

SINH PHẨM

BACILLUS CLAUSII  
Bacillus clausii

Định nghĩa

*Bacillus clausii* là vi khuẩn ưa kiềm, Gram dương, hình que, sinh bào tử, di động, hiếu khí tùy ý. *Bacillus clausii* được sản xuất dưới dạng nguyên liệu chứa bào tử chủng *Bacillus clausii* thuần chủng, được sản xuất bằng phương pháp phun sấy khô. Các tá dược như chất độn hay chất pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành phải có số lượng vi khuẩn sống *Bacillus clausii* không ít hơn 100% so với lượng ghi trên nhãn.  
Chủng UBBC07: *Bacillus clausii* UBBC07 là chủng vi khuẩn đặc trưng, thuần chủng thuộc loài *Bacillus clausii*.  
Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng đối với chủng *Bacillus clausii* UBBC07.

Định tính

A. Định tính bằng kính hiển vi  
Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Định lượng và nhuộm soi dưới kính hiển vi.  
Tiêu chuẩn: Tế bào sinh dưỡng hình que. Bào tử hình bầu dục có thể xuất hiện ở cuối tế bào sinh dưỡng tùy thuộc vào điều kiện sinh trưởng.  
B. Định tính bằng phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic  
Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TBE 0,5X, dung dịch đệm TE 1X, dung dịch đệm TAE 1X: Xem phụ lục 1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.  
Dung dịch mẫu DNA: Lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch BHI thu được trong mục Định lượng. Lấy 2 ml dung dịch đệm TE 1X (TT) cho vào ống ly tâm. Dùng que cấy vô khuẩn, cẩn thận lấy các tế bào ra khỏi

thạch (chọn 1 khuẩn lạc lớn mọc trên bề mặt, hoặc 2 đến 3 khuẩn lạc nhỏ, trung bình hoặc kéo dài thời gian ủ thêm vài giờ để tạo ra các khuẩn lạc lớn trên bề mặt thạch), và phân tán tế bào trong ống ly tâm có chứa dung dịch đệm TE 1X (TT). Có thể tiến hành tách chiết DNA bằng phương pháp tách chiết DNA trực tiếp hoặc sử dụng bộ kit tách chiết DNA vi khuẩn phù hợp. Trước khi tiến hành thử nghiệm, pha loãng dung dịch DNA sau tách chiết bằng nước vô khuẩn hoặc dung dịch pha loãng DNA tương đương để thu được dung dịch mẫu DNA chứa 50 ng đến 90 ng DNA/μL.

Cặp môi: Xem Bảng 1.  
Dung dịch môi: Pha môi đến nồng độ 10 μM bằng nước vô khuẩn và bảo quản ở nhiệt độ từ -20 °C đến -80 °C.  
Mẫu thử: Đối với mỗi cặp môi đặc hiệu, chuẩn bị dung dịch chứa 10 μL PCR master mix<sup>1</sup>, 1 μL dung dịch môi xuôi (10 μM), 1 μL dung dịch môi ngược (10 μM), 7 μL nước vô khuẩn và 1 μL dung dịch mẫu DNA (khoảng 50 ng đến 90 ng), hoặc pha theo khuyến cáo của master mix thương mại khác được sử dụng.  
Mẫu chứng âm: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 μL dung dịch DNA mẫu bằng 1 μL nước vô khuẩn hoặc dung dịch pha loãng DNA tương đương.  
Mẫu chứng dương: tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 μL dung dịch mẫu DNA bằng 1 μL dung dịch DNA của chủng đối chiếu *Bacillus clausii* UBBC07 hoặc thay cặp môi đặc hiệu cho chủng UBBC07 bằng cặp môi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus clausii*.  
Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương bằng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp.  
Chu trình nhiệt: Bước 1: ủ ở 98 °C trong 30 s; Bước 2: ủ ở 98 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở nhiệt độ bắt cặp của cặp môi đặc hiệu trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 đến 4 trong 30 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C. Chu trình nhiệt trong nhân bản DNA có thể được thực hiện theo quy trình master mix hoặc theo yêu cầu của enzym sử dụng. Điện di sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm. Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp môi đặc hiệu cho chủng *Bacillus clausii* UBBC07 bằng cặp môi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus clausii* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp môi được chọn.

