào 15 giọt bromothymol blue 0,04%. Nếu dung dịch trên có màu vàng thì nhỏ từng giọt NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu xanh. Nếu dung dịch trên có màu xanh thì nhỏ từng giọt HCl 0,1N đến khi có màu vàng rồi lấy lại màu xanh bằng vài giọt NaOH 0,1N.

Cho tiếp 5 giọt phenolphtalein 0,5%, 5ml formol trung tính, rồi chuẩn độ bằng NaOH 0,05N đến khi màu của dung dịch chuyển từ xanh sang tím. Ghi thể tích NaOH 0,05N tiêu tốn.

5.3.2.4. Tính kết quả

Hàm lượng nitơ formol của sản phẩm dạng khô hay ướt tính bằng (%) theo công thức:

$$X = \frac{V \cdot 0,0007 \cdot 100 \cdot V_o}{G \cdot V'}$$

Hàm lượng nitơ formol của sản phẩm lỏng tính bằng (g/l) theo công thức:

$$X = \frac{V \cdot 0,0007 \cdot 1000 \cdot V_o}{V_m \cdot V'}$$

Trong đó:

V_o : thể tích bình định mức (ml)

V' : thể tích mẫu lấy để chuẩn độ (ml)

V : thể tích NaOH 0,05N sử dụng (ml)

V_m : thể tích mẫu chất thử (ml)

G : khối lượng mẫu chất thử (g)

0,0007: lượng nitơ ứng với 1ml NaOH 0,05N (g)

Nhận xét:

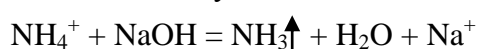
- Phương pháp này có sự chuyển màu đột ngột, ranh giới chuyển màu trước và sau điểm tương đương rất rõ ràng nên dễ nhận biết, kết quả ổn định.
- Thời gian phân tích nhanh, điều kiện tiến hành đơn giản và ít tổn hóa chất.

5.4. Xác định hàm lượng amoniac

Đạm amoniac bao gồm các muối amon và các loại tương tự như urê, chúng là các hợp chất phi protid được tạo thành trong quá trình chế biến và bảo quản thực phẩm do sự phân hủy của protid dưới tác dụng của men protease và nhiệt độ. Trong thực phẩm mà chứa nhiều đạm amoniac thì chất lượng sản phẩm kém.

5.4.1. Nguyên tắc

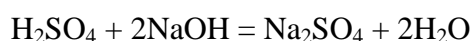
Dùng kiềm mạnh để đẩy NH_3 ra khỏi muối amon:



Cất NH_3 trên máy cất đạm và dùng H_2SO_4 0,1N hấp phụ:



Chuẩn độ lượng H_2SO_4 0,1N dư bằng dung dịch kiềm chuẩn NaOH 0,1N với chỉ thị hỗn hợp



Chuẩn độ cho đến khi dung dịch chuyển màu. Từ số ml NaOH 0,1N sử dụng tính được hàm lượng đạm amoniac.

5.4.2. Dụng cụ, hóa chất

- Cân phân tích
- Máy chưng cất đạm VAP20
- Bình Kjeldahl dung tích 500ml
- Pipet, buret, bình tia, bình tam giác
- Dung dịch NaOH 0,1N
- Dung dịch chuẩn H_2SO_4 0,1N hoặc dung dịch HCl 0,1N
- Chỉ thị phenolphthalein 1%
- Chỉ thị metyla đỏ 0,2%
- Dung dịch NaOH 30%
- Giấy quì
- Nước cất

5.4.3. Tiến hành

Quá trình tiến hành chuẩn bị mẫu, cất trên máy cất đạm, hấp thụ, chuẩn độ giống như phần tiến hành xác định hàm lượng nitơ toàn phần (không qua quá trình vô cơ hóa mẫu)

5.4.4. Tính kết quả

Giống như phần xác định nitơ toàn phần mục 5.1.4.

6. Xác định hàm lượng lipid

Lipid là một thành phần dinh dưỡng quan trọng mà con người cần cung cấp qua thực phẩm. Phần lớn các nguyên liệu dùng chế biến thực phẩm đều chứa một lượng lipid nhất định. Bởi vậy, việc xác định hàm lượng lipid là rất cần thiết. Không những nó đánh giá chất lượng nguyên liệu mà trong một số trường hợp cần biết hàm lượng lipid để đặt ra chế độ xử lý quá trình công nghệ phù hợp.

Hàm lượng lipid là tổng lượng các lipid tự do có trong thực phẩm

Tùy thuộc vào loại thực phẩm cần phân tích mà có nhiều phương pháp phân tích khác nhau.

- Xác định hàm lượng lipid tự do bằng thiết bị chiết Soxhlet (phương pháp Soxhlet) thường dùng với những nguyên liệu khô, không dùng để xác định chất béo của sữa.

- Xác định chất béo bằng phương pháp Adam - Rose – Gottlieb thường dùng để xác định hàm lượng chất béo của sản phẩm lỏng (sữa...)

6.1. Xác định lipid tự do bằng phương pháp Soxhlet

Phương pháp này thường áp dụng cho các sản phẩm rắn, không áp dụng cho sản phẩm lỏng.

6.1.1. Nguyên tắc

Dùng dung môi hữu cơ nóng để hòa tan tất cả chất béo tự do trong sản phẩm. Sau khi làm bay hơi hết dung môi, cân chất béo còn lại và tính ra được hàm lượng chất béo có trong 100g sản phẩm.

Yêu cầu đối với dung môi:

- Dung môi phải hòa tan hoàn toàn chất béo

- Có nhiệt độ sôi thấp hơn nhiều so với nhiệt độ sôi của chất béo (có thể bay hơi ở nhiệt độ thường)

Thường chọn các dung môi sau: Ete etylic, Ete dầu hỏa, Tetracolorua cacbon

6.1.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Dụng cụ

+ Dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm như bình hút ẩm, giấy lọc, cốc sứ...

+ Máy chiết Soxhlet với ống giấy ép đựng mẫu thử

+ Cối xay sứ, mặt kính

+ Bếp cách thủy chạy bằng điện

+ Cát sạch hoặc Na_2SO_4 khan

- Hóa chất

+ Ether không chứa peroxyde, rượu và nước, nhiệt độ sôi $40\div 50^\circ\text{C}$. Cho ether tác dụng với dung dịch kiềm KMnO_4 trong bình lắc cạn.

+ Ether 500ml, dung dịch NaOH hoặc KOH 40% 5ml, dung dịch KMnO_4 0,4% 50ml.

Đề trong 24 giờ, lắc đều, rửa 4÷5 lần bằng nước cất, tách và loại bỏ lớp nước cất. Cho thêm 50g Na_2SO_4 khan để loại nước trong 24 giờ, cất cách thủy để lấy ether.

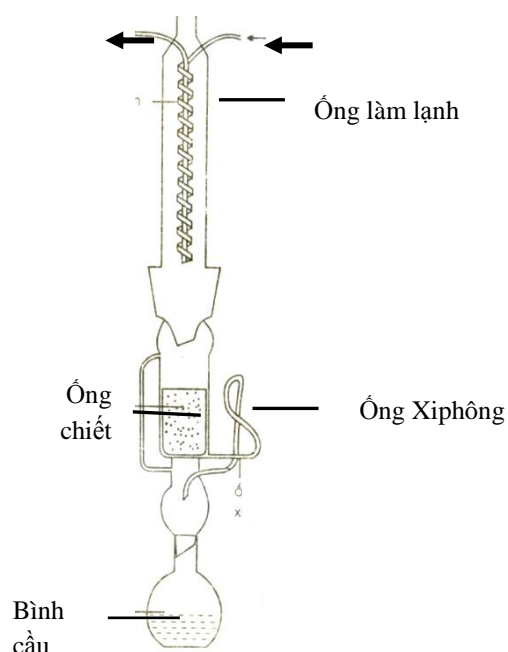
6.1.3. Tiến hành

Cân chính xác 5g chất thử, nghiền nhỏ, cho bay hết hơi nước ở nồi cách thủy. Trộn đều với 400g cát sạch hoặc Na_2SO_4 khan cho vào ống giấy xốp hay gói bằng giấy lọc. Dùng bông thấm ether lau sạch cốc, cốc sứ. Cho ống giấy vào ống chiết của máy.

Bình cầu được sấy khô, để nguội và cân. Cho ether vào bình cầu đến mức 2/3 thể tích. Cho nước chảy vào ống sinh hàn.

Đun bình cầu và chiết trong khoảng 10÷12 giờ (điều kiện là trong 1 giờ, tối thiểu 5÷6 lần và nhỏ hơn 8÷10 lần ether tràn từ ống xiphông về bình cầu). Khi ngừng máy, cần giữ ống giấy ngập trong ether.

Chiết cho đến hết lượng lipid có trong mẫu (thử bằng cách nhỏ vài giọt dung dịch trong ống chiết lên mặt kính, sau khi bay hơi hết, trên mặt kính không được có vết loang). Khi ether chảy hết xuống bình, lấy ống giấy ra, cát lấy bớt ether lên máy chiết của ống cát. Rút bình cầu ra khỏi thiết bị, cho bay hơi hết ether ở nhiệt độ bình thường rồi cho vào tủ sấy ở nhiệt độ 100÷105°C trong 1 giờ 30 phút. Làm nguội trong bình hút ẩm 30÷35 phút và đem cân.



Hình 2.13. Thiết bị chiết

6.1.4. Tính kết quả

Hàm lượng lipid tính bằng (%) theo công thức:

$$X = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 100}{G}$$

Trong đó:

m_0 : khối lượng của bình cầu không (g)

m_1 : khối lượng của bình cầu chứa lipid sau khi sấy (g)

G: khối lượng mẫu (g)

Chú ý:

- Bảo quản ether trong lọ thủy tinh màu và để trong tối.
- Không dùng loại bếp đốt có ngọn lửa để gây cháy nổ
- Chiều cao của ống giấy xốp hay gói giấy mẫu phải thấp hơn chiều cao của ống xiphông
- Có thể sử dụng CCl₄ thay cho ether
- Nếu thể tích ether cho nhiều hơn 2/3 bình cầu, trong quá trình chiết để làm cho chất béo trong bình cầu trào ngược lên ống chiết.
- Nước làm lạnh phải được chạy liên tục
- Kiểm tra dung môi nếu thấy hao hụt phải gia thêm vào.
- Khi cân nghỉ máy giữa chừng phải giữ ống giấy ngập trong dung môi.
- Sai lệch kết quả giữa hai lần xác định song song không được quá 3%

6.2. Xác định chất béo bằng phương pháp Adam – Rose – Gottlieb

Phương pháp này thường áp dụng để xác định chất béo nhanh cho các sản phẩm lỏng.

6.2.1. Nguyên tắc

Trong môi trường amoniac và cồn, chiết xuất lipid bằng ether. Cho ether bay hơi, cân lipid và tính hàm lượng lipid trong 100g thực phẩm.

6.2.2. Dụng cụ, hóa chất

- Dụng cụ
- + Tủ sấy
- + Bình lắng gạn
- + Chén thủy tinh
- + Cốc cân có nút mài
- + Bình hút ẩm
- + Cân phân tích
- Hóa chất
- + Ether thường và ether dầu hỏa
- + Dung dịch nước màu coxoni hoặc phenolphtalein 1%
- + Dung dịch cồn - amoniac:

Cồn 90°	208,5ml
NH ₄ OH	7,5ml
Nước cất vừa đủ	250ml

6.2.3. Tiến hành

Cho vào bình lắng gạn 10ml thực phẩm, 10ml dung dịch cồn - amoniac, 11ml ether, dung dịch nước màu coxoni hoặc 1 giọt phenolphtalein 1%.

Lắc bình mạnh dần, để yên 30 phút, dung dịch trong bình sẽ chia thành 2 lớp. Lớp trên là các ether hòa tan chất béo (có lẫn một số chất khác). Lớp dưới là amoniac hòa tan protid và các thành phần khác của thực phẩm.

Tách lấy lớp ether, bỏ lớp dung dịch amoniac hoặc giữ lại để định lượng amoniac. Cho thêm vào lớp ether 10 ml ether dầu hỏa, lắc mạnh rồi để yên 15 phút. Các chất khác chất béo sẽ tách ra và lắng xuống đáy bình gạn; dồn vào lớp dung dịch amoniac.

Chuyển hết phần ether vào cốc thủy tinh đã sấy khô, cân sẵn. Rửa bình lắng gạn 2 lần, mỗi lần với 5ml ether và dồn hết cả vào cốc thủy tinh. Để ether bốc hơi hết ở nhiệt độ thường. Sấy cốc ở 105°C trong 30 phút, lấy ra cho vào bình hút ẩm để nguội rồi cân.

6.2.4. Tính kết quả

Hàm lượng chất béo tính bằng (%) theo công thức:

$$X = \frac{(g_1 - g_2).100}{G}$$

Trong đó:

G: khối lượng mẫu (g)

g₁: khối lượng cốc thủy tinh có mẫu thử trước khi sấy (g)

g₂: khối lượng cốc thủy tinh có mẫu thử sau khi sấy (g)

7. Xác định hàm lượng glucid

7.1. Xác định hàm lượng đường khử

Đường khử là đường có tính khử, mà trong phân tử của chúng có chứa nhóm aldehyde (R-CHO), ceton - C = O hay nhóm - OH glucozid. Ví dụ: glucose, fructose, maltose, lactose ...

7.1.1. Phương pháp Bertrand

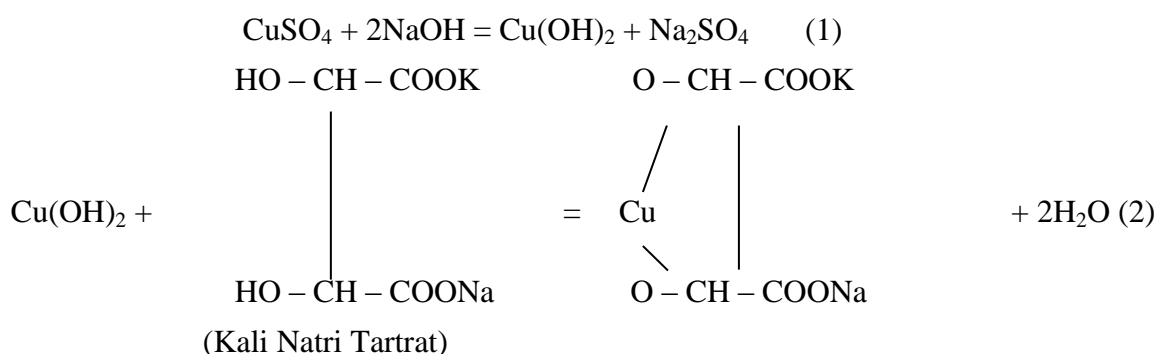
7.1.1.1. Nguyên tắc

Trong môi trường kiềm, đường khử dễ dàng khử ion Cu²⁺ trong dung dịch Fehling tạo thành Cu⁺ dưới dạng Cu₂O kết tủa màu đỏ gạch. Định lượng đường khử gián tiếp thông qua việc định lượng Cu₂O.

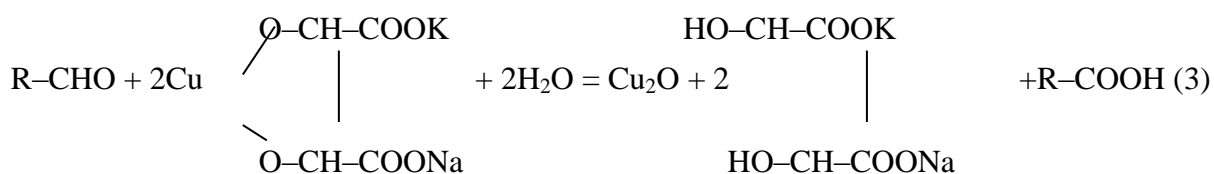
Dung dịch Fehling gồm : Dung dịch Fehling A : CuSO₄

Dung dịch Fehling B : NaOH, Kali NatriTartrat

Phản ứng xảy ra khi trộn chung 2 dung dịch Fehling A và Fehling B :



Đường khử khử hỗn hợp Fehling:



Hòa tan Cu_2O kết tủa bằng dung dịch $Fe_2(SO_4)_3$ trong môi trường H_2SO_4 đậm đặc:



Dùng chất chuẩn $KMnO_4$ 0,1N để chuẩn độ lượng $FeSO_4$ tạo thành :



Tại thời điểm kết thúc định phân, dung dịch có màu hồng. Từ lượng $KMnO_4$ 0,1N tiêu tốn sẽ tính được hàm lượng đường khử.

7.1.1.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Cân phân tích
- Bộ lọc hút chân không
- Bếp điện
- Bình định mức dung tích 100ml
- Bình nón dung tích 100ml, 250ml
- Buret, pipet, đĩa thủy tinh, phễu thủy tinh, cốc thủy tinh.
- Ống đong dung tích 50ml, 100ml
- Dung dịch Fehling A
- Dung dịch Fehling B
- Dung dịch $Fe_2(SO_4)_3$
- Dung dịch $KMnO_4$ 0,1N
- Dung dịch NaOH 30%
- $Pb(CH_3COO)_2$ bột
- Nước cất



Hình 2.14. Bếp điện



Hình 2.15. Bộ lọc hút chân không

7.1.1.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu
- + Cân chính xác G(g) mẫu vào cốc thủy tinh (G: tùy thuộc vào từng loại mẫu phân tích).
- + Hòa tan hoàn toàn bằng nước cất. Chuyển sang bình định mức 100ml. Tráng cốc bằng nước cất cho vào bình định mức trên. Thêm nước cất đến vạch định mức.
- Tẩy tạp chất
- + Cân acetat chì $Pb(CH_3COO)_2$ bột (1,5g) vào cốc, lấy một ít dung dịch mẫu cho vào cốc, khuấy đều cho tan $Pb(CH_3COO)_2$ bột, chuyển dung dịch đã tan vào bình định mức.
- + Đốc ngược bình định mức vài lần.
- + Để yên cho đến khi dung dịch phân thành 2 lớp.
- + Lọc qua giấy lọc, bỏ các giọt dung dịch lọc đầu để tráng bình. Hứng dung dịch lọc vào bình tam giác khô, sạch (gọi là dung dịch mẫu).
- + Dùng các giọt dung dịch lọc đầu để tráng bình và bỏ đi.
- Tạo kết tủa
- + Cho vào bình nón 250ml: 10ml dung dịch mẫu, 10ml Fehling A và 10ml Fehling B, lắc nhẹ.
- + Đặt bình nón lên trên bếp điện, đun sôi, thời gian sôi đúng 3 phút.
- Lắng kết tủa
- + Lấy bình nón ra để nghiêng cho kết tủa lắng xuống.
- + Quan sát dung dịch bên trên lớp kết tủa Cu_2O phải còn màu xanh của Cu^{2+} . Nếu mất màu xanh nghĩa là không đủ lượng Cu^{2+} cần thiết để phản ứng. Do đó, phải làm lại với thể tích dung dịch lọc ít hơn (5ml), nhưng phải thêm nước cất cho đủ 10ml.
- Gạn lọc kết tủa
- + Khi kết tủa Cu_2O lắng xuống, gạn phần nước bên trên và lọc qua phễu lọc xóp cắm xuyên qua nút cao su của bình lọc có nhánh nối với máy hút chân không.
- + Rửa kết tủa bằng nước đã đun sôi và gạn lọc tiếp tục vào phễu cho đến khi trong bình nón mất màu xanh. Trong quá trình gạn lọc, không để kết tủa Cu_2O lọt vào phễu và luôn luôn giữ có một lớp nước trên mặt Cu_2O để tránh tiếp xúc với không khí.
- Hòa tan kết tủa
- + Lần cuối cùng gạn hết nước và cho ngay 10-20ml $Fe_2(SO_4)_3$ để hòa tan Cu_2O trong bình nón.
- + Thay bình lọc hút này bằng bình lọc hút khác. Đổ dung dịch $Fe_2(SO_4)_3$ đã hòa tan Cu_2O trong bình nón vào phễu lọc. Tráng bình nón và rửa bằng $Fe_2(SO_4)_3$ cho đến khi không còn vết Cu_2O trong bình nón và phễu. Tráng phễu rửa lại bằng nước cất đun sôi rồi đổ cả vào phễu và hút hết xuống bình lọc.
- Chuẩn độ
- Lấy bình lọc hút ra và chuẩn độ ngay bằng $KMnO_4$ 0,1N cho đến khi xuất hiện màu hồng bền trong 30 giây.

