

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10022:2013

ISO 23058:2006

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – RENNET CỪU VÀ RENNET DÊ –
XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ ĐÔNG TỤ SỮA TỔNG SỐ**

*Milk and milk products – Ovine and caprine rennets –
Determination of total milk-clotting activity*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 10022:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 23508:2006;

TCVN 10022:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Rennet từ động vật bao gồm tất cả các sản phẩm làm đông tụ sữa thu được từ động vật nhai lại, nhưng cho đến nay chỉ rennet bò có đặc tính riêng được mô tả theo tiêu chuẩn ISO/IDF về thành phần và hoạt độ đông tụ sữa. Hiện nay trên thị trường có cả rennet cừu và rennet dê và tuân theo các quy định đối với rennet bò. Mỗi loại enzym này có đặc tính riêng về hoạt tính đông tụ sữa và đặc tính chế biến phomat có liên quan. Có một số điểm khác nhau về độ nhạy cảm nhiệt độ và độ nhạy cảm pH, đặc biệt là các đặc tính cảm quan của sản phẩm phomat. Một số nhà sản xuất ngày nay đã chế biến các loại rennet đặc thù này và các dạng sản phẩm khác nhau (dạng lỏng, dạng bột hoặc dạng sệt). Hiện vẫn chưa có các phương pháp chuẩn được công nhận ở cấp quốc tế để mô tả và phân biệt riêng các mẫu sản phẩm này.

Sữa và sản phẩm sữa – Rennet cừu và rennet dê – Xác định hoạt độ đông tụ sữa tổng số

*Milk and milk products – Ovine and caprine rennets –
Determination of total milk-clotting activity*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hoạt độ đông tụ sữa tổng số của rennet cừu hoặc rennet dê, bao gồm cả rennet dạng sệt chỉ chứa chymosin và pepsin như các enzym đông tụ hoạt động trên cơ chất sữa chuẩn được chuẩn bị với dung dịch chứa 0,5 g/l canxi clorua (pH ≈ 6,5).

Phương pháp này cho phép phân tích các rennet cừu và dê phù hợp với phép thử hoạt độ đông tụ sữa tương đối (REMCAT) đối với rennet bò trong ISO 11815.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 7151 (ISO 648), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức*.

TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*.

IDF 110B, *Calf rennet and adult bovine rennet – Determination of chymosin and bovine pepsin contents (chromatographic method) (Rennet bê và rennet bò – Xác định hàm lượng chymosin và pepsin bò (phương pháp sắc ký))*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số của cơ chất sữa chuẩn ở pH 6,5 [total milk-clotting activity of a standard milk substrate at pH 6,5]

Hoạt độ liên quan đến bột chất chuẩn đối chứng quốc tế của rennet bê và bột chất chuẩn đối chứng rennet bò.

CHÚ THÍCH 1 Đối với mẻ thứ nhất của cả bột chất chuẩn đối chứng rennet bê và bột chất chuẩn đối chứng rennet bò (cũng được dùng để phân tích rennet bê và rennet bò) hoạt độ này được xác định là 1000 đơn vị đông tụ sữa quốc tế trên gam (IMCU/g). Việc chuẩn bị các chất chuẩn đối chứng tiếp theo phải tương ứng với các chất chuẩn đối chứng trước đó.

CHÚ THÍCH 2 Hoạt độ đông tụ sữa tổng số của bột chất chuẩn làm đông tụ sữa từ vi sinh vật là khoảng 1000 IMCU/g, nhưng hoạt độ thực tế liên quan đến bột kiểm chứng quốc tế của rennet bò được ghi rõ trên ống thủy tinh.

CHÚ THÍCH 3 Hoạt độ (đông tụ sữa) phân giải protein tổng số của bột chất chuẩn đối chứng đông tụ sữa từ vi sinh vật, cứ đến năm thứ hai lại kiểm tra trên cơ chất hexapeptit tổng hợp do NIZO¹⁾ thực hiện.

4 Nguyên tắc

Xác định thời gian cần thiết để keo tụ cơ chất sữa chuẩn được chuẩn bị với dung dịch canxi clorua 0,5 g/l (pH ≈ 6,5). Thời gian đông tụ của mẫu rennet cừu (hoặc dê) được so sánh với thời gian đông tụ của chất chuẩn đối chứng rennet bò với thành phần enzym xác định là 75:25 và với hoạt độ đông tụ sữa đã biết.