Bảng 1 - Các cặp môi và Tiêu chuẩn chấp nhận

| Cặp môi | Trình tự môi                                         | Tiêu chuẩn chấp nhận*                                     |
|---------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| UBBC02  | Môi xuôi (5'-3') CAATTGTCGGTTCGTCCAT                 | Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 516 cặp base |
|         | Môi ngược (5'-3') GATGTGTATGAATAGTGTATGGAGAGTGAGA    |                                                           |
|         | Nhiệt độ bắt cặp của cặp môi: 64,0 °C                |                                                           |
| UBBC03  | Môi xuôi (5'-3') ATTTGATGACGACGATTATTATGCACCACTCTA   | Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 447 cặp base |
|         | Môi ngược (5'-3') AGACTTAGCTAGGGCTGGAAACCAATGCTTGGTA |                                                           |
|         | Nhiệt độ bắt cặp của cặp môi: 68,7 °C                |                                                           |

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



BACILLUS CLAUSII

Sử dụng gel agarose 1,5 % (w/v) trong dung dịch đệm TAE 1X (TT) hoặc trong dung dịch đệm TBE 0,5X (TT).

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

Thận trọng: Ethidium bromid (TT) là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến nên ở bước rửa gel bằng nước thì nước sau khi rửa phải thu hồi và xử lý theo hướng dẫn xử lý hóa chất độc hại. Sử dụng thiết bị bảo hộ cá nhân thích hợp (đeo găng tay nitril) khi tiếp xúc thuốc thử này. Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel phù hợp khác.

Sử dụng thang chuẩn DNA phù hợp để xác định kích thước của các sản phẩm khuếch đại (Bảng 1). Để thuận lợi cho việc so sánh kích thước các sản phẩm khuếch đại gen, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên bản gel. Có thể sử dụng hệ thống điện di tự động kèm bộ kit DNA (automated on-chip electrophoresis system) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại nào.

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

Tiêu chuẩn chấp nhận: Xem Bảng 1.

Định lượng

Dung dịch nước muối sinh lý: Chuẩn bị dung dịch natri clorid (TT) 0,9 % và điều chỉnh đến pH 7,0 bằng dung dịch acid lactic (TT). Tiệt khuẩn dung dịch trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch BHI (Brain heart infusion agar): Chuẩn bị môi trường có công thức ghi trong Bảng 2 hoặc sử dụng môi trường thương phẩm có sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 2 - Thành phần môi trường thạch BHI

| Thành phần                                    | Khối lượng (g) |
|-----------------------------------------------|----------------|
| Dịch chiết HM (Meat infusion)                 | 12,5           |
| Dịch chiết tim não BHI (Brain Heart Infusion) | 5,0            |
| Proteose pepton                               | 10,0           |
| Dextrose khan                                 | 2,0            |
| Natri clorid                                  | 5,0            |
| Dinatri phosphat khan                         | 1,3            |
| Thạch                                         | 15,0           |
| Môi trường sau khi pha có pH 7,4 ± 0,2        |                |

Hòa các thành phần trên trong 1 L nước trong bình nón hoặc cốc có dung tích phù hợp. Đun đến sôi, vừa đun vừa khuấy trên bếp nóng. Đun sôi trong 1 min để môi trường hòa tan hoàn toàn, có thể phân phối môi trường vào các bình có thể tích phù hợp, sau đó tiệt khuẩn môi trường trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Môi trường được giữ ổn nhiệt ở khoảng 45 °C trước khi sử dụng. Môi trường sau khi tiệt khuẩn nếu không sử dụng ngay có thể để nguội môi trường và bảo quản ở 2 °C đến 8 °C.

Hỗn dịch mẫu: Trong điều kiện vô khuẩn, cân 1,0 g mẫu probiotic vào bình thủy tinh dung tích 250 ml chứa 200 ml dung dịch nước muối sinh lý và lắc trộn bằng máy trộn đồng nhất mẫu ở tốc độ 12.000 - 16.000 rpm trong 3 min, thu được hỗn dịch mẫu có độ pha loãng  $0,5 \times 10^{-2}$ . Sử dụng các đầu pipet vô khuẩn có màng lọc, tiến hành pha loãng bằng cách lấy 1,0 ml hỗn dịch mẫu có độ pha loãng  $0,5 \times 10^{-2}$  vào các ống nghiệm vô khuẩn chứa 9,0 ml dung dịch nước muối sinh lý. Tiếp tục pha loãng như trên đến khi thu được hỗn dịch mẫu ở độ pha loãng cuối cùng dự kiến chứa 25 - 250 CFU/ml. Ủ ống nghiệm chứa hỗn dịch mẫu thử ở độ pha loãng cuối trong bể ổn nhiệt ở 75 °C trong 30 min, sau đó làm nguội ngay về nhiệt độ dưới 45 °C. Tiến hành trộn môi trường với hỗn dịch mẫu này trong 10 đến 20 min sau bước chuẩn bị hỗn dịch mẫu. Lắc đều ống nghiệm chứa hỗn dịch mẫu và bình môi trường trước khi tiến hành thử nghiệm.