7.1.1.4. Tính kết quả

Hàm lượng đường khử được tính bằng % theo công thức :

$$R_s = \frac{a.V_0.100}{G.V.1000} (\%)$$

Trong đó:

a : lượng glucose tìm được theo bảng tra từ số ml KMnO_4 tiêu tốn (mg)

V_0 : thể tích bình định mức (ml)

V : thể tích dung dịch lấy để thử (ml)

G : lượng cân mẫu (g)

Ví dụ tính toán về cách tính a khi tra bảng:

Khi chuẩn dùng hết 3,7ml KMnO_4 0,1N. Tính a (mg).

Tra bảng ta có:

3,55ml KMnO_4 0,1N → 11mg glucose

3,87ml KMnO_4 0,1N → 12mg glucose

Dùng phương pháp nội suy ta tính được a:

$$a = 11 + \frac{(12 - 11) \times (3,7 - 3,55)}{(3,87 - 3,55)} = 11,46\text{mg glucose}$$

Bảng 3.1. Bảng tìm lượng glucose từ thể tích $KMnO_4$ tiêu tốn

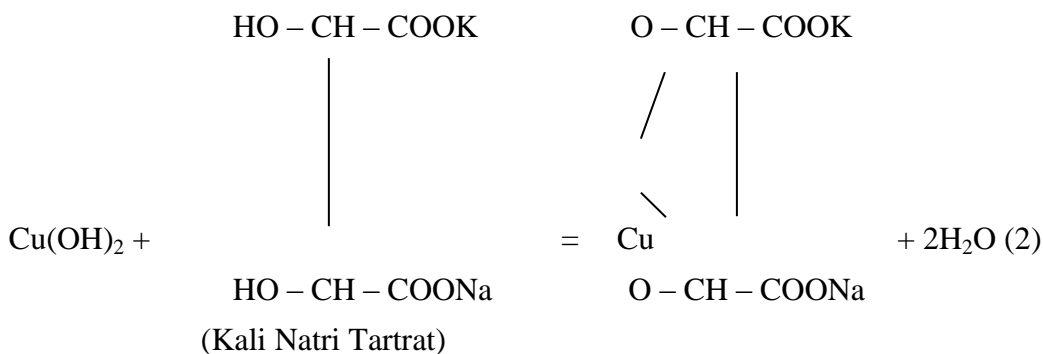
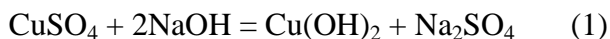
GLUCOSE (mg)	$KMnO_4$ (0,1N)	GLUCOSE (mg)	$KMnO_4$ (0,1N)	GLUCOSE (mg)	$KMnO_4$ (0,1N)
10	3,21	41	12,4	72	21,0
11	3,52	42	12,7	73	21,2
12	3,83	43	13,0	74	21,4
13	4,14	44	13,3	75	21,7
14	4,45	45	13,6	76	22,0
15	4,75	46	13,8	77	22,3
16	5,07	47	14,1	78	22,5
17	5,39	48	14,4	79	22,8
18	5,72	49	14,7	80	23,0
19	5,99	50	15,0	81	23,2
20	6,31	51	15,2	82	23,5
21	6,61	52	15,5	83	23,8
22	6,91	53	15,9	84	24,0
23	7,38	54	16,1	85	24,2
24	7,52	55	16,4	86	24,5
25	7,81	56	16,6	87	24,8
26	8,09	57	16,9	88	25,0
27	8,39	58	17,2	89	25,2
28	8,70	59	17,5	90	25,5
29	8,97	60	17,7	91	25,7
30	9,30	61	18,0	92	26,0
31	9,58	62	18,3	93	26,2
32	9,88	63	18,6	94	26,5
33	10,1	64	18,8	95	26,7
34	10,3	65	19,1	96	27,0
35	10,7	66	19,4	97	27,2
36	10,9	67	19,6	98	27,5
37	11,2	68	19,9	99	27,7
38	11,5	69	20,2	100	28,0
39	11,8	70	20,4		
40	12,2	71	20,7		

7.1.2. Phương pháp Methylene xanh

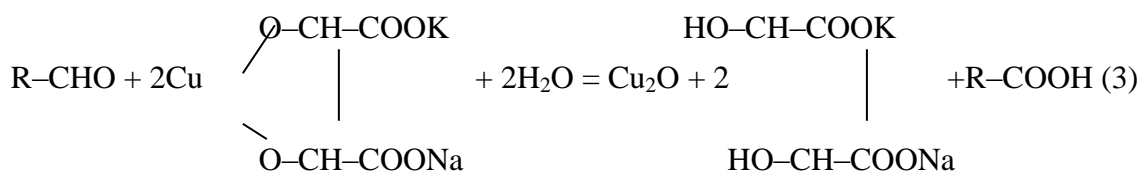
7.1.2.1. Nguyên tắc

Đường khử có khả năng khử làm mất màu methylene xanh. Vì vậy dùng methylene xanh làm chất chỉ thị cho phản ứng oxy hóa đường khử bằng Fehling. Cho vài giọt methylene xanh vào dung dịch và đun sôi rồi nhỏ từng giọt đường khử vào, đầu tiên đường khử sẽ khử đồng của Fehling, màu của methylene xanh không đổi. Khi tất cả đồng của Fehling đã bị khử hết, đường sẽ khử methylene xanh làm nó mất màu, đó là dấu hiệu kết thúc định phân.

Phản ứng xảy ra khi trộn chung 2 dung dịch Fehling A và Fehling B :



Đường khử khử hỗn hợp Fehling:



*** Yêu cầu:**

Tiến hành định phân nhanh và luôn giữ trạng thái dung dịch sôi ổn định, vì hợp chất dễ bị oxy hóa và trở về trạng thái màu ban đầu.

7.1.2.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Cân phân tích
- Bếp khuấy từ
- Bình định mức dung tích 100ml
- Bình nón dung tích 250ml
- Cốc thủy tinh, phễu thủy tinh
- Buret, pipet, đĩa thủy tinh
- Ống đong dung tích 50ml, 100ml
- Dung dịch Fehling A
- Dung dịch Fehling B
- Dung dịch glucose tiêu chuẩn 0,5%
- $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bột
- Chỉ thị Methylene xanh
- Nước cất

*** Mẫu:** mật ri, đường trắng, đường vàng.



Hình 2.16. Bếp khuấy từ

7.1.2.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu
 - + Cân chính xác $G(g)$ mẫu vào cốc thủy tinh (G : tùy thuộc vào từng loại mẫu phân tích).
 - + Hòa tan hoàn toàn bằng nước cất. Chuyển sang bình định mức 100ml. Tráng cốc bằng nước cất cho vào bình định mức trên. Thêm nước cất đến vạch định mức.
- Tẩy tạp chất
 - + Cân acetat chì $Pb(CH_3COO)_2$ bột (1,5g) vào cốc, lấy một ít dung dịch mẫu cho vào cốc, khuấy đều cho tan $Pb(CH_3COO)_2$ bột, chuyển dung dịch đã tan vào bình định mức.
 - + Đốc ngược bình định mức vài lần.
 - + Để yên cho đến khi dung dịch phân thành 2 lớp.
 - + Lọc qua giấy lọc, bỏ các giọt dung dịch lọc đầu để tráng bình. Hứng dung dịch lọc vào bình tam giác khô, sạch (gọi là dung dịch mẫu).
 - + Dùng các giọt dung dịch lọc đầu để tráng bình và bỏ đi.
- Chuẩn độ dung dịch mẫu (xác định thông số V)
 - + Lấy dung dịch mẫu đã chuẩn bị cho vào buret.
 - + Cho vào bình tam giác 250ml: 5ml Fehling A, 5ml Fehling B, 20ml nước cất, lắc nhẹ.
 - + Đặt bình nón lên trên bếp điện, đun sôi, sôi đúng 2 phút.
 - + Để yên bình tam giác trên bếp khuấy từ, chuẩn độ nhanh dung dịch trong bình nón bằng dung dịch mẫu trên buret, đến khi dung dịch trong bình nón mất màu xanh hoàn toàn.
 - + Kiểm chứng bằng chỉ thị metylen xanh 0,5%: cho 3 giọt metylen xanh, nếu dung dịch trong bình nón không trở lại màu xanh thì phản ứng đã kết thúc.
- + Ghi số ml dung dịch mẫu tiêu tốn: $V(ml)$
- Chuẩn độ dung dịch Fehling (xác định thông số f)
 - Làm lặp lại các bước thí nghiệm như bước tạo kết tủa trên nhưng thay dung dịch chuẩn trên buret bằng dung dịch glucose tiêu chuẩn 0,5%.
 - + Ghi số ml glucose tiêu chuẩn 0,5% đã tiêu tốn: $f(ml)$.

7.1.2.4. Tính kết quả

Hàm lượng đường khử của mẫu được tính bằng %:

$$R_s = \frac{0,5}{100} \cdot \frac{f \cdot V_0}{V} \cdot \frac{100}{G} (\%)$$

Trong đó :

- f : thể tích glucose tiêu chuẩn 0,5% tiêu tốn (ml)
- V₀ : thể tích bình định mức (ml)
- V : thể tích dung dịch mẫu tiêu tốn (ml)
- G : lượng cân mẫu (g)

7.2. Xác định hàm lượng saccharose

Saccharose là đường không có tính khử nhưng trong môi trường acid, đường saccharose bị thủy phân tạo thành glucose và fructose.

7.2.1. Nguyên tắc

Hàm lượng đường saccharose được xác định bằng cách thủy phân mẫu ở nhiệt độ 70°C, thời gian 15 phút, môi trường acid HCl đậm đặc. Sau đó xác định hàm lượng đường khử sau khi đã thủy phân bằng phương pháp Bertrand. Từ đó tính được hàm lượng đường saccharose.

7.2.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Cân phân tích
- Máy nghiền
- Bếp cách thủy
- Bếp điện
- Hệ thống lọc hút chân không bao gồm: Bơm hút chân không, bình lọc hút chân không, phễu lọc sứ.
- Pipet, cốc, phễu, đĩa thủy tinh, bình nón, bình định mức
- Dung dịch Fehling A
- Dung dịch Fehling B
- Dung dịch Fe₂(SO₄)₃
- Dung dịch KMnO₄ 0,1N
- (CH₃COO)₂Pb dạng tinh thể
- Acid HCl đậm đặc (d=1,19g/ml)
- Dung dịch NaOH 20%
- Chỉ thị phenolphtalein 0,1%

7.2.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu:
 - + Cân 5-10(g) mẫu đã nghiền nhỏ, cho vào cốc thủy tinh.
 - + Hòa tan mẫu hoàn toàn bằng nước cất. Chuyển sang bình định mức 100ml. Tráng cốc bằng nước cất cho vào bình định mức trên. Thêm nước cất đến vạch định mức
- Tẩy tạp chất:

+ Cân acetat chì $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bột (1,5g) vào cốc, lấy một ít dung dịch mẫu cho vào cốc, khuấy đều cho tan $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bột, chuyển dung dịch đã tan vào bình định mức.

+ Đốc ngược bình định mức vài lần.

+ Để yên cho đến khi dung dịch phân thành 2 lớp.

+ Lọc qua giấy lọc, bỏ các giọt dung dịch lọc đầu để tráng bình. Hứng dung dịch lọc vào bình tam giác khô, sạch.

+ Dùng các giọt dung dịch lọc đầu để tráng bình và bỏ đi.

- Thủy phân:

+ Lấy 50ml dung dịch lọc cho vào bình định mức 250ml

+ Thêm 50 ml nước cất, 5ml HCl đậm đặc vào bình định mức và đặt vào bếp cách thủy, thủy phân ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút.

+ Lấy bình ra, làm nguội

- Trung hòa:

+ Cho vào bình dung dịch sau thủy phân vài giọt chỉ thị phenolphthalein 1%

+ Nhỏ từ từ dung dịch NaOH 20% bằng pipet cho đến khi dung dịch xuất hiện màu hồng.

+ Thêm nước cất đến vạch định mức, lắc đều (dung dịch mẫu)

- Tạo kết tủa

+ Cho vào bình nón 250ml: 10ml dung dịch mẫu, 10ml Fehling A và 10ml Fehling B, lắc nhẹ.

+ Đặt bình nón lên trên bếp điện, đun sôi, thời gian sôi đúng 3 phút.

- Lắng kết tủa

Lấy bình nón ra để nghiêng cho kết tủa lắng xuống. Dung dịch bên trên lớp kết tủa Cu_2O phải còn màu xanh của Cu^{2+} . Nếu mất màu xanh nghĩa là không đủ lượng Cu^{2+} cần thiết để phản ứng. Do đó, phải làm lại với thể tích dung dịch lọc ít hơn (5ml), nhưng phải thêm nước cất cho đủ 10ml.

- Gạn lọc kết tủa

+ Khi kết tủa Cu_2O lắng xuống, gạn phần nước bên trên và lọc qua phễu lọc xóp cầm xuyên qua nút cao su của bình lọc có nhánh nối với máy hút chân không.

+ Rửa kết tủa bằng nước đã đun sôi và gạn lọc tiếp tục vào phễu cho đến khi trong bình nón mất màu xanh. Trong quá trình gạn lọc, không để kết tủa Cu_2O lọt vào phễu và luôn luôn giữ có một lớp nước trên mặt Cu_2O để tránh tiếp xúc với không khí.

- Hòa tan kết tủa

+ Lần cuối cùng gạn hết nước và cho ngay 10-20ml $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ để hòa tan Cu_2O trong bình nón.

+ Thay bình lọc hút này bằng bình lọc hút khác. Đổ dung dịch $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ đã hòa tan Cu_2O trong bình nón vào phễu lọc. Tráng bình nón và rửa bằng $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ cho đến khi không còn vết Cu_2O trong bình nón và phễu. Tráng phễu rửa lại bằng nước cất đun sôi rồi đổ cả vào phễu và hút hết xuống bình lọc.

- Chuẩn độ

Lấy bình lọc hút ra và chuẩn độ ngay bằng KMnO_4 0,1N cho đến khi xuất hiện màu hồng bền trong 30 giây.

7.2.4. Tính kết quả

$$R_s = \frac{a \cdot V_0 \cdot V_1 \cdot 100}{G \cdot V \cdot V_2 \cdot 1000} (\%)$$

Hàm lượng đường tổng số được tính bằng % theo công thức :

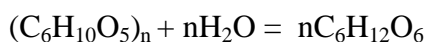
Trong đó:

- a : lượng glucose tìm được theo bảng tra từ số ml KMnO_4 tiêu tốn (mg)
- V_0 : thể tích bình định mức ban đầu (ml)
- V : thể tích dung dịch lấy để thủy phân (ml)
- V_1 : thể tích bình định mức sau khi thủy phân (ml)
- V_2 : thể tích dung dịch lấy để tạo kết tủa (ml)
- G : lượng cân mẫu (g)

7.3. Xác định hàm lượng tinh bột

7.3.1. Nguyên tắc

Dựa vào tính chất tinh bột bị thủy phân hoàn toàn trong môi trường acid với tác nhân HCl đậm đặc ở nhiệt độ 100°C , trong thời gian 3 giờ, tạo thành đường glucose



Trước khi xác định hàm lượng tinh bột phải xác định hàm lượng đường chung trước.

Hàm lượng đường chung là hàm lượng của tổng các loại đường được quy theo glucose.

Hàm lượng đường được xác định bằng cách thủy phân ở nhiệt độ 70°C , thời gian 15 phút, môi trường acid HCl đậm đặc sau đó xác định hàm lượng đường khử sau khi đã thủy phân bằng phương pháp Bertrand.

7.3.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

Dụng cụ, thiết bị và hóa chất giống với phương pháp xác định đường khử bằng phương pháp Bertrand mục 7.1.1.2.

7.3.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu

Cân chính xác G(g) mẫu ($1 \div 5$ g) cho vào bình nón, thêm vào 100ml nước cất, lắc cho tan hoàn toàn và thêm tiếp vào 5ml dung dịch HCl đậm đặc. Đậy bình nón bằng nút cao su có gắn ống thủy tinh dài.

Đặt bình nón vào nồi cách thủy, nhiệt độ 100°C trong thời gian 3 giờ (kể từ lúc bắt đầu sôi). Lấy bình ra và làm nguội nhanh dưới dòng nước lạnh đến nhiệt độ phòng.

Trung hòa lượng acid dư bằng dung dịch NaOH 20% với chỉ thị phenolphthalein đến khi dung dịch có màu hồng.

Chuyển dung dịch sang bình định mức dung tích 250ml, dùng nước cất tráng bình nón 2÷3 lần và chuyển sang bình định mức, thêm nước cất đến vạch.

Cho vào bình định mức ít acetate chì bột, lắc đều và lọc qua giấy lọc, hứng dung dịch lọc bằng cốc khô và sạch.

- Xác định hàm lượng đường khử

Lấy dung dịch lọc trên xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp Bertrand.

7.3.4. Tính kết quả

Hàm lượng tinh bột được tính bằng % theo công thức:

$$X = (a - b) \cdot 0,9$$

Trong đó:

a: Hàm lượng đường khử sau khi đã thủy phân (%)

b: Hàm lượng đường chung tính theo glucose (%)

0,9: hệ số chuyển đổi từ đường khử sang đường tinh bột.

7.4. Xác định hàm lượng cellulose

Hàm lượng cellulose (xơ thô) về quy ước là tất cả các chất không bị hòa tan trong acid, kiềm và bị đốt cháy. Phương pháp này áp dụng chung cho những sản phẩm có hàm lượng xơ thô lớn hơn 1%.

7.4.1. Nguyên tắc

Sau khi nghiền và khử chất béo, đun sôi mẫu trong dung dịch H_2SO_4 ở nồng độ chuẩn, tiến hành tách và rửa cặn không hòa tan.

Đun sôi tiếp cặn còn lại với dung dịch NaOH ở nồng độ chuẩn, sau đó tiến hành tách, rửa, làm khô và cân cặn không tan còn lại.

Sau khi sấy khô, tiến hành đốt phần cặn, cân, từ đó tính được hàm lượng xơ thô trong sản phẩm.