Thời gian được đo tương ứng với chất chuẩn đối chứng có 75 % chymosin bê và 25 % pepsin bò vì thành phần của mẫu thử chưa biết và chất chuẩn đối chứng có tỷ lệ 75/25 cần bao trùm hầu hết các mẫu. Không cần thiết phải đo đúng tỷ lệ thành phần chymosin/pepsin của rennet cừu và dê vì thành phần của chúng thường giống tỷ lệ thành phần nói trên.

CHÚ THÍCH Thành phần của rennet cừu và dê dạng lỏng hoặc dạng bột có thể xác định được bằng IDF 110B, nhưng độ chính xác của các dạng rennet này chưa được đánh giá xác nhận.

5 Thuốc thử và vật liệu

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Dung dịch đệm, pH 5,5

Dùng pipet (6.1) lấy 10,0 ml axit axetic (CH₃COOH) 1 mol/l cho vào 10,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước (CH₃COONa.3H₂O) và trộn. Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml. Chỉnh pH đến 5,5, nếu cần.

¹⁾ Viện nghiên cứu Sữa của Hà lan (NIZO), PO Box 20, 6710 BA Ede, Hà Lan. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

5.2 Dung dịch gốc canxi clorua, $c(\text{CaCl}_2) = 500 \text{ g/l}$

Các dung dịch canxi clorua có nồng độ chính xác yêu cầu là 500 g/l canxi clorua và có tỷ trọng thực đã nêu có bán sẵn trong thương mại²⁾. Bảo quản các dung dịch này theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Trước khi sử dụng, đưa nhiệt độ của dung dịch gốc canxi clorua về nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 22 °C). Hàng năm kiểm tra nồng độ của dung dịch canxi clorua bằng chuẩn độ với EDTA (axit etylenđiamintetraaxetic).

5.3 Dung dịch làm việc canxi clorua, $c(\text{CaCl}_2) = 0,5 \text{ g/l}$

Sử dụng tỷ trọng của dung dịch gốc canxi clorua (5.2) tính khối lượng canxi clorua cần thiết để thu được lượng cuối cùng là canxi clorua 0,5 g/l trong dung dịch làm việc canxi clorua.

Khối lượng của dung dịch cần tương đương với lượng bổ sung 2,00 ml dung dịch gốc có nồng độ chính xác $c(\text{CaCl}_2) = 500 \text{ g/l}$; trong trường hợp này khối lượng dung dịch $\approx 2,70 \text{ g}$.

Nên cân dung dịch gốc canxi clorua (5.2) để chuẩn bị dung dịch làm việc canxi clorua, vì dung dịch sánh đặc sẽ khó lấy bằng pipet.

Cân ở nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 22 °C) khoảng 2,70 g dung dịch gốc canxi clorua (5.2) có nồng độ đã biết, chính xác đến 0,01 g, cho vào bình định mức một vạch 2 000 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch canxi clorua mới trong ngày làm việc.

Cách khác, có thể chuẩn bị dung dịch canxi clorua trung gian 50 g/l và được pha loãng tiếp trước khi sử dụng.

5.4 Bột sữa sấy phun có hàm lượng chất béo thấp đã xử lý nhiệt thấp, đạt chất lượng dùng cho phân tích vi khuẩn và rennet

CHÚ THÍCH Bột sữa sấy phun có hàm lượng chất béo thấp, xử lý nhiệt thấp đáp ứng được các yêu cầu, có bán sẵn trên thị trường^{2), 3)}

5.5 Bột chất chuẩn đối chứng rennet bê⁴⁾, đựng trong các ống thủy tinh chứa 2,7 g, có nhiều hơn 98 % chymosin và nhỏ hơn 2 % pepsin bò tính theo hoạt độ enzym, được xác định theo IDF 110B.

²⁾ Địa chỉ: Chr. Hansen A/S, 1-27 Jernholmen, 2650 Hvidovre, Denmark (Fax: +45 36867776). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

³⁾ Viện nghiên cứu nông học quốc tế Recherche, Pháp, P.P số 94, 39800 Poligny, Pháp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

⁴⁾ AMAFE. Địa chỉ: Chr. Hansen A/S, 1-27 Jernholmen, 2650 Hvidovre, Denmark (Fax: +45 36867776). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

TCVN 10022:2013

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số chính xác được ghi trên giấy chứng nhận phân tích và ở khoảng 1000 IMCU/g.

Bột chất chuẩn đối chứng rennet bê là chất chuẩn đối chứng đầu; có thể chuẩn bị chất chuẩn dạng lỏng thứ cấp và được sử dụng nếu chắc chắn rằng cho kết quả tương tự.