Tiến hành: Trong điều kiện vô khuẩn, hút riêng biệt 1,0 ml hỗn dịch mẫu vào ba đĩa petri vô khuẩn kích thước 15 mm × 100 mm, được ghi nhãn thích hợp, sau đó đổ khoảng 15 ml đến 20 ml môi trường thạch BHI đã tan chảy và giữ ổn nhiệt ở khoảng 45 °C vào mỗi đĩa. Đậy nắp đĩa petri, sau đó xoay nhẹ các đĩa để trộn đều mẫu vào môi trường thạch. Chuẩn bị một đĩa mẫu trắng chỉ chứa môi trường thạch BHI và đĩa mẫu trắng thứ hai chứa 1,0 ml dung dịch nước muối sinh lý trộn với môi trường thạch BHI.

Đề yên các đĩa ở nhiệt độ phòng cho đến khi thạch đông, lật ngược đĩa và ủ các đĩa ở  $40 \pm 2$  °C trong 48 h. Sau thời gian ủ, đếm số lượng khuẩn lạc ở mỗi đĩa. Lựa chọn các đĩa có 25 đến 250 khuẩn lạc để tính kết quả. Tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc của các đĩa có cùng nồng độ pha loãng sau đó tính số khuẩn lạc theo đơn vị CFU/g. Các đĩa mẫu trắng không được xuất hiện khuẩn lạc nào. Giới hạn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống không ít hơn 100% so với lượng ghi trên nhãn. Số lượng vi khuẩn được ghi theo đơn vị CFU/g.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 5% (Phụ lục 9.6).  
(1 - 2 g, 100 °C, áp suất không quá 133,3 Pa, 4 h).

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

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



### **Vì sinh vật gây bệnh**

*Escherichia coli*, *Salmonella* sp.: Không được có trong 10 g (Phụ lục 13.6).

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

### **Đóng gói và bảo quản**

Để nơi mát, khô ráo trong đồ đựng kín.

### **Ghi nhãn**

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

#### *Ghi chú*

<sup>1</sup> Dream Taq Green PCR Master mix (2X) của hãng Thermo Fisher ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)), hoặc tương đương.

## **BACILLUS COAGULANS**

### ***Bacillus coagulans***

### **Định nghĩa**

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

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

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

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

### **Định tính**

A. Định tính bằng kính hiển vi.

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

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

B. Định tính bằng phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic.

Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TAE 1X: Xem Phụ lục

1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.

**Thuốc thử pha mẫu:** Sử dụng thuốc thử PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent<sup>1</sup>. Có thể sử dụng phương pháp chiết DNA trực tiếp hoặc bộ kit tách chiết DNA vi khuẩn phù hợp khác.

**Dung dịch mẫu DNA:** Lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch BC cao nấm men glucose (Glucose Yeast Extract BC agar) thu được trong mục Định lượng.

Lấy 100 µl thuốc thử pha mẫu vào ống ly tâm 2,0 ml có nắp vặn. (Lưu ý: Quá trình lấy thuốc thử pha mẫu được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Dùng que cấy vô khuẩn lấy các tế bào từ một khuẩn lạc bề mặt và phân tán vào thuốc thử pha mẫu trong ống. Đậy nắp ống và trộn đều bằng máy lắc xoay trong 10 đến 30 s hoặc cho đến khi tế bào phân tán thành hỗn dịch đồng nhất trong thuốc thử pha mẫu. Ủ hỗn dịch trong bể ổn nhiệt ở 100 °C trong 10 min, sau đó ly tâm hỗn dịch trên ở 16.000 × g trong 3 min. Chuyển phần dịch nổi phía trên sang một ống ly tâm mới. Dung dịch này chứa DNA của *Bacillus coagulans*. Trước khi tiến hành thử nghiệm, pha loãng dung dịch DNA sau tách chiết bằng nước vô khuẩn để thu được dung dịch mẫu DNA có nồng độ như yêu cầu trong Bảng 2.

**Cập môi:** Xem Bảng 1.

**Dung dịch môi<sup>\*\*</sup>:**

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

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

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

Với mỗi cặp môi đặc hiệu, tiến hành phản ứng PCR với các mẫu thử bằng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp hoặc theo khuyến cáo của master mix thương mại sử dụng.

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

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

**Tiến hành:** Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương với chu trình nhiệt mô tả như Bảng 2. Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp môi đặc hiệu cho chủng *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086/Unique IS-2 bằng cặp môi đặc hiệu chung cho loài *Bacillus coagulans* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp môi được chọn.