7.4.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- + Các dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm
 - + Rây lưới kim loại có kích thước mắt 1mm
 - + Tủ sấy, cối xay
 - + Bình rộng miệng với một ống ngưng lạnh, chẳng hạn một bình có dung tích ít nhất 600ml lắp với một ống ngưng tụ hồi lưu, hoặc một cốc đun miệng không có mỏ dung tích 600ml, trên là một bình đáy tròn dung tích 500ml chứa 450ml nước lạnh.
 - + Bếp điện gắn với máy khuấy từ tính có khả năng duy trì 200ml H_2SO_4 hoặc NaOH sôi nhẹ
 - + Cốc đốt dung tích 25÷50 ml, bền vững dưới tác dụng của các điều kiện thử hoặc một cốc nung có thiết bị lọc phù hợp cho việc tách và đốt (gọi tắt là cốc lọc)
 - + Lò nung
 - + Bình hút ẩm
 - + Cân phân tích
 - + Thiết bị tách
 - + Dung dịch H_2SO_4 0,255÷0,005 mol/l (12,5g H_2SO_4 trong 1000ml dung dịch)
 - + Dung dịch NaOH 0,313÷0,005 mol/l (12,5g NaOH trong 1000ml dung dịch)
- Dung dịch phải được loại sạch cacbon

- + Dung dịch làm khô cặn: acetone hoặc ethanol hoặc methanone hoặc propan-2-ol
- + Dung môi chiết xuất: n-hexan kỹ thuật hoặc xăng trắng (có điểm sôi nằm trong khoảng 40÷60°C)
- + Dung dịch H₂SO₄ 0,5mol/l (dùng trong trường hợp mẫu giàu cacbonat)
- + Chất trợ lọc: bông amiăng hoặc cát biển
- + Tác nhân chống sinh bọt (nếu cần) và tác nhân chống sôi trào

7.4.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu

+ Làm khô sơ bộ: Trong trường hợp sản phẩm có hàm lượng ẩm quá cao không thể trộn và nghiền chúng, thì tiến hành sấy sơ bộ ở nhiệt độ thích hợp.

Trong trường hợp như vậy cần cân sản phẩm trước khi sấy sơ bộ và cân lại ngay trước khi chuẩn bị mẫu thử

+ Sản phẩm không cần nghiền:

Các sản phẩm lọt qua rây không để lại phần mắc lại ở mắt rây thì không cần nghiền trước khi xác định. Trộn đều trước khi lập lượng mẫu cân.

+ Sản phẩm cần nghiền:

Các sản phẩm không lọt qua rây, không để lại phần kẹt lại ở mắt rây thì cần phải nghiền. Nghiền mẫu thí nghiệm trong thiết bị nghiền cho sản phẩm lọt được qua rây không để lại phần mắc lại ở mắt rây.

- Lượng mẫu cân:

Cân khoảng 3g mẫu thử, chính xác tới 1mg. Nếu hàm lượng chất béo trong mẫu lớn hơn 1% thì cần chiết xuất chất béo trước. Đối với những thực phẩm có các chất béo mà không thể loại trừ trực tiếp được thì việc chiết xuất cần phải được thực hiện sau khi xử lý acid.

- Xử lý acid

Chuyển lượng mẫu cân đã loại chất béo cũng như cacbonat vào bình rộng miệng. Nếu cần thiết bổ sung thêm chất trợ lọc, tác nhân khử bọt, chống sôi trào. Lấy 200ml dung dịch H₂SO₄ ở nhiệt độ phòng, nâng nhiệt độ dung dịch acid lên 95÷100°C và đổ dung dịch đó vào bình chứa.

Lắp thiết bị ngưng. Đưa nhanh nhiệt độ của dung dịch tới nhiệt độ sôi (trong vòng 2 phút) bằng thiết bị cấp nhiệt, tiếp tục đun sôi vừa phải trong vòng 30 ± 1 phút. Trong thời gian sôi luôn luôn xoay bình sao cho không có một mẫu nào dính trên thành trong của bình.

Sau một thời gian sôi xác định, cho thêm 50ml nước lạnh và tiến hành tách nhanh các cặn không tan bằng thiết bị tách. Rửa bình với 50ml nước nóng và đổ phần nước trắng đó lên phần cặn không tan còn lại trong thiết bị tách. Rửa cặn không tan nhiều lần cho tới khi dịch lọc trung tính với giấy quỳ. Quá trình tách và rửa cặn không tan cần phải được hoàn thành không quá 30 phút.

- Xử lý kiềm

Đổ lại phần cặn không tan đã rửa vào bình, nếu cần cho thêm chất khử bọt và chống sôi trào. Lấy 200ml dung dịch NaOH ở nhiệt độ phòng, đun nóng dung dịch lên 95÷100°C và đổ từ từ vào bình chứa.

Lắp thiết bị ngưng. Dùng thiết bị cấp nhiệt đun nhanh dung dịch tới sôi (khoảng 2 phút), tiếp tục đun sôi đều trong 30 ± 1 phút. Sau thời gian sôi quy định, cho thêm 50ml nước

lạnh và tiến hành tách nhanh các cặn không tan. Rửa cặn với 25ml dung dịch H₂SO₄ ở nhiệt độ phòng và sau đó đun nóng tới nhiệt độ 95÷100°C, rửa với nước như ở phần trên. Làm khô cặn bằng hóa chất, tiếp theo rửa bằng dung môi để loại bỏ chất béo không xà phòng hóa được.

Gom toàn bộ cặn vào trong cốc đốt hoặc cốc lọc.

- Sấy khô

Sấy cả cặn và cốc đốt trong tủ sấy ở 130 ± 2°C. Để nguội tới nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm và cân nhanh chính xác tới 0,5mg. Làm lại thao tác này cho tới khi chênh lệch giữa hai lần cân liên tiếp không vượt quá 1mg.

- Đốt

Sau khi sấy khô, tiến hành đốt phân cặn thu được trong lò nung ở 550 ± 2°C tới khối lượng không đổi. Làm nguội tới nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm và cân lại chính xác tới 0,5mg.

- Thử mẫu trắng: Tiến hành thử mẫu trắng trong cùng một điều kiện thử.

7.4.4. Tính kết quả

Hàm lượng xơ thô không cần nghiền tính bằng (%) theo công thức:

$$X_1 = \frac{[m_1 - (m_2 + m_3)]100}{m_o}$$

Hàm lượng xơ thô phải nghiền tính bằng (%) theo công thức:

$$X_2 = \frac{[m_1 - (m_2 + m_3)]100.M_s}{m_o.M'_s} \cdot \frac{100}{M'_s} \cdot \frac{M_s}{100}$$

Trong đó:

m_o: Khối lượng mẫu cân (g)

m₁: Khối lượng cặn và cốc nung sau khi sấy khô (g)

m₂: Khối lượng cặn và cốc nung sau khi đốt (g)

m₃: Khối lượng mẫu thu được khi đốt mẫu trắng (tính cả chất trợ lọc) (g)

M_s: hàm lượng chất khô của sản phẩm (%)

M': hàm lượng chất khô của mẫu thử (%)

- Trường hợp làm khô sơ bộ:

$$X_1 = \frac{[m_1 - (m_2 + m_3)]100}{m_o} \cdot \frac{m_5}{m_s}$$

Trong đó:

m₄: Khối lượng mẫu ở tình trạng ẩm ban đầu trước khi sấy sơ bộ (g)

m₅: Khối lượng mẫu sau khi sấy sơ bộ (g)

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu 1. So sánh ưu, nhược điểm, phạm vi ứng dụng của phương pháp xác định độ ẩm bằng sấy đến khối lượng không đổi và bằng phương pháp chưng cất với dung môi.

Câu 2. Khi xác định tro toàn phần của thực phẩm, nếu sau khi nung 3-6h không thu được tro trắng phải xử lý như thế nào?

Câu 3. Nêu vai trò của các hóa chất sử dụng khi vô cơ hóa mẫu để xác định hàm lượng Nitơ toàn phần theo phương pháp Kjeldahl?

Câu 4. Khi xác định hàm lượng lipid tự do trong mẫu thực phẩm bằng phương pháp Soxhlet, quá trình chiết lipid kết thúc khi nào? Phương tiện và cách tiến hành xác định điểm kết thúc quá trình chiết?

Câu 5. So sánh 2 phương pháp Bertrand và Metylen xanh xác định đường khử của thực phẩm?

Câu 6. Một sản phẩm thực phẩm vừa có chứa đường khử, đường saccharose và tinh bột. Hãy nêu thứ tự thực hiện xác định các chất đó trong mẫu thực phẩm sao cho thuận lợi nhất?

C. Ghi nhớ

1. Nguyên tắc, các bước tiến hành, tính kết quả khi xác định độ ẩm theo phương pháp sấy đến khối lượng không đổi và phương pháp chung cất với dung môi.

2. Nguyên tắc, các bước tiến hành, tính kết quả khi xác định hàm lượng tro toàn phần và tro không tan trong HCl của thực phẩm.

3. Nguyên tắc, các bước tiến hành xác định, tính kết quả hàm lượng acid, hàm lượng kiềm của thực phẩm.

4. Nguyên tắc, các bước tiến hành xác định, tính kết quả hàm lượng Nitơ toàn phần và hàm lượng protein của thực phẩm.

5. Nguyên tắc, các bước tiến hành xác định, tính kết quả hàm lượng lipid của thực phẩm.

6. Nguyên tắc, các bước tiến hành xác định, tính kết quả hàm lượng đường khử, saccharose, tinh bột, cellulose của thực phẩm.

CHƯƠNG 3: PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU VI SINH

Mục tiêu:

- Trình bày được các bước trong qui trình chung phân tích một chỉ tiêu vi sinh; các phương pháp định tính, định lượng vi sinh vật;
- Mô tả được nguyên tắc, qui trình phân tích, cách tính kết quả các chỉ tiêu vi sinh của các loại LTTP;
- Lựa chọn được phương pháp phân tích phù hợp cho từng chỉ tiêu chất lượng; loại LTTP

A. Nội dung

1. Qui trình chung phân tích một chỉ tiêu vi sinh

1.1. Chuẩn bị phòng thí nghiệm và dụng cụ phân tích vi sinh

Phòng thí nghiệm phân tích vi sinh phải đảm bảo sạch sẽ, không có các tác nhân gây nhiễm vào mẫu phân tích và có đầy đủ trang thiết bị để phân tích các chỉ tiêu vi sinh.

Các dụng cụ và thiết bị thông dụng trong phòng kiểm nghiệm vi sinh bao gồm:

- Cân phân tích
- Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy)
- Thiết bị khử trùng ẩm (nồi hấp áp lực)
- Tủ ẩm (có khả năng hoạt động ở $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- Tủ cấy có đèn khử trùng
- Máy dập mẫu (Stomacher)
- Máy trộn mẫu (Vortex mixer)
- Máy lọc hút chân không
- Tủ lạnh
- Lò vi sóng
- Ống nghiệm (kích thước 16x160mm, 18x180mm và 20x200mm)
- Đĩa petri (bằng thủy tinh/chất dẻo có đường kính từ 90mm - 100mm)
- Pipet (có dung tích danh định 1ml, 10ml)
- Bếp đun cách thủy (có thể hoạt động ở nhiệt độ 44°C - 47°C)
- Thiết bị đếm khuẩn lạc (sử dụng bộ chiếu sáng với phòng tối, được gắn kính lúp có độ phóng đại thích hợp khoảng 1,5x và bộ đếm cơ học/điện tử số)
- Cốc thủy tinh (100ml, 250ml)
- Máy đo pH (có độ chính xác $\pm 0,1$ đơn vị ở 25°C)
- Kẹp inox, đèn cồn
- Máy nghiền mẫu đồng thể
- Bình tam giác có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml.



Hình 3.1. Tủ sấy



Hình 3.2. Nồi hấp áp lực



Hình 3.3. Tủ cấy có đèn khử trùng



Hình 3.4. Tủ âm



Hình 3.5. Máy đo pH



Hình 3.6. Máy đếm khuẩn lạc



Hình 3.7. Máy đếm khuẩn lạc tự động



Hình 3.8. Máy lắc trộn mẫu



Hình 3.9. Máy lọc hút chân không

Dụng cụ thí nghiệm và các vật liệu khác để sử dụng trong phân tích vi sinh phải có thiết kế phù hợp, được sử dụng đúng mục đích và được chuẩn bị (bao gói, khử trùng) đảm bảo được độ sạch và vô trùng cho đến khi sử dụng.

Các phương pháp khử trùng dụng cụ bao gồm:

- Khử trùng bằng nhiệt khô: đối với dụng cụ bằng kim loại (đôi khi cả thủy tinh), thường sử dụng cách đốt: đốt trực tiếp trên ngọn lửa hoặc nhúng cồn đốt.

Đối với đa số dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh: bao gói, đặt các dụng cụ trong tủ sấy ở nhiệt độ $170 - 180^{\circ}\text{C}$ trong 2,5 giờ đối với dụng cụ khử trùng không có nút bông, $150 - 160^{\circ}\text{C}$ trong 3 giờ với dụng cụ có nút bông. Thông thường chế độ sấy dụng cụ hay sử dụng là 2 giờ/ 160°C hoặc 1 giờ/ 170°C hoặc tương đương. Dụng cụ đưa vào sấy phải là dụng cụ chịu được nhiệt độ cao, không buộc dây nhựa hoặc dây thun.

- Khử trùng bằng nhiệt ẩm (hơi nước): là phương pháp hiệu quả nhất để khử trùng dụng cụ thủy tinh và vật liệu của phòng thí nghiệm. Được thực hiện trong thiết bị hấp áp lực ở áp suất 0,1Mpa tương ứng với nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 -30 phút.

- Khử trùng bằng tia bức xạ: chỉ có tác dụng khử trùng bề mặt, không xuyên sâu vào bên trong dụng cụ.

- Khử trùng bằng hóa chất: sử dụng các hợp chất hóa học (các sản phẩm chứa clo, cón, các muối amoni bậc bốn) với các nồng độ thích hợp và trong một khoảng thời gian tiếp xúc thích hợp.

Trước khi chuẩn bị khử trùng, dụng cụ thủy tinh cần được làm sạch và làm khô. Dụng cụ được gói kín trong bao gói để đảm bảo sau khi khử trùng, dụng cụ không bị nhiễm lại vi sinh vật từ môi trường ngoài.

Ống nghiệm thủy tinh cần được đậy bằng nút bông không thấm nước, bao gói kín phần đầu ống nghiệm có nút bông vào giấy rồi mới đem đi khử trùng.

Đĩa petri cần được gói kín trong giấy.

Pipet thủy tinh phải được gắn một nút bông nhỏ phần cuối của pipet, sau đó bọc kín trong giấy.

Que trang, que cấy vòng, đũa thủy tinh có thể khử trùng bằng cách gói kín vào giấy bao gói.

Những dụng cụ thủy tinh có thể được khử trùng bằng hai phương pháp: khử trùng bằng nhiệt khô và khử trùng bằng nhiệt ẩm.

Dụng cụ bằng plastic chịu nhiệt: ống nghiệm có nắp nhựa chịu nhiệt, nắp bằng teflon, bằng cao su hay đầu micropipet được khử trùng bằng nhiệt ẩm trong nồi hấp áp lực ở áp suất 0,1Mpa tương ứng với nhiệt độ 121⁰C trong thời gian 20 - 30 phút.

1.2. Pha chế môi trường vi sinh

1.2.1. Yêu cầu của môi trường

Môi trường dinh dưỡng để gieo cấy vi sinh vật cần phải đạt được các yêu cầu cơ bản sau:

- Có đủ chất dinh dưỡng cần thiết.
- Có độ pH nhất định.
- Có độ nhớt nhất định.
- Gây một phản ứng nhất định thích nghi nhất cho loại vi sinh vật cần nghiên cứu.
- Tuyệt đối vô trùng.

1.2.2. Dụng cụ, thiết bị, nguyên vật liệu và hóa chất

Môi trường có thể tự điều chế từ các hóa chất, thành phần riêng biệt dựa vào công thức môi trường hoặc từ các môi trường đông khô dạng thương phẩm có bán sẵn trên thị trường.

- Chuẩn bị dụng cụ, nguyên vật liệu và hóa chất: Dụng cụ chứa môi trường phải được rửa sạch, sấy khô, làm nút đậy và vô khuẩn trước bằng phương pháp sấy ở 160⁰C trong 2 giờ trong tủ sấy. Trong trường hợp này, các ống hút cần được nhét nút bông không thấm nước vào đầu hút. Đĩa petri thủy tinh, ống hút, các dụng cụ cần khử trùng khác được gói kín bằng giấy, giấy nhôm trước khi sấy.

Các nguyên vật liệu làm môi trường tùy loại mà phải được xử lý thích hợp. Các hóa chất sử dụng phải là loại tinh khiết hóa học. Để tiêu chuẩn hóa và đồng nhất, cũng như để tiện lợi trong thao tác pha chế, hiện nay hầu hết các phòng kiểm nghiệm vi sinh đều sử dụng môi trường khô (bột) thương phẩm.

1.2.3. Tiến hành

- Pha chế: Các thành phần môi trường thường được ghi rõ trong tài liệu, người pha chế thường dựa vào đó để pha chế với thể tích phù hợp với nhu cầu sử dụng. Việc pha chế các môi trường này tương đối đơn giản, chỉ cần cân, hòa tan môi trường trong nước cất theo đúng liều lượng hướng dẫn.

- Làm trong, điều chỉnh pH: Môi trường nuôi cấy vi sinh vật, nhất là môi trường lỏng, cần phải hoàn toàn trong để ta dễ dàng quan sát sự phát triển của chúng bằng mắt thường hoặc kính hiển vi. Trong trường hợp cần thiết ta có thể làm trong môi trường bằng những phương pháp sau:

+ Lọc qua giấy lọc, bông hay vải thưa nhiều lớp.

+ Keo tụ bằng lòng trắng trứng rồi lọc. Cứ 1 lít môi trường dùng một quả. Lấy lòng trắng trứng riêng, cho thêm một lượng nước bằng tương ứng, đánh tan cho đến sủi bọt và đổ vào môi trường, khuấy đều, đun sôi 10÷15 phút, để lắng rồi lọc.

+ Với môi trường đặc, trong quá trình lọc cần phải giữ nóng nhờ phễu lọc nóng. Nếu không có phễu lọc nóng thì sau khi đun chảy lỏng, khuấy đều, đổ môi trường vào cốc lớn, đặt lại và để môi trường lắng và đặc lại. Sau đó đun nhẹ cho tách lớp và cất bỏ phần cặn bản ở phía dưới, còn phần trên đun chảy trở lại.

Để điều chỉnh pH, dùng HCl hoặc NaOH, NaHCO_3 ... Để xác định pH có thể dùng máy đo pH, giấy quỳ hoặc giấy đo pH. Sau khi pha chế và lọc xong phải đo pH. Sau đó tính lượng acid hoặc bazơ cần dùng để điều chỉnh, thêm vào môi trường, khuấy đều, đun nóng trong 5÷10 phút rồi kiểm tra lại pH.

- Phân phối vào dụng cụ chứa: vào các dụng cụ chứa thích hợp tùy mục đích sử dụng trước khi được khử trùng.

Để khảo sát các phản ứng sinh hóa, lên men, tiền tăng sinh, tăng sinh, môi trường dạng lỏng thường được chứa trong ống nghiệm thủy tinh.

Để nuôi tiền tăng sinh, tăng sinh với dung tích lớn, môi trường thường được chứa trong các bình tam giác.

Để khảo sát khả năng tăng trưởng, hình thái khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc hay phân biệt, để định lượng vi sinh vật... người ta thường nuôi ủ trên môi trường rắn trong đĩa petri.

Để khảo sát các khả năng tăng trưởng, tạo bào tử, một số thử nghiệm sinh hóa, cấy chuyên, bảo quản giống, người ta thường sử dụng ống thạch nghiêng để tăng diện tích bề mặt môi trường.

Để nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí thường sử dụng ống thạch sâu.

- Khử trùng: Chế độ khử trùng cho từng loại môi trường đều có ghi sẵn cùng với cách pha chế. Thường dùng nhất là phương pháp khử trùng bằng hơi nước bão hòa, có áp suất nhờ nồi hấp.

* Phương pháp làm môi trường đặc

- Làm thạch nghiêng: cho một lượng môi trường 1/4÷1/3 vào ống nghiệm. Sau khi vô khuẩn xong, thạch còn lỏng ta để ống thạch ở vị trí nghiêng thích hợp trên một vật có độ cao vừa phải cho đến lúc thạch đặc lại hoàn toàn. Nếu trước khi để nghiêng ống thạch đã đặc thì phải đem làm chảy lỏng trở lại. Vị trí nghiêng phải tạo thế nào để đầu trên của mặt nghiêng không vượt quá 2/3 chiều dài ống nghiệm, không để thạch chạm vào nút bông. Khi làm

ngiêng tốt, mặt nghiêng thạch bằng phẳng, không bị đứt, chiều dài vừa phải, không ngắn quá, dài quá.