Bảo quản bột chất chuẩn đối chứng rennet bê ở nơi tối ở $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, tránh ẩm. Để bảo quản trong một khoảng thời gian ngắn, ví dụ: trong quá trình vận chuyển, bột chất chuẩn này có thể được giữ ở nhiệt độ môi trường.

5.6 Bột chất chuẩn đối chứng rennet bò⁴⁾, đựng trong các ống thủy tinh chứa 2,7 g, chứa nhỏ hơn 2 % chymosin và lớn hơn 98 % pepsin bò tính theo hoạt độ enzym, được xác định theo IDF 110B.

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số chính xác được ghi trên giấy chứng nhận phân tích và ở khoảng 1 000 IMCU/g.

Bột chất chuẩn đối chứng rennet bò là chất chuẩn đầu; có thể chuẩn bị chất chuẩn dạng lỏng thứ cấp và được sử dụng nếu chắc chắn rằng cho kết quả tương tự.

Bảo quản bột chất chuẩn đối chứng rennet bò ở nơi tối ở $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, tránh ẩm. Để bảo quản trong một khoảng thời gian ngắn, ví dụ: trong quá trình vận chuyển, bột chất chuẩn này có thể được giữ ở nhiệt độ môi trường.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

6.1 Micropipet, hoặc loại pipet khác, có thể phân phối 0,5 ml trong khoảng thời gian nhỏ hơn 1 s, có độ lặp lại bằng hoặc tốt hơn 0,2 %.

6.2 Pipet một vạch, phù hợp với TCVN 7151 (ISO 648), để phân phối được các lượng thích hợp.

Cách khác, có thể sử dụng bộ pha loãng (ví dụ: bộ pha loãng Hamilton) có độ chính xác cao tương tự để pha loãng chất làm đông. Để đo cơ chất, cũng có thể dùng xyranh hoặc bộ phận phân phối để chuyển một lượng thích hợp với độ lặp lại 0,4 %.

6.3 Bình định mức một vạch, phù hợp với TCVN 7153 (ISO 1042), có các dung tích thích hợp.

6.4 Nhiệt kế, đã được hiệu chuẩn, được chia vạch từ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, có độ chính xác $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.5 Máy đo pH, có thể đo pH chính xác đến 0,01 đơn vị.

6.6 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 1 mg.

6.7 Đồng hồ bấm giờ, có thể đo đến đơn vị giây.

6.8 Bình thử nghiệm hoặc **ống nghiệm** để kiểm tra sự đồng tụ sữa, có dung tích thích hợp (xem 6.9.1 và 9.5.1).

6.9 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ có thể duy trì nhiệt độ ổn định trong giới hạn $\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong toàn bộ nồi (xem 9.5.1), với các phụ kiện kèm theo sau đây:

6.9.1 Mô tơ điện, có trục quay gắn với bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm (6.8), có thể quay ở góc quay thích hợp khoảng 30° so với bề mặt nước của nồi cách thủy.

CHÚ THÍCH Đối với phương pháp này thì tốc độ quay không quan trọng, tốc độ từ 2 r/min đến 4 r/min là thích hợp.

6.9.2 Đèn điện, được đặt ở vị trí sao cho chiếu sáng được toàn bộ bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm (6.8) một cách hiệu quả.

Có thể sử dụng tấm chắn có nền đen được đặt trong nồi cách thủy để tăng khả năng quan sát sự đồng tụ sữa trong bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm.

6.10 Túi nhu động, để hòa tan rennet dạng sệt, ví dụ: của hãng Seward⁵⁾.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng mẫu đại diện và không bị thay đổi hoặc hư hỏng trong quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Việc lấy mẫu rennet dạng lỏng (8.1) và rennet dạng bột (8.3) cần thực hiện theo các hướng dẫn trong TCVN 6400 (ISO 707) tương ứng đối với sữa và sản phẩm sữa dạng lỏng và đối với sữa bột và sản phẩm sữa bột.

Bảo quản các mẫu thử ở nơi tối ở nhiệt độ từ $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Rennet cừu (hoặc dê) dạng lỏng

Khuấy để trộn đều mẫu thử, tránh tạo bọt. Đưa mẫu thử về nhiệt độ phòng (từ $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) trước khi bắt đầu chuẩn bị dung dịch mẫu thử làm đồng tụ (9.4).

⁵⁾ Seward Ltd., London, United Kingdom. (www.seward.co.uk). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

8.2 Rennet cừu (hoặc dê) dạng sệt

Trộn kỹ mẫu thử renet dạng sệt để thu được mẫu đồng nhất. Hòa trộn 8 g ± 2 g mẫu trong túi bằng chất dẻo với 200 ml dung dịch đệm (5.1), dùng túi nhu động (6.10) được cài đặt ở tốc độ 230 r/min trong 60 s.