- Làm thạch đứng: cho vào ống nghiệm với lượng môi trường đặc chiếm $1/2 \div 2/3$ ống nghiệm. Thạch còn nóng, ta để đứng ống thạch và để đông lại.

- Làm thạch đĩa petri (hộp lồng): Chỉ làm trước khi dùng một thời gian ngắn (vài giờ đến vài ngày). Đĩa petri phải sạch, khô bọc giấy và làm vô khuẩn trước. Trình tự làm như sau:

Đun thạch chảy lỏng, để nguội đến $50 \div 60^{\circ}\text{C}$ nhằm hạn chế sự ngưng tụ hơi nước trên nắp đĩa petri nhưng không để môi trường quá nguội làm thạch bị đông đặc cục bộ, bề mặt môi trường không phẳng.

Mở giấy bọc đĩa petri, đặt đĩa lên mặt bàn phẳng.

Tay phải cầm bình (hoặc ống) môi trường đã chảy lỏng, giữ hơi nghiêng, dùng tay trái xoay và rút nút bông ra, vô khuẩn miệng bình (hoặc miệng ống) trên đèn cồn.

Dùng tay trái hé mở nắp đĩa vừa phải và nhanh tay rót vào đĩa một lượng môi trường thích hợp. Có thể loại bỏ các bọt khí xuất hiện trên bề mặt môi trường trong đĩa bằng cách nhẹ đĩa trên ngọn lửa.

Nhanh chóng đậy nắp đĩa lại, xoay tròn đĩa từ từ trên bàn để thạch dàn thành một lớp đều trên đáy đĩa. Không xoay mạnh làm cho thạch bắn tung lên.

Hé mở nắp đĩa và để yên cho đến lúc thạch đặc lại hoàn toàn.

Đậy nắp lại, lật ngược đĩa cho đáy lên trên.

Cần chú ý là cho thạch vào đĩa petri không làm vô khuẩn lại nữa, nên khi đổ phải làm nhanh, cẩn thận, bảo đảm không bị nhiễm khuẩn từ bên ngoài. Tốt nhất nên tiến hành trong phòng (tủ) vô khuẩn.

Đĩa được giữ ở nhiệt độ thường trong tủ cấy hoặc giữ trong tủ lạnh cho đến khi dùng. Trong trường hợp giữ trong tủ lạnh, khe giữa hai nắp đĩa môi trường cần được dán kín bằng băng keo hoặc bằng màng parafin để tránh mất nước làm khô môi trường. Bề mặt thạch bị ướt có thể được làm khô để tránh hiện tượng vi sinh vật mọc loang bằng cách ủ trong tủ ấm ở $30 \div 40^{\circ}\text{C}$ vài giờ hoặc qua đêm.

Thạch đĩa đổ tốt, mặt thạch phải đều, bằng phẳng, lớp thạch không dày hoặc mỏng quá (thường khoảng 2mm).

* Lưu giữ môi trường

Tùy loại môi trường và tùy yêu cầu mà ta có thể chuẩn bị một lượng để dùng trong một thời gian nhất định.

- Môi trường bột khô: Môi trường bột khô rất dễ hút ẩm nên khi sử dụng xong phải đậy ngay và vặn nút thật chặt. cất giữ môi trường ở nơi khô, mát, tránh ánh sáng.

- Môi trường đã pha chế: Pha chế môi trường với lượng vừa đủ, không nên để lâu. Số môi trường chưa dùng đến phải bảo quản ở chỗ mát, nhiệt độ $0 \div 5^{\circ}\text{C}$, không để môi trường bị khô, bị hư hỏng dưới tác dụng của ánh sáng và nhiệt độ.

Nếu lưu giữ môi trường trong tủ lạnh thì trước khi sử dụng phải lấy ra khỏi tủ lạnh, để ở nhiệt độ phòng khoảng vài giờ hoặc để trong tủ ấm khoảng nửa giờ. Thời gian lưu trữ môi trường đã pha chế sẵn không nên quá 7 ngày.

Dù môi trường mới chuẩn bị hay đã bảo quản lâu, trước khi đem dùng đều phải kiểm tra lại sự vô khuẩn của nó. Muốn vậy, ta để môi trường vào tủ ấm có nhiệt độ từ $37 \div 38^{\circ}\text{C}$

trong 2÷3 ngày, lấy ra quan sát và loại bỏ những ống (bình) môi trường có vi sinh vật phát triển (bị đục hoặc có khuẩn lạc).

1.3. Chuẩn bị mẫu phân tích

1.3.1. Giải đông mẫu

Giải đông trong điều kiện vô trùng, thực hiện ở nhiệt độ $2\div 5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 18 giờ. Khi cần thiết có thể giải đông nhanh ở 45°C trong 15 phút, trong trường hợp này cần liên tục lắc bình chứa mẫu để tăng tốc độ giải đông và làm đồng nhất nhiệt độ bên trong mẫu.

1.3.2. Đồng nhất mẫu

Do sự phân bố không đồng đều của vi sinh vật trong mẫu nên mẫu cần được làm đồng nhất trước khi kiểm nghiệm. Việc đồng nhất các mẫu lỏng được thực hiện bằng cách lắc kỹ trước khi kiểm nghiệm. Các mẫu rắn được lắc hay đảo trộn bằng các dụng cụ chuyên dùng. Ví dụ: thiết bị đập mẫu Stomacher trong điều kiện vô trùng.

Sau khi mẫu được đồng nhất, tùy theo yêu cầu của chỉ tiêu kiểm nghiệm, thực hiện lấy một lượng mẫu xác định của mẫu để tiến hành kiểm nghiệm.

1.3.3. Cân (hút) mẫu

Cân (hút) chính xác một lượng mẫu xác định để tiến hành kiểm nghiệm tùy theo yêu cầu của chỉ tiêu kiểm nghiệm với sai số cho phép là $\pm 0,1\text{g}$ (ml).

1.3.4. Pha loãng

Tùy theo sản phẩm mà có thể chọn một trong số dung dịch pha loãng sau:

- Nước cất
- Nước muối sinh lý
- Dung dịch Ringer
- Dung dịch Tryptone hay Tryptone muối
- Dung dịch Tryptone đệm

Mẫu cần được pha loãng ở mức thập phân nối tiếp nhau bội số của 10. Chuẩn bị một loạt các ống nghiệm, hút chính xác vào mỗi ống 9ml dịch pha loãng đã vô trùng.

Đối với mẫu lỏng: Lắc kỹ mẫu, dùng pipet vô trùng hút 1ml mẫu cho vào ống nghiệm đầu tiên, lắc đều, ta có hệ số pha loãng mẫu là 1:10 (10^{-1}). Dùng một pipet vô trùng mới hút 1ml mẫu ở ống đầu tiên cho vào ống thứ hai, lắc đều, ta có hệ số pha loãng 1:100 (10^{-2}). Các độ pha loãng sau 10^{-3} , 10^{-4} ... cứ tiến hành tiếp tục như vậy cho đến khi đạt được độ pha loãng theo yêu cầu.

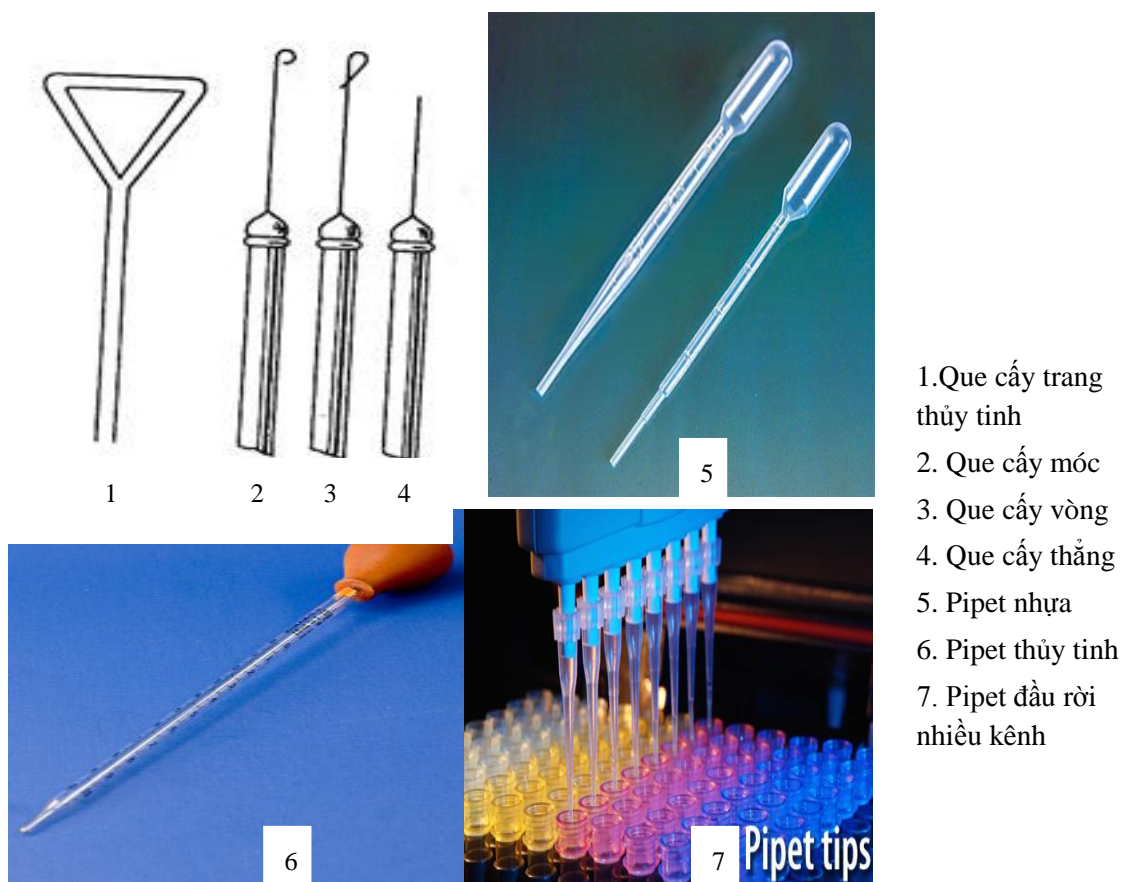
Đối với mẫu rắn: Đồng nhất mẫu, cân 10g (25g) mẫu cho vào các bao đập mẫu hoặc máy xay vô trùng, thêm 90ml (225ml) dịch pha loãng và tiến hành đồng nhất mẫu, ta có dung dịch mẫu đồng nhất có hệ số pha loãng là 1:10 (10^{-1}). Các độ pha loãng sau 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ... tiến hành tương tự như đối với mẫu lỏng.

Chú ý: Các dung dịch pha loãng nói trên chỉ nên chuẩn bị ngay trước khi tiến hành kiểm nghiệm. Thời gian thao tác nên không chế trong vòng 30 phút kể từ khi bắt đầu đến khi đổ môi trường dinh dưỡng.

1.4. Cấy mẫu vi sinh vật

1.4.1. Dụng cụ cấy

- Que cấy thẳng: que cấy kim loại có đầu nhọn, thường dùng để cấy chủng ở dạng khuẩn lạc từ môi trường rắn lên môi trường rắn hoặc lỏng.
- Que cấy móc: que cấy có đầu vuông góc, dùng để cấy vi sinh vật có tạo khuẩn ty.
- Que cấy vòng: que cấy kim loại đầu có vòng tròn, dùng cấy chủng từ môi trường rắn hoặc lỏng lên môi trường rắn, lỏng.
- Que cấy trang: bằng kim loại hay thủy tinh, đầu hình tam giác, dùng để dàn trải vi sinh vật trên bề mặt thạch rắn.
- Ống hút thủy tinh (pipet): dùng để chuyên một lượng vi sinh vật nhất định lên bề mặt môi trường rắn hoặc vào môi trường lỏng. Hiện nay, pipet cấy chuyển vào với những đầu tip vô trùng có thể tháo rời để thay đổi (pipet đầu rời, transferpipet) đã được sử dụng thay thế cho pipet dạng hút thông thường.
- Đầu tăm bông vô trùng: cấy giống từ môi trường lỏng lên bề mặt môi trường rắn.



Hình 3.10. Các dụng cụ cấy mẫu lên môi trường

1.4.2. Các thao tác vô trùng

Thao tác cấy được thực hiện trong một không gian vô trùng tạo bởi ngọn lửa đèn cồn, đèn Bunsen hoặc các tủ cấy vô trùng bằng tia cực tím.

Để tránh việc gây nhiễm thông qua tiếp xúc, nhân viên thao tác cần mang găng tay hoặc tiến hành sát trùng tay bằng cồn 70⁰ hoặc các dung dịch diệt khuẩn, tương tự như vậy tiến hành sát trùng mặt bàn thao tác trước khi bắt đầu thao tác vô trùng. Sau khi hoàn tất việc cấy chủng, tiến hành sát trùng tay, mặt bàn tương tự như trên trước khi rời phòng kiểm nghiệm.

1.4.3. Phương pháp cấy trên môi trường thạch hộp bằng pipet

- Dùng đĩa petri đã vô khuẩn, chưa có thạch
- Đun chảy ống thạch, để nguội đến 50÷55°C
- Dùng pipet vô khuẩn hút một lượng mẫu nhất định, hé mở đĩa, nghiêng qua lại hoặc xoay nhẹ đĩa để chúng dàn đều trên đáy đĩa.
- Hé mở nắp đĩa, nhanh tay đổ thạch vào, đập nắp và xoay nhẹ vài vòng trên bàn cho thạch và mẫu gieo cấy trộn đều đồng thời dàn thành một lớp trên đáy đĩa.
- Để thạch đặc lại, lật ngược đĩa, cho vào tủ ấm.

1.4.4. Phương pháp cấy trên môi trường bằng pipet đầu rời

Pipet đầu rời cho phép thao tác chính xác với những dung tích nhỏ, cho phép cấy chuyển dễ dàng dịch khuẩn lên bề mặt môi trường rắn trong đĩa petri nhằm tạo khuẩn lạc rời hoặc vào ống nghiệm hay bình chứa môi trường lỏng để nuôi tăng sinh. Bằng một pipet đầu rời, người ta thực hiện với số lần không hạn chế các thao tác vô trùng này do có thể hấp khử trùng đồng loạt với số lượng lớn các đầu tip. Trước khi sử dụng, kiểm nghiệm viên cần biết các yêu cầu cơ bản khi thao tác với pipet đầu rời như sau:

- Mỗi pipet đầu rời có dung tích khác nhau: 0,1μl; 1÷20μl; 20÷200μl; 0,2÷1ml; 1÷5ml; 1÷10ml. Dải dung tích thao tác cho phép này thường được ghi rõ trên pipet đầu rời. Trong dải dung tích cho phép, kiểm nghiệm viên có thể điều chỉnh để có dung tích chính xác cần thao tác. Cần chọn pipet đầu rời với giới hạn dung tích thích hợp trong phạm vi thao tác.

- Cần bơm pipet đầu rời thường có hai nắp: nắp 1 tương đương với dung tích được chọn sử dụng khi hút dung dịch, nắp 2 vượt quá nắp 1 được sử dụng khi bơm dung dịch ra khỏi đầu tip của pipet đầu rời.

- Khi sử dụng pipet đầu rời để cấy chuyển dịch giống cần tiến hành thao tác trong không gian vô trùng của ngọn lửa trong tủ cấy.

- Tay phải cầm pipet đầu rời, tay trái mở hộp chứa đầu tip vô trùng. Cắm đầu pipet vào đầu tip.

- Dùng tay trái giữ ống nghiệm mẫu đã pha loãng. Dùng ngón út và áp út của tay phải đang giữ pipet để kẹp giữ và mở nút bông, hơi nóng khử trùng miệng ống nghiệm hoặc bình chứa.

- Đưa đầu tip vô trùng vào bên trong ống mẫu pha loãng, hút lấy dung tích cần thiết.

- Rút đầu tip ra khỏi miệng bình chứa, khử trùng miệng bình chứa và đập bằng nút bông đang được giữ ở ngón út và áp út của tay phải.

- Đầu tip có chứa vi sinh vật được giữ ở vùng không khí vô trùng gần ngọn đèn.

- Dùng tay trái lấy ống nghiệm hoặc bình chứa môi trường mới, dung ngón út và áp út kẹp và mở nút bông, khử trùng miệng bình chứa.

- Đưa đầu tip vào bên trong môi trường và bơm dịch mẫu vào môi trường.

- Rút đầu tip ra khỏi miệng bình chứa, khử trùng miệng bình, đập nút bông.

- Thay đầu tip vô trùng mới khi thực hiện đợt cấy tiếp theo.

Chú ý: đầu pipet đầu rời và đầu tip được chế tạo bằng polymer nên tuyệt đối không được đốt khử trùng đầu pipet và đầu tip bằng ngọn lửa.

1.5. Nuôi ủ

Để đảm bảo vi sinh vật phát triển tốt, môi trường sau khi gieo cấy xong phải được giữ trong những điều kiện hiếu khí và yếm khí thích hợp cho sự phát triển và hoạt động của vi sinh vật.

- Nhiệt độ: Để duy trì nhiệt độ thích hợp, ta sử dụng các tủ hoặc phòng ẩm có bộ phận điều chỉnh nhiệt độ tự động luôn luôn duy trì nhiệt độ ở một mức nhất định nào đó.

- Độ ẩm: Để đảm bảo độ ẩm cho vi sinh vật phát triển ta có thể thực hiện bằng các cách sau:

+ Khi chuẩn bị môi trường phải đảm bảo đủ lượng nước.

+ Phun nước vô khuẩn vào phòng nuôi hoặc để nước bốc hơi trong tủ ẩm.

1.6. Quan sát, đọc và tính kết quả

Sau khi nuôi ủ, tùy vào phương pháp phân tích khác nhau đối với các loại vi sinh vật mà việc quan sát đọc và tính kết quả sẽ khác nhau. Đó có thể là:

- Quan sát hình thái của khuẩn lạc mọc lên sau khi nuôi cấy để định tính vi sinh vật.

- Quan sát mức độ đục, sự tạo khí, màu, mùi của dịch nuôi cấy khi nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng để định tính vi sinh vật.

- Đếm số lượng các khuẩn lạc mọc trên môi trường nuôi cấy để định lượng vi sinh vật.

- Quan sát sự làm đục, đổi màu, sinh khí trong môi trường nuôi cấy ở các nồng độ pha loãng khác nhau để định lượng VSV theo phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất (MPN).

2. Các phương pháp định tính vi sinh vật

2.1. Phương pháp quan sát trên kính hiển vi

2.1.1. Nguyên tắc

Đây là phương pháp đơn giản, cho phép quan sát được hình dạng tế bào, khả năng di động và phương thức sinh sản của vi sinh vật dưới kính hiển vi các loại: kính hiển vi nền sáng, kính hiển vi nền đen, kính hiển vi với thiết bị tương phản pha, kính hiển vi huỳnh quang.

2.1.2. Dụng cụ

- Phiến kính (lame) có kích thước 76x26x1,2mm

- Lá kính (lamelle) hình vuông cạnh 16÷18mm với chiều dày tối đa 0,2mm.

- Dụng cụ cấy: que cấy thẳng hoặc que cấy đầu tròn.