Cách khác, việc hòa tan mẫu dạng sệt trong túi làm bằng chất dẻo có thể thực hiện bằng nhào trộn thủ công trong túi nhu động khoảng 60 s.

Ghi lại chính xác lượng mẫu được lấy, bằng gam, chính xác đến ba chữ số có nghĩa. Lọc dung dịch chiết qua bộ lọc Buchner hoặc gauze.

Lấy hệ số pha loãng của dịch chiết mẫu dạng sệt (200 g + khối lượng mẫu dạng sệt) chia cho khối lượng mẫu dạng sệt được dùng để tính hệ số pha loãng cuối cùng (xem 9.4).

CHÚ THÍCH: Cách khác, có thể sử dụng Bagfilter®⁶⁾ để chiết và lọc luôn.

8.3 Rennet cừu (hoặc dê) dạng bột

Trộn kỹ mẫu thử để thu được dạng bột đồng nhất. Đưa mẫu thử về nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 22 °C) trước khi bắt đầu chuẩn bị dung dịch mẫu thử renet (9.4).

CHÚ THÍCH 1 Chú ý rằng các sản phẩm dạng bột có thể tách rời rất nhanh.

CHÚ THÍCH 2 Xem xét lượng mẫu thử cần được lấy. Thông thường các lượng mẫu từ 3 g đến 5 g là đủ, nhưng khi kiểm tra các mẫu thử không đồng nhất hoặc yêu cầu các kết quả thử nghiệm rất chính xác thì cần có các cỡ mẫu lớn hơn, ví dụ 10 g.

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị cơ chất

Cho 1000 ml dung dịch làm việc canxi clorua (5.3) vào bình định mức một vạch dung tích 1000 ml (6.3). Cân 110 g bột sữa sấy phun có hàm lượng chất béo thấp, được xử lý nhiệt thấp (5.4), chính xác đến 0,1 g cho vào cốc có mỏ 2 000 ml. Thêm khoảng 100 ml dung dịch làm việc canxi clorua vào bột đựng trong cốc có mỏ. Khuấy trộn bằng tay để thu được hỗn hợp đồng nhất. Từ bình định mức 1000 ml cho 900 ml dung dịch làm việc canxi clorua còn lại vào lượng chứa trong cốc có mỏ. Khuấy cơ chất thu được bằng máy khuấy từ trong 30 min, tránh tạo bọt.

Để cơ chất thu được ở nhiệt độ phòng trong 30 min. Có thể giữ cơ chất ở nơi tối ở nhiệt độ phòng không quá 4 h nhưng cũng có thể giữ lạnh trong ngày chuẩn bị.

⁶⁾ Bagfilter® có bán sẵn từ Interscience, 30 chemin du Bois-des-Arpents, 78860 St-Nom-la-Bretèche, Pháp (www.interscience.fr). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

pH của cơ chất đã chuẩn bị phải ở khoảng 6,50 và không cần phải điều chỉnh.

9.2 Chuẩn bị dung dịch đối chứng rennet bê và rennet bò

9.2.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn đối chứng rennet bê

Để bao chứa bột chất chuẩn đối chứng rennet bê (5.5) cân bằng đến nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 22 °C) trước khi mở để tránh bột hút ẩm.

Mở bao và cân 2,500 g bột chất chuẩn đối chứng rennet bê (5.5), chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức một vạch 50 ml (6.3). Thêm từ 15 ml đến 20 ml dung dịch đệm (5.1) và trộn bằng cách xoay để hoà tan bột, tránh tạo bọt. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch đệm (5.1) và trộn kỹ lại.

9.2.2 Chuẩn bị dung dịch chuẩn đối chứng rennet bò

Thực hiện theo 9.2.1 nhưng thay bột chất chuẩn đối chứng rennet bê (5.5) bằng bột chất chuẩn đối chứng rennet bò (5.6).

9.3 Chuẩn bị dung dịch làm việc đối chứng rennet bê và rennet bò

9.3.1 Chuẩn bị dung dịch làm việc đối chứng rennet bê

Để có được thời gian đông tụ thích hợp, dùng pipet một vạch (6.2) lấy 3 ml dung dịch chuẩn đối chứng rennet bê (9.2.1) cho vào một bình định mức một vạch 50 ml khác. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch đệm (5.1) và trộn kỹ.

Hệ số pha loãng cuối cùng thu được là 333,33 lần. Thời gian đông tụ đối với dung dịch làm việc chuẩn rennet bê cần nằm trong khoảng từ 350 s đến 550 s.