2.1.3. Tiến hành

- Chuẩn bị tiêu bản giọt ép:

Nhỏ một giọt nước cất vô trùng và một giọt mẫu trên phiến kính khô. Khi sử dụng mẫu có nồng độ tế bào nhỏ, không cần cho thêm giọt nước cất lên phiến kính. Cũng có thể cho một giọt KOH 5% để tách các cấu tử protein nếu có trong mẫu và cho phép phân biệt rõ hơn các tế bào vi sinh vật. Dùng lá kính đặt lên, dàn đều mẫu tránh để có bọt khí. Với cách chuẩn bị như thế này cần soi ngay vì nước rất dễ bay hơi. Có thể kéo dài thời gian sử dụng bằng cách bôi vaselin hay parafin xung quanh mép lá kính cho giọt dịch không bị khô.

- Chuẩn bị tiêu bản giọt treo:

Giọt mẫu được lấy bằng que cấy đầu tròn hay bằng que cấy thẳng được chấm lên lá kính. Lá kính này được đặt lên phiến kính đặc biệt có một chỗ lõm hình tròn ở giữa. Giọt mẫu này phải treo lơ lửng, không được tiếp xúc với các mép và đáy của chỗ lõm hình tròn trên phiến kính. Bôi vaselin hay parafin xung quanh mép lá kính. Giọt treo sẽ được bịt kín trong buồng kín, vì vậy cho phép quan sát được đối tượng nghiên cứu trong vài ngày. Dùng phiến kính đặc biệt có phần lõm hình tròn ở giữa.

Thận trọng xoay ngược lá kính cho giọt canh khuẩn quay xuống phía dưới rồi đặt lên phần lõm của phiến kính. Chú ý: không để giọt canh khuẩn lan rộng hay chạm vào đáy của phần lõm. Đặt tiêu bản lên kính hiển vi và quan sát ở vật kính 10x hoặc 40x.

- Chuẩn bị tiêu bản vết khô:

Một giọt mẫu đặt lên phiến kính khô, sạch, không dính dầu mỡ. Dùng que cấy hay thành bên của lá kính dàn càng mỏng càng tốt. Để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng hoặc có thể hơi nhẹ trên đèn cồn. Tiêu bản này thường dùng khi nhuộm màu bên trong tế bào.

2.1.4. Tính kết quả

Dựa trên hình ảnh quan sát được có thể xác định định tính về vi sinh vật như: hình dạng tế bào, khả năng nhuộm bào tử, nhuộm Gram...

2.2. Phương pháp lọc màng

Dùng để xác định chất lượng và số lượng vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc) có trong thể tích dịch khá lớn, đặc biệt là kiểm tra vi sinh trong quá trình sản xuất.

2.2.1. Nguyên tắc

Tăng số lượng vi sinh vật nhờ lọc trên màng lọc có kích thước lỗ lọc nhỏ hơn kích thước của vi sinh vật cần phát hiện. Có thể cố định và nhuộm màu tế bào ngay trên màng lọc. Màng lọc sấy khô sẽ trong suốt nếu được xử lý bằng rượu benzylic hoặc dầu thông, dầu quế.

2.2.2. Tiến hành

- Chuẩn bị hệ thống lọc chân không:

Màng lọc phải được hấp vô trùng.

Màng lọc có đường kính 47÷50mm, có kích thước lỗ 1,2 μ m để tách nấm men và nấm mốc hoặc 0,45 μ m để lọc vi khuẩn loại lớn (hình cầu, cầu khuẩn, hình que) hoặc 0,2 μ m để lọc vi khuẩn loại nhỏ hoặc bào tử vi khuẩn. Bình chân không V=1000ml. Nên dùng màng lọc có kích thước lỗ 12 μ m để lọc sơ bộ nếu thấy cần.

- Lọc:

Lọc sơ bộ nếu dung dịch có nhiều cặn hoặc vẩn đục.

Mẫu cần đưa vào lọc một cách vô trùng và lượng mang đi lọc phụ thuộc vào nồng độ vi sinh vật có trong mẫu (*Ví dụ*: bia chưa lọc lấy 1ml, bia đã lọc rồi lấy 50÷200ml, nước máy lấy 500ml).

- Cố định tế bào:

Cần phải cố định các tế bào vi sinh vật trước khi nhuộm màu để tránh rửa trôi tế bào.

Ngay sau khi lọc xong, làm nóng màng ở nhiệt độ 50÷60⁰C trong 20 phút hoặc để ở nhiệt độ phòng 1÷2 giờ để làm khô màng lọc.

- Nhuộm màu:

Đặt màng lọc vào hệ thống lọc và ngâm trong dung dịch xanh methylen trong thời gian 15 phút, sau đó rửa bằng nước cất cho tới khi nước rửa không còn màu xanh.

Màng lọc đã nhuộm được sấy ở nhiệt độ $50\div 60^{\circ}\text{C}$ trong 20 phút hoặc để ở nhiệt độ phòng 1÷2 giờ để làm khô màng lọc.

- Làm mất màu màng lọc và soi kính hiển vi:

Màng lọc đã sấy khô vẫn có thể còn màu, có thể làm cho màng mất màu và trở nên trong suốt nếu rửa bằng dung môi hữu cơ. Để quan sát tốt hơn khi soi kính hiển vi nên chọn dung môi có độ nhớt không thấp quá và có chỉ số khúc xạ thích hợp. Trong thực tế thì thường dùng các dung môi như dầu thông, dầu quế hay rượu benzylic.

Cho một giọt dung môi lên phiến kính.

Đặt một miếng màng lọc đã nhuộm màu có đường kính khoảng 6mm lên phiến kính.

Dùng lá kính đẩy lên và tránh không để có bọt khí. Màng lọc trở nên trong suốt nhờ dung môi.

Quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại $600\div 1000$ lần.

- Bảo quản mẫu làm tiêu bản chuẩn:

Sau khi quan sát xong, tiêu bản có thể được bảo quản bằng cách cho vào dầu (thường dùng dầu cọ Canada) và đóng gói niêm phong.

2.2.3. Tính kết quả

Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi cho phép nhìn thấy rõ hình thái các tế bào và nhìn thấy được sự khác nhau giữa nấm men, nấm mốc, cầu khuẩn, trực khuẩn. Tuy nhiên phương pháp này không cho phép biết được trước khi lọc tế bào này còn sống hay chết và rất dễ bị nhầm lẫn các vết đen hay cặn với tế bào vi sinh vật.

2.3. Phương pháp quan sát hình thái khuẩn lạc

3.3.1. Nguyên tắc

Sau khi nuôi cấy, quan sát hình thái của khuẩn lạc trên môi trường rắn từ các phía để định tính vi sinh vật.

2.3.2. Tiến hành

Lấy 15÷20ml môi trường thạch vô trùng, để nguội đến 50°C rồi đổ vào đĩa petri (thao tác vô trùng). Nếu có nước ngưng tụ trên nắp đĩa cần úp ngược xuống để vào tủ ấm $30\div 37^{\circ}\text{C}$ để làm khô mặt thạch.

Lấy một vòng que cấy gạt 3÷4 lần trên mặt thạch ở một góc. Quay đĩa thạch sang hướng khác và ria cấy từ một vạch thành 3÷4 đường khác sao cho không trùng với các đường trước. Lặp lại theo một hướng thứ ba để pha loãng hơn nữa phần vi khuẩn dính trên que cấy.

Chú ý: không nhấc tay lên và không thay đổi hướng của vòng que cấy.

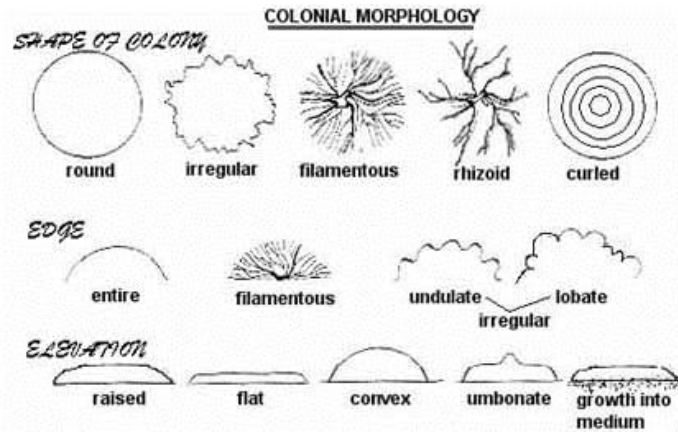
Đặt vào nhiệt độ thích hợp trong 1÷2 ngày để chọn ra các khuẩn lạc mọc riêng rẽ.

2.3.3. Kết quả

Tiến hành quan sát các khuẩn lạc này từ các phía (từ trên xuống, từ bên cạnh), chú ý về kích thước, hình dạng khuẩn lạc, hình dạng mép, bề mặt, độ dày, có núm hay không, độ trong, màu sắc (trên, dưới, có khuếch tán ra môi trường hay không)



a



b

Hình 3.11.

a. Khuẩn lạc mọc trên đĩa petri

b. Một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc cần quan sát

2.4. Phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng

2.4.1. Nguyên tắc

Lấy mẫu trong điều kiện vô trùng và cấy ngay vào môi trường thích hợp đã khử trùng. Sau một thời gian nuôi cấy, số lượng vi sinh vật có trong mẫu cần kiểm nghiệm tăng lên, như vậy dễ phát hiện sự có mặt của vi sinh vật bằng cách quan sát mức độ đục, sự tạo khí, màu, mùi của dịch nuôi cấy.

2.4.2. Tiến hành

Đưa mẫu cần kiểm nghiệm vào môi trường nuôi cấy đặc hiệu cho từng chủng vi sinh vật trong điều kiện hoàn toàn vô trùng.

Đặt môi trường nuôi cấy trong tủ ấm có nhiệt độ $25\div 37^{\circ}\text{C}$, trong 1÷6 ngày ở điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí tùy vào loại vi sinh vật cần kiểm nghiệm.

Trong thời gian nuôi cấy quan sát:

- Độ đục môi trường
- Sự tạo khí
- Sự thay đổi màu
- Có mùi lạ

2.4.3. Tính kết quả

Kết luận trong mẫu kiểm nghiệm có loại vi sinh vật cần xác định nếu quan sát thấy có một hay nhiều các biểu hiện sau:

- Có khí tạo thành
- Môi trường bị đục, mức độ đục ít hay nhiều
- Màu dịch có thay đổi hay không, cường độ màu như thế nào
- Có mùi lạ không, mùi gì (nếu có thể xác định được)

3. Các phương pháp định lượng vi sinh vật

3.1. Phương pháp xác định khối lượng khô

3.1.1. Nguyên tắc

Thu hồi nấm men có trong dịch bằng máy ly tâm siêu tốc, rửa để tách bỏ các chất hữu cơ bám trên bề mặt tế bào và sau đó sấy tới trọng lượng không đổi.

3.1.2. Tiến hành

Lấy một lượng dịch tùy ý có chứa khoảng 20÷200mg nấm men khô, cho vào ống ly tâm và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, thời gian là 15 phút.

Gạn bỏ nước trong và cho dung dịch NH_3 và cho nước cất với thể tích tương tự vào, khuấy đều và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong thời gian là 15 phút.

Gạn bỏ nước trong và dùng cùn để chuyển toàn bộ phần lắng ở dưới đáy sang hộp nhôm dùng để sấy. Cho bay hơi bớt trên nồi cách thủy.

Sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 105°C trong 24 giờ. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân.

3.1.3. Tính kết quả

Biểu thị theo % chất khô nấm men hoặc mg/ml, với một chữ số thập phân.

3.2. Phương pháp đo độ đục

3.2.1. Nguyên tắc

Các tế bào vi sinh vật ở dạng huyền phù được ly tâm, sau đó được hòa tan vào trong nước. Đo độ đục của dịch bằng máy đo độ đục hoặc máy so màu.

3.2.2. Tiến hành

Lấy 10ml mẫu cho vào ống ly tâm có chia vạch và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, thời gian là 15 phút.

Gạn bỏ dịch và dùng 8ml nước để chuyển cặn nấm men sang cuvet.

Cho thêm 0,1ml dung dịch NH_3 và cho thêm nước cất để đủ 10ml.

Khuấy đều dịch huyền phù và đo độ đục trên máy.

Chú ý: Để có kết quả chính xác thì mẫu kiểm nghiệm cần chứa 0,2÷5 mg/ml tính theo trọng lượng nấm men khô (khoảng $3 \cdot 10^6 \div 75 \cdot 10^6$ tế bào/ml).

3.2.3. Tính kết quả

Lượng tế bào nấm men, có thể biểu diễn bằng giá trị mật độ quang (OD) đo được hoặc có thể xây dựng đường cong tiêu chuẩn, biểu thị mối liên quan giữa độ đục với nồng độ tế bào, từ đó có thể biết được lượng tế bào/ml dịch.

Chú ý: Nấm men rất kết bông thường tạo thành từng mảng trên bề mặt dịch, gây khó khăn cho quá trình lắng và ly tâm. Cho dung dịch NH_3 có mục đích làm giảm khả năng kết bông của nấm men.

3.3. Phương pháp đếm trực tiếp số lượng tế bào

3.3.1. Đếm bằng buồng đếm

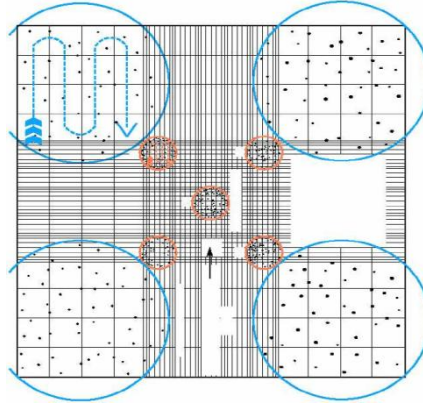
3.3.1.1. Nguyên tắc

Dùng pipet lấy một giọt mẫu cần xác định cho vào khe hở giữa buồng đếm và lá kính. Đếm số tế bào vi sinh vật dưới kính hiển vi.

3.3.1.2. Dụng cụ, thiết bị

- Lá kính hình vuông 22 x 22 mm
- Kính hiển vi nền sáng

- Buồng đếm: Có nhiều buồng đếm khác nhau phù hợp với từng thể tích và kích thước của từng nhóm vi sinh vật. Buồng đếm hồng cầu Petroff-Hauser để đếm vi khuẩn, buồng đếm Holber sử dụng cho mẫu nước và các mẫu khác, buồng đếm Malassez hoặc buồng đếm Thoma. Buồng đếm là những phiến kính dày 2÷3 mm, trên bề mặt được vạch sẵn những ô vuông và sau khi đã cho mẫu lên thì được phủ bằng một lá kính mỏng, phẳng. Buồng đếm này có thể chứa một thể tích mẫu nhất định.



Hình 3.12. Đếm vi sinh vật bằng buồng đếm

3.3.1.3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu:

Mẫu được pha loãng sao cho khi quan sát ở mỗi ô vuông nhỏ có từ 5÷10 tế bào vi sinh vật bằng dung dịch đã được lọc có 0,1% peptone; 0,1% laurylsulphate; 0,01% methyl blue.

- Chuyển mẫu lên phiến kính:

Dùng pipet lấy rất nhanh 1 giọt mẫu để nhỏ lên buồng đếm, tránh không để tràn ra ngoài, rồi phủ lên một lá kính phẳng và để yên 5 phút để ổn định vị trí các tế bào trong buồng đếm.

- Soi dưới kính hiển vi:

Chỉnh kính hiển vi, độ phóng đại khoảng 500 lần để thấy rõ được 1 ô lớn hình chữ nhật chứa 20 ô vuông nhỏ trong đó (nếu dùng buồng đếm Malassez) hoặc 1 ô vuông lớn hình vuông chứa 16 ô nhỏ trong đó (nếu dùng buồng đếm Thoma). Đếm tất cả số tế bào có trong trường quan sát (50÷100 ô ngẫu nhiên).

Số lượng tế bào tốt nhất là nằm trong khoảng 120÷200 trong một ô lớn. Nếu nồng độ tế bào quá lớn (lớn hơn 200 tế bào trong một ô lớn) thì nên pha loãng tiếp và nên chú ý tránh để tế bào vi sinh vật lắng xuống đáy trong thời gian lấy mẫu.

Chú ý: Mẫu cần được xác định ngay, không quá 30 phút kể từ khi lấy mẫu.

3.3.1.4. Kết quả

Số lượng tế bào trong 1ml mẫu được tính theo công thức:

$$X = \frac{\text{Số lượng tế bào vi sinh vật trong tất cả các ô đếm}}{\text{Số ô đếm}} \cdot 20000 \cdot \text{Hệ số pha loãng mẫu}$$

Lặp lại hai lần hay nhiều hơn để lấy giá trị đếm số trung bình. Đối với các vi sinh vật tụ thành từng cụm, không thể phân biệt từng tế bào thì mỗi cụm xem như là một tế bào.

Phương pháp này được ứng dụng đếm số tế bào nấm men là chính, với vi khuẩn do kích thước quá nhỏ bé nên khó đếm hơn so với nấm men.

Phương pháp có ưu điểm là cho phép xác định được số lượng vi sinh vật nhanh chóng với kết quả cao nhất. Hạn chế là không phân biệt được tế bào sống và chết, giữa tế bào vi sinh vật với các cặn trong mẫu, không cho phép tìm hiểu các đặc điểm khác của vi sinh vật.

3.3.2. Nhuộm xanh methylen

Phương pháp này cho phép xác định số tế bào vi sinh vật sống hay chết có trong mẫu kiểm nghiệm.

3.3.2.1. Nguyên tắc

Các tế bào sống chứa các enzyme có khả năng chuyển xanh methylen thành chất không màu. Khi ngâm tế bào vào dung dịch xanh methylen thì chất này đi qua màng tế bào và các enzyme của tế bào sống làm mất màu xanh. Các tế bào chết thì các enzyme không còn hoạt động nên không thể làm mất màu xanh methylen, do đó các tế bào này bị nhuộm màu xanh.

3.3.2.2. Dụng cụ, thiết bị, hóa chất

- Bông đếm
- Kính hiển vi nền sáng
- $C_6H_7Na.2H_2O$ (citrate natri)
- Lá kính hình vuông 22x22 mm
- Nước cất vô trùng đã qua lọc
- Dung dịch xanh methylen

3.3.2.3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu:

Trộn đều dung dịch xanh methylen với mẫu (cho một giọt dung dịch xanh methylen và một giọt mẫu). Pha loãng sao cho nồng độ tế bào vi sinh vật nằm trong khoảng 40÷60 tế bào trên trường quan sát. Sử dụng độ phóng đại 600 lần.

- Đếm:

Đếm khoảng 1000 tế bào, với các chồi có kích thước lớn hơn $\frac{1}{2}$ kích thước tế bào mẹ được coi là một tế bào.

3.3.2.4. Kết quả

Biểu thị số lượng tế bào sống theo % so với tổng số tế bào có trong mẫu.

3.4. Phương pháp đếm khuẩn lạc

Phương pháp này cho phép phát hiện những tế bào vi sinh vật còn sống có trong mẫu (ở cả dạng rắn và dạng lỏng). Mặc dù đây không phải là một phương pháp đếm vi sinh vật một cách nhanh chóng nhưng nó thường được dùng như là một phương pháp chuẩn để xác định số lượng vi sinh vật trong thực phẩm.

3.4.1. Nguyên tắc

Cấy chính xác một thể tích mẫu (hoặc dịch pha loãng) vào trong hoặc lên trên bề mặt môi trường thạch. Từ mỗi độ pha loãng cần cấy lặp lại ít nhất là 2 hộp và mỗi mẫu cần làm ít nhất 2 độ pha loãng liên tiếp để làm sao trên mỗi hộp có từ 30÷300 khuẩn lạc. Nuôi cấy trong

điều kiện thích hợp cho các vi sinh vật phát triển, sau đó đếm số lượng các khuẩn lạc mọc lên. Có thể coi mỗi khuẩn lạc là kết quả của sự phát triển từ một tế bào.

3.4..2. Tiến hành

- Chuẩn bị dụng cụ khử trùng
- Chuẩn bị môi trường thích hợp và dịch pha loãng khử trùng
- Pha loãng mẫu đến nồng độ cần thiết
- Cây mẫu:

+ Cây trong môi trường thạch đổ đĩa:

Đưa một cách vô trùng 1ml mẫu đã pha loãng đến nồng độ cần thiết vào đĩa petri vô trùng.

Rót khoảng 15÷18 ml môi trường thạch đã hóa lỏng trên nồi cách thủy (nhiệt độ khoảng 45⁰C) vào mỗi đĩa đã có mẫu. Mỗi mẫu cần làm ít nhất 2 độ pha loãng liên tiếp và từ mỗi độ pha loãng cần cấy lặp lại ít nhất là 2 đĩa.

Trộn theo kỹ thuật được chuẩn hóa (lắc đĩa theo chiều thuận và ngược kim đồng hồ khoảng 5÷6 lần). Đĩa được xếp trên mặt phẳng ngang cho đến khi thạch nguội.

+ Cây trên môi trường thạch đổ đĩa (thực hiện đối với những chỉ tiêu vi sinh vật nhạy với nhiệt độ):

Rót khoảng 15÷18 ml môi trường thạch đã hóa lỏng trên nồi cách thủy (nhiệt độ khoảng 45⁰C) vào mỗi đĩa petri đã vô trùng.

Đĩa được xếp trên mặt phẳng ngang cho đến khi thạch nguội. Sau đó thường để các đĩa này ở nhiệt độ 30⁰C trong 2÷3 ngày kiểm tra độ vô trùng của chúng.

Đưa một cách vô trùng một thể tích 0,05÷0,1ml mẫu đã pha loãng đến nồng độ cần thiết lên bề mặt thạch chứa trong đĩa petri vô trùng.

Dùng que trang vô trùng dàn đều thể tích này lên khắp bề mặt môi trường. Mỗi mẫu cần làm ít nhất 2 độ pha loãng liên tiếp sao cho trên mỗi đĩa sẽ có từ 30÷300 khuẩn lạc và từ mỗi độ pha loãng cần cấy lặp lại ít nhất là 2 đĩa.

+ Cây trên ống:

Thay đĩa petri bằng ống nghiệm có đường kính lớn, các chai nhỏ có nắp.

Cấy mẫu vào, cho môi trường vào, lắc chai hoặc ống theo chiều ngang trong nước lạnh cho đến khi môi trường đông đặc tạo thành một lớp môi trường mỏng trên thành ống (chai).

Đếm các khuẩn lạc xuất hiện trong lớp màng mỏng xung quanh ống (chai), các khuẩn lạc nằm sâu bên trong có thể quan sát bằng kính lúp.

+ Cây theo đường xoắn ốc:

Phương pháp dựa trên sự hỗ trợ của một thiết bị xoay có tác dụng phân phối một lượng mẫu xác định lên bề mặt đĩa đang xoay tròn. Điểm tiếp xúc của mẫu và đĩa môi trường bắt đầu từ trung tâm đĩa và di chuyển dần ra bên ngoài theo đường xoắn ốc. Sau khi mà khô bề mặt môi trường, đĩa được ủ trong điều kiện xác định, vi khuẩn sẽ phát triển theo đường xoắn ốc. Càng xa tâm của đĩa, mật độ vi sinh vật sẽ giảm dần và có xuất hiện các khuẩn lạc riêng biệt. Dựa vào tốc độ xoay của thiết bị, thể tích mẫu phân phối và kích thước đĩa, mật độ khuẩn lạc xuất hiện ở vòng xoắn cuối cùng sẽ tính được mật độ vi sinh vật trong mẫu. Kết quả thu được của phương pháp này tương đương với cấy trong hoặc trên môi trường thạch đổ đĩa.

- Lật ngược đĩa và đem nuôi ủ: ở nhiệt độ và thời gian tùy theo sản phẩm cần nghiên cứu và tùy theo loại vi sinh vật mà người ta muốn đánh giá sự phát triển của nó. Nhiệt độ thường 22⁰C, 30⁰C hay 37⁰C và thời gian nuôi ủ là 24, 48 hay 72 giờ.

3.4.3. Kết quả

Sau khi khuẩn lạc đã mọc, đếm số lượng các khuẩn lạc mọc trên đĩa. Để có kết quả chính xác, người ta chỉ tính những đĩa có 30÷300 khuẩn lạc (trên bề mặt và cả trong môi trường).

Số lượng vi sinh vật trung bình có trong 1ml (1g) mẫu được tính bằng (khuẩn lạc/g, ml) theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot f_1 \cdot v}$$

Trong đó:

- $\sum C$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa
- n_1 : Số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ nhất (độ pha loãng thấp nhất)
- n_2 : Số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2
- f_1 : Hệ số pha loãng của đĩa ở nồng độ pha loãng thứ 1
- v : Thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa petri

3.5. Phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất MPN

Phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất (Most Probable Number, MPN) còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn, thường dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất hiện diện trong một đơn vị mẫu kiểm nghiệm.

3.5.1. Nguyên tắc

Dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được thực hiện ở nhiều độ pha loãng liên tiếp nhau theo bội số của 10 với số lần lặp lại cho mỗi độ pha loãng ít nhất là 3 ống. Các nồng độ pha loãng được tiến hành sao cho trong các lần lặp lại có một số lần cho hiện tượng dương tính, một số lần cho dấu hiệu âm tính. Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường lỏng chọn lọc và có thể tạo đục, đổi màu, sinh khí trong môi trường nuôi cấy (đây là các ống dương tính). Xác định các ống dương tính, xử lý số liệu thu được theo bảng tra Mac Grady (Bảng xác định giá trị MPN theo số đặc trưng, phần Phụ lục) và từ đó tính ra số lượng tế bào sống có chứa trong 1g (1ml) mẫu ban đầu.

3.5.2. Tiến hành

- Chuẩn bị dịch pha loãng và các môi trường lỏng chọn lọc:

Lấy 9ml cho vào trong các ống nghiệm và khử trùng.

- Pha loãng mẫu cần kiểm nghiệm:

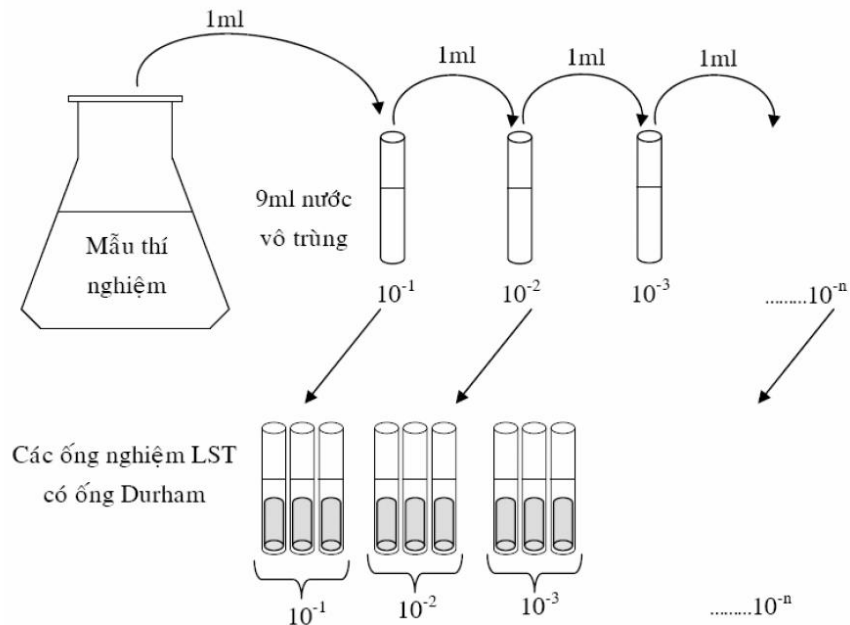
Nên làm ít nhất 3 độ pha loãng liên tiếp nhau để làm sao ở một nồng độ pha loãng này thì vi sinh vật phát triển trong tất cả các ống nghiệm lặp lại, đồng thời ở các độ pha loãng tiếp theo thì không có hoặc không phát triển trong tất cả các ống nghiệm lặp lại. Mỗi độ pha loãng khác nhau cần được cấy vào ít nhất 3 ống với thể tích chính xác là 1ml mẫu và cho vào 9ml môi trường nuôi cấy thích hợp.

- Nuôi cấy:

Sau khi cấy xong, đặt các ống nghiệm ở nhiệt độ thích hợp với các vi sinh vật cần kiểm tra. Thời gian nuôi cấy phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của các vi sinh vật.

- Quan sát:

Kiểm tra xem vi sinh vật có phát triển hay không dựa vào các đặc tính lên men có thể quan sát được như làm đục, đổi màu, sinh khí trong môi trường nuôi cấy hoặc có thể bằng các phản ứng định tính.



Hình 3.13. Minh họa về phương pháp MPN

3.5.3. Kết quả

- Xác định số đặc trưng và chỉ số MPN:

Trước hết cần xác định số đặc trưng biểu thị số ống dương tính gồm 3 con số. Số đầu (bên trái) chỉ số ống nghiệm dương tính ở độ pha loãng thấp nhất (có nghĩa là môi trường nuôi cấy có nồng độ mẫu cao nhất khi dùng để cấy thì thấy có sự phát triển của vi sinh vật). Hai số tiếp theo chỉ số ống nghiệm dương tính của 2 độ pha loãng tiếp theo. Từ số đặc trưng tìm được, tra bảng Mac Grady để tìm chỉ số MPN (dựa vào bảng tra 3 hoặc 5 lần lặp lại theo thực tế làm).

- Lượng tế bào sống có chứa trong 1g (1ml) mẫu ban đầu được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\text{Chỉ số MPN}}{\text{Độ pha loãng thấp nhất}}$$

3.6. Phương pháp màng lọc

Kiểm tra nhanh nhất chất lượng và số lượng vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc) ở nồng độ thấp trong thể tích dịch lớn.

3.6.1. Nguyên tắc

Tăng số lượng vi sinh vật có trong mẫu kiểm nghiệm nhờ lọc trên màng lọc. Kích thước lỗ lọc phải nhỏ hơn kích thước của vi sinh vật cần phát hiện. Đặt màng đã lọc lên môi trường dinh dưỡng trong đĩa petri hoặc trên carton để các vi sinh vật phát triển ngay trên màng lọc. Quan sát màu, hình thái và đếm số khuẩn lạc.

3.6.2. Tiến hành

- Chuẩn bị dụng cụ khử trùng
- Chuẩn bị môi trường thích hợp và dịch pha loãng khử trùng
- Pha loãng mẫu đến nồng độ cần thiết
- Thực hiện quá trình lọc bằng máy lọc hút, lượng dịch lọc có thể tùy theo từng loại mẫu kiểm nghiệm.
- Lọc xong, để màng lọc lên môi trường thạch trong đĩa petri (cũng có thể để màng lọc lên môi trường lỏng, nhưng trường hợp này rất ít dùng) và nuôi cấy trong điều kiện thích hợp.
- Sau một thời gian nhất định, đếm số khuẩn lạc phát triển ngay trên màng lọc.

3.6.3. Kết quả

Từ số khuẩn lạc mọc trên màng lọc, tính số lượng vi sinh vật trên đơn vị thể tích hoặc trọng lượng mẫu cần kiểm nghiệm.

Số lượng tế bào trong 1ml dịch lọc được tính theo công thức:

$$N = \frac{n}{V} \cdot k$$

Trong đó:

- N: Số lượng tế bào trong 1ml dịch lọc
- n: Số tế bào trung bình nhìn thấy trên trường quan sát
- V: Thể tích dịch đã lọc (ml)
- k: Tỷ số D^2/d^2
- D: Đường kính màng lọc (m)
- d: Đường kính trường quan sát (m)

4. Phương pháp phân tích một số chỉ tiêu vi sinh thường gặp

4.1. Xác định vi sinh vật tổng số

4.1.1. Nguyên tắc

Nuôi cấy một lượng mẫu nhất định hoặc mẫu đã pha loãng lên môi trường thạch dinh dưỡng ở nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong điều kiện hiếu khí, thời gian 48÷72 giờ. Đếm tất cả số khuẩn lạc mọc trên đó. Từ tổng số khuẩn lạc đếm được sẽ suy ra số lượng tế bào sống có trong mẫu kiểm nghiệm. Theo phương pháp này không thể xác định được các loại vi sinh vật yếm khí nghiêm ngặt mà chỉ xác định được những vi sinh vật hiếu khí và yếm khí tùy tiện.

4.1.2. Môi trường và dịch pha loãng

- Môi trường TGA (Tryptone Glucose Agar)
 - + Tryptone hoặc peptone 5g
 - + Glucose 4g
 - + Cao nấm men 2,5g
 - + Agar 15g

- + H₂O cất cho đủ 1000ml
- Môi trường PCA (Plate Count Agar)
 - + Peptone (từ casein) 5g
 - + Agar 14g
 - + Glucose 1g
 - + Cao nấm men 2,5g
 - + Nước cất cho đủ 1000ml

Yêu cầu pH = 7,0 ± 0,2 ở 25⁰C.

- Môi trường Nutrient Agar
- Dung dịch nước muối peptone SPW (Saline Peptone Water)
- Môi trường thạch màng: dung dịch nước thạch 1%
- Dung dịch nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl) hoặc nước cất

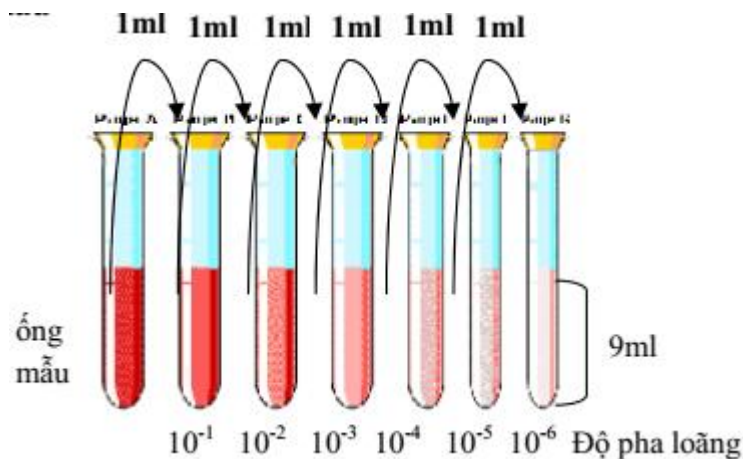
4.1.3. Tiến hành

- Khử trùng dụng cụ:

Rửa sạch và khử trùng các dụng cụ (đĩa petri, pipet, ống nghiệm, dụng cụ chứa mẫu).

- Pha loãng mẫu:

Pha loãng thập phân mẫu kiểm nghiệm đến nồng độ thích hợp để dễ dàng cho việc quan sát đếm khuẩn lạc. Thời gian thao tác không quá 30 phút.



Hình 3.14. Pha loãng mẫu thập phân

- Cấy mẫu: có hai cách:

1) Cấy trong môi trường thạch

+ Lấy 1ml mẫu đã pha loãng cho vào đĩa petri (mỗi độ pha loãng làm đồng thời 2÷3 hộp và làm hai độ pha loãng liên tiếp cuối cùng).

+ Rót môi trường thạch dinh dưỡng đã nóng chảy có nhiệt độ 45÷50⁰C vào các đĩa petri đã có mẫu, mỗi đĩa cho 15÷18ml môi trường.

+ Trộn đều bằng cách xoay đĩa theo 2 chiều.

+ Xếp các hộp trên mặt phẳng nằm ngang, để yên (trong điều kiện vô trùng) cho đến khi thạch nguội và đông hoàn toàn. Nếu dự kiến sản phẩm nào đó có thể bị mọc lan thì nên khắc phục bằng cách: sau khi môi trường dinh dưỡng đã đông hoàn toàn, rót lên bề mặt mỗi đĩa khoảng 4÷5ml thạch màng và để cho đông lại hoàn toàn.

2) Cây trên bề mặt thạch

+ Rót môi trường thạch dinh dưỡng đã hấp khử trùng vào các đĩa petri, mỗi đĩa cho 15÷18ml môi trường.

+ Xếp các đĩa trên mặt phẳng nằm ngang, để yên cho đến khi thạch nguội và đông hoàn toàn (có thể để 2÷3 ngày ở nhiệt độ 30⁰C để kiểm tra độ vô trùng của các đĩa). Khi cần chọn các đĩa petri còn hoàn toàn vô trùng.

+ Lấy 0,05ml (hay 1 giọt) mẫu đã pha loãng cho vào đĩa petri (mỗi độ pha loãng làm 2÷3 hộp và làm hai độ pha loãng liên tiếp nhau cuối cùng) đã có chứa môi trường thạch dinh dưỡng, trang đều trên mặt thạch.

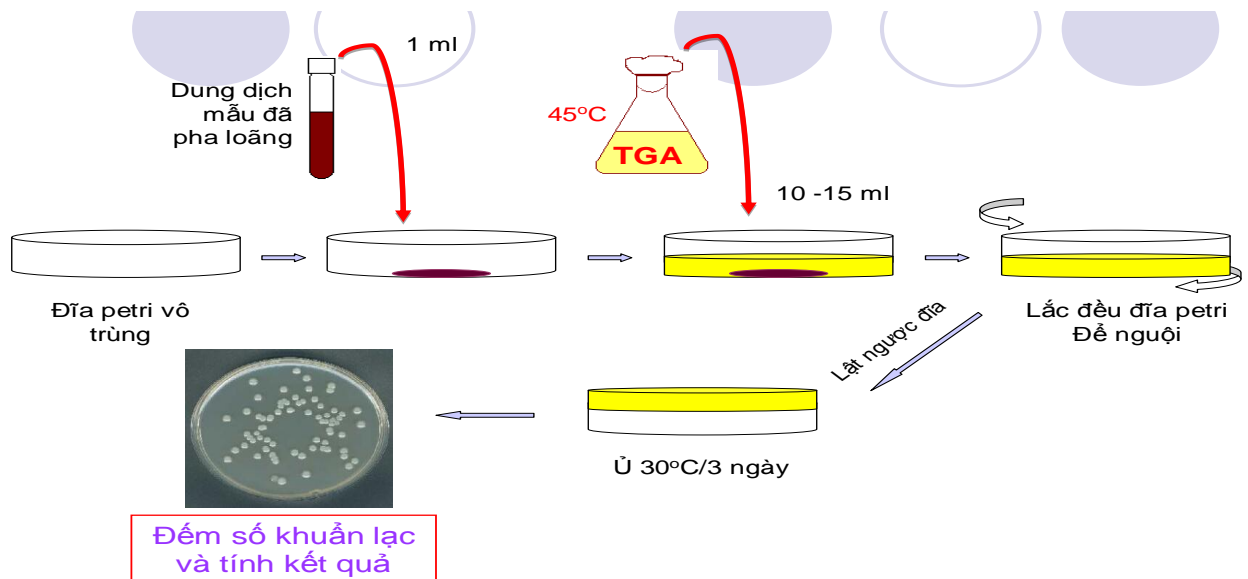
- Nuôi ủ: lật ngược đĩa, đặt vào tủ ẩm để nhiệt độ 30±1⁰C trong thời gian 24÷72 giờ.

Chú ý:

- Không làm đổ môi trường ra ngoài ống nghiệm hay vào mặt trong của nắp đĩa. Để yên các đĩa trên mặt phẳng cho đến khi đông đặc hoàn toàn (khoảng 10 phút). Lật ngược các đĩa để tránh vi trùng mọc lan tràn. Mẫu ủ phải đạt tới nhiệt độ ẩm trong vòng 2h. Phải kiểm soát độ ẩm và độ thông hơi của tủ ẩm. Nếu độ ẩm trong tủ quá cao, vi trùng dễ mọc lan tràn, nếu độ ẩm quá thấp, môi trường cấy sẽ bị bay hơi nhiều.