Giữ dung dịch làm việc đối chứng rennet bê ở nhiệt độ phòng trong ngày chuẩn bị. Có thể bảo quản dung dịch này 2 ngày ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

9.3.2 Chuẩn bị dung dịch làm việc đối chứng rennet bò

Thực hiện theo 9.3.1 nhưng thay dung dịch chuẩn đối chứng rennet bê (9.2.1) bằng dung dịch chuẩn đối chứng rennet bò đã chuẩn bị (9.2.2).

Hệ số pha loãng cuối cùng thu được là 333,33 lần. Thời gian đông tụ đối với dung dịch làm việc chuẩn rennet bò cần nằm trong khoảng từ 350 s đến 550 s.

Giữ dung dịch làm việc đối chứng rennet bò ở nhiệt độ phòng trong ngày chuẩn bị. Có thể bảo quản dung dịch này 2 ngày ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

9.4 Chuẩn bị dung dịch thử rennet cừu (hoặc dê)

Lấy một lượng mẫu thử thích hợp (khoảng từ 3 g đến 5 g bột hoặc 3 ml đến 5 ml dịch chiết mẫu dạng sệt) từ mẫu thử đã chuẩn bị (8.1; 8.2 hoặc 8.3). Pha loãng phần mẫu thử bằng dung dịch đệm (5.1) đến khi thu được dung dịch thử rennet có thời gian đông tụ giống với thời gian đông tụ của dung dịch làm việc đối chứng rennet bò hoặc cừu sử dụng trong 9.3.1 hoặc 9.3.2 với dung sai cho phép là ± 40 s. Ghi lại hệ số pha loãng cuối cùng của dung dịch thử nghiệm để sử dụng trong tính kết quả (10.1). Chú ý để đưa hệ số pha loãng trong 8.2 trong trường hợp rennet dạng sệt.

9.5 Đông tụ

9.5.1 Dùng pipet một vạch (6.2) lấy 25 ml $\pm 0,1$ ml cơ chất (9.1) cho vào bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm khô (6.8). Làm nóng sơ bộ cơ chất trong khi vẫn xoay bình hoặc ống nghiệm, trong thời gian ít nhất là 12 min nhưng không quá 20 min trong nồi cách thủy (6.9) để ở 32 °C.

Ngay sau đó dùng micropipet (6.1) lấy nhanh 0,5 ml dung dịch làm việc đối chứng rennet bê (9.3.1) cho vào cơ chất. Đồng thời bật đồng hồ bấm giờ (6.7). Trộn bằng cách xoay bình để tránh tạo bọt và gắn ngay bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm vào trục quay.

Đọc thời gian đông tụ trên đồng hồ bấm giờ khi bắt đầu thấy sự keo tụ đầu tiên của màng cơ chất trên thành bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm.

9.5.2 Lập lại ngay quy trình 9.5.1 nhưng thay dung dịch làm việc đối chứng rennet bê (9.3.1) bằng dung dịch thử rennet cừu (hoặc dê) (9.4) và sau đó lập lại với dung dịch làm việc chuẩn đối chứng rennet bò (9.3.2).

Quy trình này cho kết quả tương quan. Do đó, điều quan trọng là duy trì ở cùng nhiệt độ đối với các mẫu thử và các mẫu đối chứng. Kiểm tra nhiệt độ bằng cách đo nhiệt độ của các mẫu ở các vị trí khác nhau trong nồi cách thủy. Nếu sai lệch nhiệt độ tối đa cho phép trong nồi cách thủy ($\pm 0,2$ °C) không đạt được, khi đó cần cải tiến thiết kế của nồi cách thủy hoặc cải thiện hệ thống tuần hoàn nước. Nên để các mẫu thử càng gần với mẫu đối chứng trong nồi cách thủy càng tốt để có được các điều kiện giống nhau đối với cả hai mẫu này.

9.5.3 Lập lại ngay các thao tác trong 9.5.1 và 9.5.2 để thu được các giá trị lặp lại. Tính trung bình thời gian đông tụ đối với dung dịch làm việc đối chứng rennet bê và rennet bò tương ứng và đối với dung dịch thử rennet cừu (hoặc dê).

9.5.4 Thay 25 ml cơ chất và 0,5 ml dung dịch làm việc đối chứng rennet bê hoặc bò (hoặc dung dịch thử) trong 9.5.1 hoặc 9.5.2 bằng 10 ml cơ chất với 0,2 ml dung dịch làm việc (hoặc dung dịch thử) hoặc có thể sử dụng 50 ml cơ chất với 1,0 ml dung dịch làm việc (hoặc dung dịch thử). Tuy nhiên, điều quan trọng là tỷ lệ giữa cơ chất và dung dịch làm việc phải là 50:1.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính kết quả

10.1.1 Yêu cầu chung

Hoạt độ đông tụ sữa được biểu thị bằng đơn vị đông tụ sữa quốc tế (IMCU) trên gam hoặc trên mililit. Trước hết, hoạt độ đông tụ sữa của mẫu thử được tính theo hoạt độ của bột chuẩn đối chứng rennet bê ($a_c = 5,6$) và theo hoạt độ của bột chuẩn đối chứng rennet bò ($a_v = 5,7$) (xem 10.1.2). Sau đó, tính tổng hoạt độ đông tụ sữa bằng phương pháp nội suy (xem 10.1.3).

10.1.2 Tính hoạt độ đông tụ sữa theo cả hai chất chuẩn đối chứng

Tính hoạt độ đông tụ sữa tổng số của mẫu thử theo cả hai chất chuẩn đối chứng, (a_{tc} và a_{ta}), theo công thức sau đây:

$$a_{tc} = \frac{t_{c,ref} \times w_{c,ref} \times V_1 \times d \times a_{c,ref}}{t_t \times V_2 \times V_3} \quad (1)$$

$$a_{ta} = \frac{t_{a,ref} \times w_{a,ref} \times V_1 \times d \times a_{a,ref}}{t_t \times V_2 \times V_3} \quad (2)$$

Trong đó:

- a_{tc} là hoạt độ đông tụ sữa tổng số của mẫu thử so với bột chất chuẩn đối chứng rennet bê;
- a_{ta} là hoạt độ đông tụ sữa tổng số của mẫu thử so với bột chất chuẩn đối chứng rennet bò;
- $t_{c,ref}$ là thời gian đông tụ trung bình của dung dịch làm việc đối chứng rennet bò (9.5.1 và 9.5.3), tính bằng giây (s);
- $t_{a,ref}$ là thời gian đông tụ trung bình của dung dịch làm việc đối chứng rennet bò (9.5.2 và 9.5.3), tính bằng giây(s);
- $w_{c,ref}$ là khối lượng của chất chuẩn đối chứng rennet bê cân được trong 9.2.1;
- $w_{a,ref}$ là khối lượng của chất chuẩn đối chứng rennet bò cân được trong 9.2.2;
- V_1 là thể tích của dung dịch chuẩn đối chứng rennet bê (trong 9.3.1) hoặc rennet bò (trong 9.3.2), tính bằng mililit ($V_1 = 3$ ml);
- d là giá trị cuối cùng của hệ số pha loãng thu được với dung dịch thử nghiệm (9.4);

TCVN 10022:2013

$a_{c,ref}$ là hoạt độ đông tụ sữa (nồng độ) của bột chất chuẩn đối chứng rennet bê (5.5), tính bằng IMCU trên gam, giá trị này được ghi trên ống thủy tinh đựng bột chất chuẩn;

$a_{a,ref}$ là hoạt độ đông tụ sữa (nồng độ) của bột chất chuẩn đối chứng rennet bò (5.6), tính bằng IMCU trên gam, giá trị này được ghi trên ống thủy tinh đựng bột chất chuẩn;

t_i là thời gian đông tụ trung bình của dung dịch thử rennet cừu (hoặc dê) (9.5.2 và 9.5.3), tính bằng giây (s);

V_2 là thể tích cuối cùng của dung dịch chuẩn đối chứng rennet bê (trong 9.2.1) hoặc rennet bò (trong 9.2.2), tính bằng mililit ($V_2 = 50$ ml);

V_3 là thể tích cuối cùng của dung dịch làm việc đối chứng rennet bê (trong 9.3.1) hoặc rennet bò (trong 9.3.2), tính bằng mililit ($V_3 = 50$ ml).

Công thức (1) và (2) có thể giản lược bằng cách dùng các giá trị sau đây: $w_{ref} = 2,500$ g; $V_1 = 3$ ml; $V_2 = 50$ ml; $V_3 = 50$ ml để thu được công thức (3) và (4) như sau:

$$a_{tc} = \frac{t_{c,ref} \times 0,003 \times d \times a_{c,ref}}{t_i} \quad (3)$$

$$a_{ta} = \frac{t_{a,ref} \times 0,003 \times d \times a_{a,ref}}{t_i} \quad (4)$$

10.1.3 Tính hoạt độ đông tụ sữa tổng số bằng phương pháp nội suy

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số của mẫu thử (a_i) được tính bằng cách nội suy liên quan đến chất chuẩn đối chứng rennet bò có thành phần 75/25 và hoạt độ tính được theo thời gian đông tụ trong 10.1.2, theo công thức sau:

$$a_i = \frac{75}{100} \times a_{tc} + \frac{25}{100} \times a_{ta} \quad (5)$$

10.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả theo đơn vị đông tụ sữa quốc tế (IMCU) trên gam hoặc trên mililit chính xác đến số nguyên.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền đã nêu.