- Chọn số mẫu vừa phải để toàn bộ thời gian pha loãng và đổ thạch cho mỗi mẫu không quá 30 phút.

- Làm mẫu trắng (mẫu đối chứng) để kiểm tra độ vô trùng của quá trình thao tác.



Hình 3.15. Xác định vi sinh vật tổng số bằng nuôi cấy trong môi trường thạch

4.1.4. Tính kết quả

Sau khi khuẩn lạc đã mọc, đem các đĩa petri đã nuôi cấy ra đếm các khuẩn lạc mọc trên các đĩa có số lượng nằm trong khoảng 30÷300. Nếu ngay ở đĩa cấy mẫu nguyên chất (lông) hoặc dung dịch huyền phù gốc mà có số lượng ít hơn 30 khuẩn lạc thì vẫn lấy kết quả đó.

Đếm bằng mắt thường hoặc qua kính phóng đại trong ánh đèn để đếm số khuẩn lạc đã mọc trên đĩa petri.

Nếu số khuẩn lạc mọc nhiều quá khó đếm thì chia đáy đĩa thành 2, 4, 8 phần đều nhau rồi đếm số khuẩn lạc mọc trên từng phần rồi lấy số khuẩn lạc đếm được của 1 phần nhân với hệ số đã chia.

Trường hợp không thể đếm ngay sau khi thời gian ấp chấm dứt, có thể giữ đĩa ở 4°C không quá 24h.

Sự phân bố khuẩn lạc phải hợp lý tức là số lần pha loãng càng cao thì số khuẩn lạc càng ít.

Số lượng vi sinh vật trung bình có trong 1ml (1g) mẫu được tính bằng (CFU/ml, CFU/g) theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot f_1 \cdot v}$$

Trong đó:

$\sum C$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa

n_1 : Số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất)

n_2 : Số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2 (độ pha loãng tiếp theo)

f_1 : Hệ số pha loãng của đĩa đếm thứ 1

v : Thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa petri (ml).

Một người làm hai thí nghiệm song song, cho phép chênh lệch kết quả 5%. Hai người khác nhau, kết quả cho phép chênh lệch 10%.

4.2. Xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc

4.2.1. Nguyên tắc

Sử dụng kỹ thuật đổ đĩa, đếm khóm nấm trên môi trường thạch sau khi ủ hiếu khí ở nhiệt độ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian từ 5 đến 7 ngày. Số lượng bào tử nấm men, nấm mốc trong 1g hoặc 1 ml mẫu sản phẩm thực phẩm kiểm nghiệm được tính từ số khóm nấm đếm được từ các đĩa nuôi cấy theo các đậm độ pha loãng.

4.2.2. Môi trường và dịch pha loãng

1) Môi trường thạch Sabouraud

Pepton	10g
Glucosa	20g
Thạch	15 - 20g
Nước cất	1000ml

Môi trường đã được pha chế trước, cho vào ống nghiệm (15ml/ống), tiệt trùng và được bảo quản trong tủ lạnh. Khi sử dụng lấy các ống nghiệm chứa môi trường sẵn trong tủ lạnh để ra ngoài đưa về nhiệt độ phòng rồi chưng cách thủy cho tan chảy ra và giữ ở nhiệt độ $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

2) Dung dịch pha loãng: dung dịch nước muối pepton SPW (Saline Pepton Agar) hoặc Buffer's phosphate water – đệm phosphate BPW: 8,5g NaCl và 1g pepton hòa tan trong 100ml nước, phân phối vào các ống nghiệm, mỗi ống 9ml, đem hấp khử trùng.

4.2.3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu: Pha loãng thập phân mẫu phân tích đến nồng độ thích hợp để dễ dàng cho việc quan sát đếm khuẩn lạc. Thời gian thao tác không quá 30 phút.

- Cấy mẫu lên môi trường:

+ Lấy 1ml mẫu đã pha loãng cho vào hộp petri (mỗi độ pha loãng nên làm đồng thời 2-3 hộp và nên làm hai độ pha loãng liên tiếp).

+ Lấy các ống môi trường thạch đã bảo quản lạnh ra đun nóng chảy, để nguội đến $45 \pm 1^\circ\text{C}$, trong điều kiện vô khuẩn điều chỉnh pH môi trường thạch đến 4,5 - 5,5 bằng dung dịch axit lactic 20%, 40% hoặc dung dịch axit nitric 20%

+ Rót môi trường thạch dinh dưỡng đã nóng chảy có nhiệt độ $45-50^\circ\text{C}$ vào các hộp petri đã có mẫu, mỗi đĩa cho 12-15ml môi trường.

+ Trộn đều bằng cách xoay đĩa theo 2 chiều.

+ Xếp các hộp trên mặt phẳng nằm ngang, để yên (trong điều kiện vô trùng) cho đến khi thạch nguội và đông hoàn toàn.

- Nuôi ủ

Đề các đĩa đã nuôi cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ hoặc nhiệt độ phòng thí nghiệm tương ứng trong 5 - 7 ngày. Không lật ngược đĩa.

Sau 3 ngày, đếm kết quả sơ bộ, đếm tổng số các khóm nấm men và nấm mốc mọc trên các đĩa. (Chú ý nhẹ tay, không di chuyển mạnh tay hay lật ngược đĩa).

4.2.4. Tính kết quả

Chọn tất cả các đĩa có không quá 150 khóm nấm để tính kết quả. Sự phân bố các khóm nấm trên các đĩa phải hợp lý, độ pha loãng càng cao thì số khóm nấm càng ít. Nếu kết quả không hợp lý, phải tiến hành lại các bước nuôi cấy.

Chọn những đĩa có số khóm nấm men từ 15 đến 150, số khóm nấm mốc từ 5 đến 50 của 2 nồng độ pha loãng liên tiếp. Nếu chênh lệch các giá trị ở 3 nồng độ nhỏ hơn hoặc bằng 2 lần, tính số (N) bào tử cho 1 g hoặc 1 ml sản phẩm bằng cách tính trung bình cộng của tổng số khóm nấm đếm được trên các đĩa theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2), f_1 \cdot v} \quad (\text{số bào tử/g hoặc số bào tử/ml})$$

- C: Số khóm nấm men hoặc nấm mốc đếm được trên các đĩa đã chọn

- n_1, n_2 : Số đĩa ở 2 nồng độ liên tiếp đã chọn thứ 1, thứ 2.

- f_1 : Hệ số pha loãng của đĩa đếm thứ 1

- v: Thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa petri.

Nếu chênh lệch các giá trị ở 2 nồng độ lớn hơn 2 lần, lấy giá trị của nồng độ pha loãng thấp hơn để tính kết quả.

Nếu 2 đĩa của sản phẩm lỏng nguyên chất hoặc nồng độ pha loãng ban đầu có ít hơn 15 khóm nấm men hoặc ít hơn 5 khóm nấm mốc, tính kết quả theo trung bình cộng của các khóm nấm đã đếm được ở cả 2 đĩa tính ra cho 1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

Nếu tất cả các đĩa không có khóm nấm nào mọc, đánh giá kết quả như sau:

- Ít hơn 1 bào tử nấm men, nấm mốc trong 1 ml sản phẩm.

- Ít hơn bào tử nấm men, nấm mốc trong 1g sản phẩm.

f_1 : Hệ số pha loãng của nồng độ pha loãng ban đầu (10^{-1}).

4.3. Xác định *Coliforms* tổng số

4.3.1. Phương pháp MPN

4.3.1.1. Nguyên tắc

Mẫu được pha loãng ít nhất ở ba nồng độ pha loãng liên tiếp nhau và mỗi độ pha loãng được cấy trong 3 (hoặc 5) ống nghiệm lặp lại có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc có ống Durham. Sau thời gian nuôi cấy, quan sát, theo dõi sự sinh hơi và đổi màu để định tính sự hiện diện trong từng ống nghiệm; đây là các ống dương tính. Ghi nhận các ống dương tính ở mỗi độ pha loãng và cấy tiếp sang môi trường khẳng định BGBL 2%. Từ các ống nghiệm có phản ứng dương tính, tra bảng Mac Grady để suy ra số lượng *Coliforms* hiện diện trong 1g (1ml) mẫu.

4.3.1.2. Môi trường

- Môi trường LSB (Lauryl Sulphate Broth):

+ Peptone	10g
+ Mật bò khô	20g
+ Lactose	10g
+ Brilliant Green	0,0133g
+ Nước cất	1000ml

- Môi trường BGBL 2% (Brilliant Green Bile Lactose Broth)

+ Tryptone	20g
+ NaCl	5g
+ Lactose	5g
+ Sulphate lauryl	0,1g
+ K ₂ HPO ₄	2,75g
+ KH ₂ PO ₄	2,75g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Hòa tan peptone và lactose vào trong 500ml, mật bò khô vào 200ml và Brilliant Green vào trong 100ml nước cất. Trộn đều 3 dung dịch trên và thêm nước cất cho đủ 1000ml. Môi trường được phân phối vào các ống nghiệm chứa ống Durham úp ngược, hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút, pH cuối = 6,8 ở nhiệt độ 25⁰C, chỉ sử dụng các ống nghiệm không có bọt khí bên trong ống Durham.

4.3.1.3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu: nồng độ pha loãng 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³.

- Gieo cấy:

Cấy 1ml mẫu đã pha loãng ở các nồng độ 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ vào các ống nghiệm có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc LSB, mỗi độ pha loãng làm 3 ống nghiệm lặp lại.

- Nuôi ủ:

Đưa các ống đã cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ 44⁰C±1⁰C trong thời gian 24÷48 giờ. Quan sát và ghi nhận các ống có sinh khí và đục (kết quả dương tính).

- Cấy chuyển:

Dùng que cấy vòng chuyển mẫu từ các ống nghiệm dương tính sang các ống nghiệm có chứa môi trường BGBL 2%. Để các ống đã cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 48 giờ. Với mỗi độ pha loãng, tính tổng số ống có sinh khí và đục (có kết quả dương tính).

4.3.1.4. Tính kết quả

Dựa vào số ống có kết quả dương tính của mỗi độ pha loãng, xác định số đặc trưng và chỉ số MPN, từ đó tính được mật độ *Coliforms* có trong mẫu kiểm nghiệm.

Bảng 3. 1. Bảng tra Mac Crady dùng cho loạt 3 ống nghiệm ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp

Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml
Số ml mẫu sử dụng				Số ml mẫu sử dụng				Số ml mẫu sử dụng			
10	1	10^{-1}		10	1	10^{-1}		10	1	10^{-1}	
0	0	0	-	1	1	2	15	2	3	0	29
0	0	1	3	1	1	3	19	2	3	1	36
0	0	2	6	1	2	0	11	2	3	2	44
0	0	3	9	1	2	1	15	2	3	3	53
0	1	0	3	1	2	2	20	3	0	0	23
0	1	1	6	1	2	3	24	3	0	1	39
0	1	2	9	1	3	0	16	3	0	2	64
0	1	3	12	1	3	1	20	3	0	3	95
0	2	0	6	1	3	2	24	3	1	0	43
0	2	1	9	1	3	3	29	3	1	1	75
0	2	2	12	2	0	0	9	3	1	2	120
0	2	3	16	2	0	1	14	3	1	3	160
0	3	0	9	2	0	2	20	3	2	0	93
0	3	1	13	2	0	3	26	3	2	1	150
0	3	2	16	2	1	0	15	3	2	2	210
0	3	3	19	2	1	1	20	3	2	3	290
1	0	0	4	2	1	2	27	3	3	0	240
1	0	1	7	2	1	3	34	3	3	1	460
1	0	2	11	2	2	0	21	3	3	2	1100
1	0	3	15	2	2	1	28	3	3	3	-
1	1	0	7	2	2	2	35				
1	1	1	11	2	2	3	42				

7.3.2. Phương pháp đếm khuẩn lạc

4.3.2.1. Nguyên tắc

Mẫu đã được đồng nhất hóa được cấy một lượng nhất định lên môi trường thạch chọn lọc thích hợp có chứa lactose. Đếm số khuẩn lạc có màu đỏ đến đỏ đậm, đường kính lớn hơn 0,5mm, xung quang có vùng tủa của muối mật, lên men lactose và sinh acid trên môi trường VBRL. Việc khẳng định được thực hiện nuôi cấy trên môi trường BGBL.

4.3.2.2. Môi trường

- Môi trường TSA (Trypticase Soy Agar)

+ Trypticase peptone	15g
+ Phytone peptone	5g
+ NaCl	5g
+ Agar	15g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C trong 15 phút, pH cuối = 7,3±0,2.

- Môi trường VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar)

+ Peptone	7g
+ Lactose	10g
+ NaCl	5g
+ Cao nấm men	3g
+ Muối mật	1,5g
+ Đỏ trung tính	0,03g
+ Tím tinh thể	0,002g
+ Agar	15g
+ Nước cất	đủ 1000ml

pH = 7,4±0,2. Đun sôi trong 2 phút, không hấp khử trùng.

- Môi trường Endo

+ Peptone	10g
+ Lactose	10g
+ NaCl	5g
+ Sulphitee natri	3,3g
+ Fuchsin basic	0,3g
+ Cao thịt	10g
+ Agar	15g
+ Nước cất	đủ 1000ml

pH = 7,2. Hấp ở nhiệt độ 121⁰C trong 15 phút.

- Môi trường EMB

+ Peptone	10g
+ Lactose	10g
+ K ₂ HPO ₄	2g

+ Nước cất	đủ 1000ml
- Môi trường Istrati	
- Môi trường BGBL 2% (Brilliant Green Bile Lactose Broth)	
+ Tryptone	20g
+ NaCl	5g
+ Lactose	5g
+ Sulphate lauryl	0,1g
+ K ₂ HPO ₄	2,75g
+ KH ₂ PO ₄	2,75g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Hòa tan peptone và lactose vào trong 500ml, mật bò khô vào 200ml và Brilliant Green vào trong 100ml nước cất. Trộn đều 3 dung dịch trên và thêm nước cất cho đủ 1000ml. Môi trường được phân phối vào các ống nghiệm chứa ống Durham úp ngược, hấp khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút, pH cuối = 6,8 ở nhiệt độ 25⁰C, chỉ sử dụng các ống nghiệm không có bọt khí bên trong ống Durham.

4.3.2.3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu: đến nồng độ pha loãng phù hợp.
- Gieo cấy:

Cấy 1ml mẫu đã pha loãng vào các đĩa petri. Bổ sung vào mỗi đĩa khoảng 5ml môi trường TSA. Lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng 1÷2 giờ. Bổ sung vào mỗi đĩa 10÷15ml môi trường VRBL. Nuôi ủ ở 37⁰C±1⁰C trong thời gian 24÷48 giờ. Thực hiện ở 2 nồng độ mẫu pha loãng liên tiếp nhau, mỗi độ pha loãng làm 2÷3 đĩa lặp lại. Ngoài môi trường VRBL có thể thực hiện nuôi cấy trên các môi trường khác như Endo, EMB và Istrati.

- Thử nghiệm khẳng định:

Chọn ít nhất 5 khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường nuôi cấy cấy chuyển sang môi trường BGBL. Nuôi ủ ở 37⁰C±1⁰C trong thời gian 24÷48 giờ.

- Quan sát và ghi nhận:

Hiện tượng (+): môi trường BGBL bị đục và sinh hơi trong ống Durham.

4.3.2.4. Tính kết quả

Các khuẩn lạc đặc trưng theo môi trường nuôi cấy:

- Có màu hồng đến màu đỏ, có ánh kim (hoặc không) trên môi trường Endo.
- Có màu đỏ đến đỏ đậm, đường kính lớn hơn 0,5 mm, xung quang có vùng tủa của muối mật trên môi trường VRBL.
- Có màu xanh ánh kim trên môi trường EMB.
- Có màu vàng trên môi trường Istrati.

Số lượng *Coliforms* có trong 1ml (1g) mẫu được tính bằng (CFU/ml, CFU/g) theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot f_1 \cdot v} \cdot R$$

Trong đó:

R: Tỷ lệ khẳng định (tỷ số của số khuẩn lạc cho kết quả (+) / số khuẩn lạc được dùng trong thử nghiệm khẳng định)

4.4. Xác định *E. Coli*

4.4.1. Phương pháp MPN

4.4.1.1. Nguyên tắc

Mẫu được pha loãng ít nhất ở ba nồng độ pha loãng liên tiếp nhau và mỗi độ pha loãng được cấy trong 3 (hoặc 5) ống nghiệm lặp lại có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc LSB. Sau thời gian nuôi cấy, quan sát và ghi nhận các ống (+) và cấy tiếp sang môi trường lỏng chọn lọc EC. Từ các ống nghiệm có phản ứng (+) cấy sang các đĩa môi trường EMB. Kiểm tra thử nghiệm phản ứng sinh hóa IMViC. Đếm số ống nghiệm nuôi cấy trên môi trường EC (+) ứng với các ống có IMViC (++--), tra bảng Mac Grady để suy ra số lượng *E.coli* hiện diện trong mẫu kiểm nghiệm.

4.4.1.2. Môi trường và thuốc thử

- Môi trường canh thang LSB (Lauryl Sulphate Broth)

- Môi trường EC

+ Tryptone	20g
+ NaCl	5g
+ Lactose	5g
+ Muối mật số 3	1,5g
+ K ₂ HPO ₄	4g
+ KH ₂ PO ₄	1,5g
+ Nước cất	đủ 1000ml

pH cuối = 6,8 ở nhiệt độ 25⁰C. Khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C trong 15 phút

- Môi trường EMB

- Môi trường Simmon Citrate Agar (SC Agar)

+ Sodium citrate	2g
+ NaCl	5g
+ MgSO ₄	0,2g
+ K ₂ HPO ₄	1g
+ NH ₄ H ₂ PO ₄	1g
+ Bromotymol xanh	0,08g
+ Agar	15g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Đun nóng nhẹ và thỉnh thoảng lắc. Đun sôi 1-2 phút cho đến khi hòa tan. Phân phối vào 1/3 ống nghiệm có nắp 13x100 hoặc 16x150mm. Hấp ở 121⁰C, 15 phút. Đặt nghiêng ống nghiệm.

- Môi trường MR-VP

* **Môi trường 1:**

+ Buffered peptone water powder (Difco hoặc BBL)7g

+ Glucose	5g
+ K ₂ HPO ₄	5g
+ Nước cất	đủ 1000ml

*** Môi trường 2:**

+ Casein Pancreatic Digest	3,5g
+ Peptis digest of animal tissue	3,5g
+ Phosphate potassium	5g
+ Dextrose	5g
+ Nước cất	1000ml

Hòa tan các thành phần trong nước cất, có thể đun nóng nhẹ. Phân phối 10ml vào các ống nghiệm 16x150m. Hấp ở 118-121⁰C, 15 phút. pH cuối = 6,9±0,2.

*** Môi trường 3:**

+ Glucose	5g
+ Peptone	5g
+ Phosphate buffer	5g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Hòa tan các thành phần trong nước cất. Phân phối 10ml vào các ống nghiệm 16x150m. Hấp ở 121⁰C, 15 phút. pH = 7,5±0,2.