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ độ lệch chuẩn là các giá trị ước tính của độ lệch chuẩn đúng của phương pháp. Mỗi giá trị đã cho về độ lặp lại và độ tái lập là chênh lệch tối đa giữa hai kết quả thử nghiệm được dự kiến trong 95 % các trường hợp khi hai kết quả được so sánh. Nếu có ít hơn 95 % các trường hợp nằm trong các giá trị nêu trong 11.2 và 11.3, thì nên cải tiến trình tự của phương pháp.

11.2 Độ lặp lại

Độ lệch chuẩn tương đối của độ lặp lại [RSD(r)], biểu thị độ biến thiên của các kết quả phân tích thu được khi sử dụng cùng phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người phân tích sử dụng cùng một thiết bị, tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- đối với rennet dạng lỏng: 2,1 % (tương đối);
- đối với rennet dạng sệt: 6,0 % (tương đối).

Nếu hai phép xác định thu được trong các điều kiện này, thì chênh lệch tuyệt đối [r (tương đối) %] giữa hai kết quả không quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- đối với rennet dạng lỏng: 5,8 % (tương đối);
- đối với rennet dạng sệt: 17 % (tương đối).

11.3 Độ tái lập

Độ lệch chuẩn tương đối của độ tái lập [RSD(R)], biểu thị độ biến thiên của các kết quả phân tích thu được khi sử dụng cùng phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do các người phân tích khác nhau thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- đối với rennet dạng lỏng: 4,1 % (tương đối);
- đối với rennet dạng sệt: 13 % (tương đối).

TCVN 10022:2013

Nếu hai phép xác định thu được trong các điều kiện này, thì chênh lệch tuyệt đối [R(tương đối) %] giữa hai kết quả không quá 5 % các trường hợp hơn hơn:

- đối với rennet dạng lỏng: 12 % (tương đối);
- đối với rennet dạng sệt: 36 % (tương đối).

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được; hoặc nếu đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

A.1 Yêu cầu chung

Phép thử liên phòng thử nghiệm này gồm có 12 phòng thử nghiệm của năm nước tham gia, thực hiện trên các mẫu rennet cừu và rennet dê dạng lỏng và dạng sệt. Phép thử này do DSM Food Ingredients (NL) tổ chức. Các kết quả thử nghiệm đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2).

A.2 Mẫu rennet dạng lỏng

Mẫu rennet dê dạng lỏng từ một mẻ được pha loãng để tạo ra các mẫu có nồng độ 100 %, 85 % và 75 %. Tương tự, mẫu rennet cừu dạng lỏng được pha loãng đến nồng độ 100 % và 85 %. Để không nhìn thấy có sự khác nhau, tất cả các mẫu được tạo màu bằng caramel. Năm mẫu thử được chia thành 10 cặp mẫu mù kép. Hoạt độ đông tụ sữa được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Hoạt độ đông tụ sữa của các mẫu rennet dạng lỏng (IMCU/ml)

Số phòng thử nghiệm	Chất làm đông (nồng độ)									
	Dê (75 %)	Cừu (85 %)	Dê (85 %)	Cừu (100 %)	Dê (100 %)	Dê (75 %)	Cừu (85 %)	Dê (85 %)	Cừu (100 %)	Dê (100 %)
1	31,3	87,7	35,6	100,1	41,5	31,9	86,5	36,6	102,0	43,1
2	33,4	92,2	34,4	106,3	41,3	33,8	91,1	36,1	105,3	41,1
3 ^a	27,4	57,9	31,8	97,4	35,8	31,6	60,5	40,1	92,2	44,9
4	35,2	87,3	40,1	103,0	47,0	35,4	85,0	39,4	101,9	46,5
5	31,9	86,8	36,0	101,6	41,2	31,5	86,1	36,0	100,8	41,6
6	29,5	85,8	35,8	99,4	38,5	26,5	87,5	34,3	99,8	40,0
7	33,4	91,3	36,5	105,1	42,6	33,1	91,8	34,6	97,7	42,8
8	31,2	86,5	35,6	101,9	41,1	34,8	88,5	36,0	102,3	40,9
9 ^b	30,2	85,7	37,1	102,2	46,5	32,6	89,2	36,5	102,7	42,0
10	32,5	88,3	36,5	103,2	43,0	32,4	88,6	36,5	106,5	41,5
11	31,7	86,6	35,2	105,5	40,3	31,5	87,0	34,7	101,0	40,4
12	33,9	91,9	36,7	106,6	45,2	33,4	91,9	36,9	105,3	44,0

^a loại bò do không phù hợp.