- Môi trường canh Tryptone Broth

+ Tryptone hoặc trypticase	10g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C trong 15 phút. pH cuối = 6,9

- Thuốc thử Kovac's

+ p-Dimethylaminobenzaldehyde (p-DMABA)	10g
+ Amyl (isoamyl, buthyl alcohol)	150ml
+ HCl đậm đặc	40ml

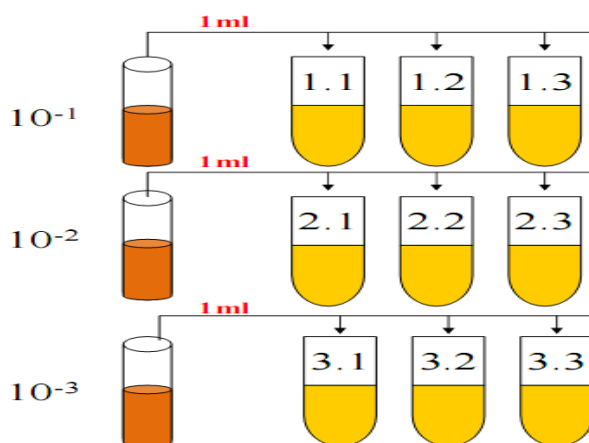
Bảo quản ở 4⁰C. Để hòa tan aldehyde cần đun nhẹ (50÷60⁰C) trên bếp cách thủy.

4.4.1.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu pha loãng: nồng độ pha loãng 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³

- Gieo cấy vào môi trường tăng sinh chọn lọc LSB:

Cấy 1ml mẫu đã pha loãng ở các nồng độ 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ vào các ống nghiệm có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc LSB, mỗi độ pha loãng làm 3 ống nghiệm lặp lại. Nuôi ủ ở 37±1⁰C, 48 giờ. Ghi nhận các ống LSB (+) (sinh khí, đục) ở mỗi nồng độ pha loãng.



Hình 3.16. Cấy mẫu lên môi trường tăng sinh chọn lọc

- Cấy chuyển vào môi trường lỏng chọn lọc EC:

Dùng que cấy vòng chuyển mẫu từ các ống nghiệm LSB (+) sang các ống môi trường EC. Để các ống đã cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 giờ. Với mỗi độ pha loãng, tính tổng số ống (+) có sinh khí và đục.

- Phép thử khẳng định:

+ Kiểm tra hình thái:

Nhuộm Gram, soi kính để xác định Gram (-), trực khuẩn nhỏ dài.

Từ ống canh trường EC (+) cấy ria sang môi trường EMB đặt trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ. Nếu phát hiện thấy những khuẩn lạc tròn, dẹt, đỏ ánh kim (hay không có ánh kim), cấy tiếp sang môi trường thạch thường để thực hiện phản ứng IMViC (các phản ứng này thực hiện độc lập nhưng đồng thời).

+ Thử nghiệm sinh hóa IMViC: Thử nghiệm Indol, Methyl Red (MR), Voges Proskauer (VP), Citrate.

Dùng que cấy chuyển các khuẩn lạc điển hình trên môi trường EMB (+) sang các ống nghiệm có chứa Tryptone, MR-VP, SC Agar. Để các ống đã cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 giờ.

Phản ứng citrate: Cấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ từ thạch thường vào môi trường Simmons Citrate. Nuôi ở tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Phản ứng dương khi môi trường đổi sang màu xanh dương.

4.4.1.4. Tính kết quả

Với mỗi độ pha loãng, đếm số lượng ống EC (+) và IMViC (++--) (Indol (+), MR (+), VP (-), Citrate (-)), xác định chỉ số MPN, từ đó tính được mật độ *E.Coli* trong mẫu kiểm nghiệm.

Bảng 3. 2. Bảng tra Mac Crady dùng cho loạt 5 ống nghiệm ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp

Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml
Số ml mẫu sử dụng				Số ml mẫu sử dụng				Số ml mẫu sử dụng			
10	1	10 ⁻¹		10	1	10 ⁻¹		10	1	10 ⁻¹	
0	0	0	0	2	3	1	14	4	4	0	35
0	0	1	2	2	4	0	15	4	4	1	40
0	0	2	4	3	0	0	8	4	4	2	45
0	1	0	2	3	0	1	11	4	5	0	40
0	1	1	4	3	0	2	13	4	5	1	50
0	1	2	6	3	1	0	11	4	5	2	55
0	2	0	4	3	1	1	14	5	0	0	25
0	2	1	6	3	1	2	17	5	0	1	30
0	3	0	6	3	1	3	20	5	0	2	45
1	0	0	2	3	2	0	14	5	0	3	60
1	0	1	4	3	2	1	17	5	0	4	75
1	0	2	6	3	2	2	20	5	1	0	35
1	0	3	8	3	3	0	17	5	1	1	45
1	1	0	4	3	3	1	20	5	1	2	65
1	1	1	6	3	4	0	20	5	1	3	85
1	1	2	8	3	4	1	25	5	1	4	115
1	2	0	6	3	5	0	25	5	2	0	50
1	2	1	8	4	0	0	13	5	2	1	70
1	2	2	10	4	0	1	17	5	2	2	95
1	3	0	8	4	0	2	20	5	2	3	120
1	3	1	10	4	0	3	25	5	2	4	150
1	4	0	11	4	1	0	17	5	2	5	175
2	0	0	5	4	1	1	20	5	3	0	80
2	0	1	7	4	1	2	25	5	3	1	110
2	1	1	9	4	2	0	20	5	3	2	140
2	1	2	12	4	2	1	25	5	3	3	175
2	2	0	9	4	2	2	30	5	3	4	200
2	2	1	12	4	3	0	25	5	3	5	250
2	2	2	14	4	3	1	35	5	4	0	130
2	3	0	12	4	3	2	40	5	4	1	170

Bảng 3.3. Bảng tra Mac Crady dùng cho loạt 5 ống nghiệm ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp

Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml	Số lượng ống dương tính			Số MPN/100ml
Số ml mẫu sử dụng				Số ml mẫu sử dụng				Số ml mẫu sử dụng			
10	1	10 ⁻¹		10	1	10 ⁻¹		10	1	10 ⁻¹	
5	4	2	225	5	5	0	250	5	5	4	1600
5	4	3	275	5	5	1	350	5	5	5	1800
5	4	4	350	5	5	2	550				
5	4	5	425	5	5	3	900				

4.4.2. Phương pháp đếm khuẩn lạc

4.4.2.1. Nguyên tắc

Mẫu đã được đồng nhất hóa được cấy một lượng nhất định lên môi trường thạch chọn lọc thích hợp có chứa lactose. Các khuẩn lạc có hình dạng đặc trưng của *Coliforms*. Khẳng định các khuẩn lạc đã đếm là *E.coli* bằng các thử nghiệm sinh hóa IMViC.

4.4.2.2. Môi trường và thuốc thử

- Môi trường TSA (Trypticase Soy Agar)

+ Trypticase peptone	15g
+ Phytone peptone	5g
+ NaCl	5g
+ Agar	15g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C trong 15 phút, pH cuối = 7,3±0,2.

- Môi trường VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar)

Môi trường EC

- Môi trường Simmon Citrate Agar (SC Agar)

- Môi trường MR-VP

- Môi trường canh Tryptone Broth

- Thuốc thử Kovac's

4.4.2.3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu: đến nồng độ pha loãng phù hợp.

- Gieo cấy:

Cấy 1ml mẫu đã pha loãng vào các đĩa petri. Bổ sung vào mỗi đĩa khoảng 5ml môi trường TSA. Lắc đều, để yên ở nhiệt độ phòng 1÷2 giờ. Bổ sung vào mỗi đĩa 10÷15ml môi trường VRBL. Nuôi ủ ở 37⁰C±1⁰C trong thời gian 24÷48 giờ. Thực hiện ở 2 nồng độ mẫu pha loãng liên tiếp nhau, mỗi độ pha loãng làm 2÷3 đĩa lặp lại.

Ngoài môi trường VRBL có thể thực hiện nuôi cấy trên các môi trường khác như Endo, EMB và Istrati.

- Cây chuyên vào môi trường lỏng chọn lọc EC:

Chọn ít nhất 5 khuẩn lạc đặc trưng (màu đỏ đến đỏ đậm, đường kính lớn hơn 0,5 mm, xung quang có vùng tủa của muối mật) trên môi trường VRBL cấy chuyên sang môi trường EC. Nuôi ở $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24÷48 giờ. Với mỗi độ pha loãng, tính tổng số ống (+) có sinh khí và đục.

- Phép thử khẳng định:

+ Nhuộm Gram: gram (-), trực khuẩn nhỏ dài.

Từ ống canh trường EC (+) cấy tiếp sang môi trường thạch thường để thực hiện phản ứng IMViC (các phản ứng này thực hiện độc lập nhưng đồng thời).

+ Thử nghiệm sinh hóa IMViC: Thử nghiệm Indol, Methyl Red (MR), Voges Proskauer (VP), Citrate.

Dùng que cấy chuyên các khuẩn lạc điển hình trên môi trường EMB (+) sang các ống nghiệm có chứa Tryptone, MR-VP, SC Agar. Để các ống đã cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 24 giờ.

Phản ứng citrate: Cấy chuyên vi khuẩn nghi ngờ từ thạch thường vào môi trường Simmons Citrate. Nuôi ở tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Phản ứng dương khi môi trường đổi sang màu xanh dương.

4.4.2.4. Tính kết quả

Cách tính kết quả tương tự như cách tính kết quả của *Coliforms*

Xác định có *E.Coli* gây bệnh khi phát hiện trực khuẩn gram (-) với các đặc tính sinh hóa theo bảng sau:

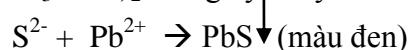
Bảng 3.4. Đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *E.coli*

	Indol	MR	VB	Citrate
E. Coli loại I	+	+	-	-
E. Coli loại II	-	+	-	-

4.5. Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí sinh H_2S

4.5.1. Nguyên tắc

Vi khuẩn hiếu khí chuyển hóa SO_3^{2-} trong môi trường thành S^{2-} (H_2S). Khí H_2S sinh ra bám vào giấy thử có tấm $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ làm giấy chuyển sang màu đen do phản ứng:



4.5.2. Môi trường và hóa chất

- Môi trường nước peptone

- Dung dịch Na_2SO_3 25%

Mỗi ống môi trường bổ sung 5ml môi trường nước peptone, 2ml dung dịch Na_2SO_3 25%.

- Giấy có tấm $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

4.5.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Tùy theo mức độ nhiễm bản của mẫu mà pha loãng đến nồng độ phù hợp (thông thường là 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).

- Gieo cấy:

Cấy 1ml mẫu ở các nồng độ mẫu pha loãng vào ống môi trường peptone. Lặp lại 3 ống (hoặc 5 ống) cho mỗi nồng độ pha loãng.

Trên mỗi ống đều treo một mảnh giấy tẩm $Pb(CH_3COO)_2$. $Pb(CH_3COO)_2$ có tính độc đối với vi khuẩn, vì vậy không nên để giấy chạm vào dịch nuôi.

Đề ở $37^\circ C$ trong 24÷48 giờ, nếu có vi khuẩn hiếu khí sinh H_2S thì giấy tẩm $Pb(CH_3COO)_2$ hóa đen.

4.5.4. Tính kết quả

Ghi nhận số ống (+) ứng với mỗi nồng độ pha loãng. Tra bảng MPN để suy ra mật độ tổng số vi khuẩn có trong mẫu.

4.6. Xác định tổng số vi khuẩn kỵ khí sinh H_2S

4.6.1. Nguyên tắc

Dựa trên tính chất của các vi khuẩn này là khi nuôi cấy trong môi trường chọn lọc (môi trường thạch Tryptone Sulphite Cycloserin hoặc Winson Blair) ở điều kiện kỵ khí, các vi khuẩn này có khả năng phân giải SO_3^{2-} thành S^{2-} làm cho khuẩn lạc có màu đen, tròn, to, đường kính 3÷4mm.

4.6.2. Môi trường, dịch pha loãng

- Môi trường thạch Tryptone Sulphite Cycloserin

+ Tryptone (peptone)	5g
+ Soytone	5g
+ Cao nấm men	5g
+ Metabisulphate natri	1g
+ Amoni citrate sắt	1g
+ Agar	20g
+ Nước cất	đủ 1000ml

Khử trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong 15 phút. pH cuối = 7,6.

- Môi trường Winson Blair

+ Peptone	5g
+ Glucose	20g
+ Cao nấm men	2,5g
+ Cao thịt	1g
+ Agar	20g
+ Na_2SO_3	20%
+ $NH_4Fe(SO_4)_2$ (hoặc $FeSO_4.7H_2O$)	5%
+ Nước cất	đủ 1000ml

Chuẩn bị môi trường gồm các chất nói trên, hòa tan vào trong nước. Phân phối vào ống nghiệm. Khử trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong 15 phút. Khi sử dụng thì đem các ống môi trường đun cho tan chảy, bổ sung vào mỗi ống 2ml Na_2SO_3 20% và 5 giọt dung dịch $NH_4Fe(SO_4)_2$ 5%.

- Dung dịch Na_2SO_3 20%
- Dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 5%
- Dung dịch pha loãng: dung dịch muối peptone
- Môi trường sữa

4.6.3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Tùy theo mức độ nhiễm bẩn của mẫu mà pha loãng đến nồng độ phù hợp.

- Gieo cấy:

Hút 1 ml dung dịch mẫu vào ống nghiệm có chứa sẵn 2ml dung dịch Na_2SO_3 20% và 5 giọt $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 5%. Sau đó đổ môi trường thạch Wilson Blair đã đun tan chảy và làm nguội đến $45-50^\circ\text{C}$ vào khoảng 2/3 ống nghiệm. Cho một giọt parafin lỏng trên mặt thạch ống nghiệm đã cấy mẫu.

Đun cách thủy $75-80^\circ\text{C}$ trong 10÷15 phút. Làm đông ngay bằng cách để vào tủ lạnh, dưới vòi nước chảy hoặc ngâm vào nước lạnh.

Nuôi ủ ở tủ ấm 37°C trong 24÷72 giờ.

Sau thời gian nuôi cấy, nếu có những khuẩn lạc đen, to bằng đầu đĩa, mọc cách mặt thạch 2÷3cm, tiến hành nhuộm gram soi kính hiển vi, tìm trực khuẩn gram (+).

- Thử nghiệm tính chất làm đông sữa:

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 1-2 ml dầu parafin. Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào môi trường trên, chú ý không để bọt khí từ pipet vào môi trường. Đặt ở tủ ấm 37°C trong 24÷48 giờ. Quan sát hiện tượng đông tụ sữa.

Chú ý: Phải đếm ngay sau khi khuẩn lạc mọc lên vì để lâu vi khuẩn sinh hơi nhiều làm rạn nứt môi trường và mọc lan không đếm được.

4.6.4. Tính kết quả

Xác định có vi khuẩn kỵ khí sinh H_2S khi phát hiện có trực khuẩn gram (+) và các tính chất sau:

- Có khuẩn lạc đặc trưng trong thạch Wilson Blair
- Có khả năng sinh H_2S
- Làm sữa đông tụ.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu 1. Hãy kể tên các phương pháp khử trùng dụng cụ và ứng dụng của mỗi phương pháp?

Câu 2. Hãy nêu các bước tiến hành làm môi trường dinh dưỡng nuôi cấy vi sinh vật? Môi trường sau khi chuẩn bị chưa sử dụng ngay cần bảo quản như thế nào?

Câu 3. Pha loãng mẫu thập phân là gì? Hãy nêu cách tiến hành pha loãng mẫu thập phân đến nồng độ 10^{-5} ?

Câu 4. Hãy nêu các phương pháp cấy mẫu lên môi trường dinh dưỡng? Phương pháp nào được sử dụng trong định lượng vi sinh vật?

Câu 5. So sánh phương pháp đổ đĩa đếm khuẩn lạc và phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất MPN được sử dụng trong định lượng vi sinh vật?

C. Ghi nhớ

1. Quy trình chung phân tích một chỉ tiêu vi sinh
2. Cách tiến hành các bước trong quy trình chung phân tích vi sinh
3. Nguyên tắc, tiến hành và tính kết quả của các phương pháp định tính vi sinh vật
4. Nguyên tắc, tiến hành và tính kết quả các phương pháp định lượng vi sinh vật

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔN HỌC

I. Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học

- *Vị trí*: Phương pháp phân tích lương thực thực phẩm (LTTP) là môn học chuyên môn của nghề Kiểm nghiệm chất lượng lương thực thực phẩm, được bố trí sau các môn học/ mô đun cơ sở, trước hoặc song song các môn học/ mô đun chuyên môn khác.

- *Tính chất*: Là môn học lý thuyết trang bị các kiến thức về các phương pháp phân tích cơ sở để phân tích các chỉ tiêu cảm quan, lý hóa và vi sinh của lương thực thực phẩm. Do đó, cần được tổ chức giảng dạy tại lớp học có đầy đủ điều kiện cần thiết như bảng, phấn, máy chiếu, các băng đĩa, video phục vụ cho môn học. Môn học được bố trí 60 giờ tại phòng lý thuyết.

- *Ý nghĩa và vai trò của môn học*: Môn học giúp sinh viên có các kiến thức về các phương pháp phân tích các chỉ tiêu cảm quan lý hóa và vi sinh của lương thực thực phẩm. Từ đó có kỹ năng lựa chọn được các phương pháp phân tích các chỉ tiêu phù hợp với từng loại lương thực thực phẩm.

II. Mục tiêu của môn học

- Về kiến thức
 - + Trình bày được các phép thử cảm quan và kỹ thuật chung đánh giá các chỉ tiêu cảm quan của LTTP;
 - + Nêu được các yêu cầu cần thiết trong đánh giá cảm quan;
 - + Trình bày được các bước trong qui trình chung phân tích một chỉ tiêu vi sinh; các phương pháp định tính, định lượng vi sinh vật;
 - + Mô tả được nguyên tắc, qui trình phân tích, tính kết quả của các chỉ tiêu lý hóa, vi sinh của các loại LTTP;
- Về kỹ năng:
 - + Lựa chọn được phép thử cảm quan phù hợp với mục đích phân tích, đánh giá;
 - + Lựa chọn được phương pháp phân tích lý hóa, vi sinh phù hợp cho từng chỉ tiêu chất lượng, loại LTTP;
 - + Tham gia thảo luận, làm việc theo nhóm, trình bày vấn đề.
- Về năng lực tự chủ và trách nhiệm
 - + Nhận thức được tầm quan trọng của môn học đối với quá trình tích lũy kiến thức và kỹ năng làm việc sau này;
 - + Có ý thức học tập chăm chỉ; sẵn sàng hợp tác và chia sẻ với các thành viên khi làm việc nhóm;
 - + Rèn tính trung thực, nghiêm túc, có trách nhiệm trong công việc, có ý thức bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

III. Tài liệu tham khảo

- [1]. GS.TS. Nguyễn Thị Hiền (chủ biên) và cộng sự, *Phân tích thực phẩm*, Nhà xuất bản Lao động Hà Nội, (2010).
- [2]. PGS.TS. Lê Thanh Mai (chủ biên) và cộng sự, *Các phương pháp phân tích ngành Công nghệ lên men*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, (2005).
- [3] Trần Linh Thuộc, *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, Nhà xuất bản Giáo dục, (2009).
- [4]. GS.TS. Phạm Xuân Vượng, *Giáo trình kiểm tra chất lượng thực phẩm*, Sở Giáo dục và Đào tạo Hà Nội, NXB Hà Nội, (2007).
- [5]. TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật đổ đĩa*
- [6]. TCVN 4884-2:2015 (ISO 4833-2:2013), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 2: Đếm khuẩn lạc ở 30°C bằng kỹ thuật cấy bề mặt*.
- [7]. TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*
- [8]. TCVN 4882:2007 (ISO 4831:2006), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Coliform – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
- [9]. TCVN 6846:2007 (ISO 7251:2005), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng E.coli giả định – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
- [10]. Chương trình khung trình độ Trung cấp nghề, Cao đẳng nghề Kiểm nghiệm Chất lượng lương thực thực phẩm năm 2017
- [11]. Các Tiêu chuẩn Việt Nam hiện hành khác về phân tích chỉ tiêu vi sinh lương thực thực phẩm.