^b loại bò vi ngoại lệ Cochran.

Phép thử liên phòng thử nghiệm trên rennet dạng lỏng cho các kết quả tốt nhất đối với độ lặp lại và độ tái lập tương đối. Một phòng thử nghiệm đã được loại bỏ từ phép phân tích thống kê vì không phù hợp với phương pháp thử. Sau khi kiểm tra ngoại lệ Cochran trên 11 phòng thử nghiệm, một ngoại lệ đã được tìm ra và loại khỏi phần tính kết quả. Không có ngoại lệ Grubbs đơn và kép được phát hiện sau đó.

Đánh giá thống kê về các kết quả từ 10 phòng thử nghiệm còn lại trong phép thử cộng tác trên rennet cừu dạng lỏng và rennet dê dạng lỏng được nêu trong Bảng A.2.

Bảng A.2 – Kết quả từ 10 phòng thử nghiệm còn lại đối với các mẫu rennet dạng lỏng

Mẫu	Trung bình IMCU/ml	RSD(r)	<i>r</i>	<i>r</i> (tương đối) %	RSD(R)	<i>R</i>	<i>R</i> (tương đối) %	Ngoại lệ
Dê (75 %)	32,32	3,59	3,24	10,04	6,28	5,68	17,57	1 (Cochran)
Dê (85 %)	36,24	1,93	1,96	5,41	3,95	4,00	11,05	
Dê (100 %)	42,20	1,62	1,91	4,53	5,22	6,17	14,62	
Cừu (85 %)	88,34	1,28	3,16	3,58	2,71	6,71	7,60	
Cừu (100 %)	102,73	2,01	5,79	5,64	2,46	7,06	6,88	
Trung bình		2,09		5,84	4,12		11,54	

A.3 Mẫu rennet dạng sệt

Hai mẫu rennet cừu dạng sệt khác nhau và hai mẫu rennet dê dạng sệt khác nhau không pha loãng đã được thử nghiệm. Tất cả các mẫu thử được chia thành tám mẫu mù lặp lại. Hoạt độ đồng tụ sữa được nêu trong Bảng A.3.

Các kết quả thu được trên mẫu rennet dạng sệt cho thấy các giá trị về độ lặp lại tương đối và độ tái lập tương đối cao hơn nhiều. Các giá trị này thu được sau khi loại bốn trong số 12 phòng thử nghiệm tham gia, một số do yêu cầu của phòng thử nghiệm, một số do không phù hợp với phương pháp thử. Sau khi loại ra, còn lại tám phòng thử nghiệm và không có ngoại lệ Cochran hoặc Grubbs. Các giá trị về độ chụm thu được tương đối cao nhưng nhìn về bản chất của các rennet dạng sệt truyền thống này thì các giá trị thu được là có thể chấp nhận được.

Đánh giá thống kê về các kết quả từ tám phòng thử nghiệm còn lại trong phép thử cộng tác trên rennet cừu dạng sệt và rennet dê dạng sệt được nêu trong Bảng 4.

Bảng A.3 – Hoạt độ đông tụ sữa của các mẫu rennet dạng lỏng (IMCU/ml)

Số phòng thử nghiệm	Chất làm đông							
	Cừu	Dê	Cừu	Dê	Cừu	Dê	Cừu	Dê
1	158,0	141,8	132,1	115,6	154,0	124,1	137,9	114,0
2 ^a	59,0	80,7	119,4	109,7	93,5	72,5	90,4	72,0
3 ^a	99,9	81,8	88,8	79,7	91,3	81,3	81,9	81,5
4	95,6	107,5	99,3	100,1	94,3	106,4	96,9	101,7
5	108,3	102,9	94,8	80,3	85,9	95,3	84,6	102,7
6	144,9	125,0	119,1	106,7	145,4	125,3	132,9	109,6
7 ^a	118,0	90,4	75,5	82,8	71,2	92,8	72,1	76,3
8	133,3	122,3	124,9	96,0	126,2	106,0	117,5	108,9
9	147,8	128,6	128,5	107,5	142,0	134,3	128,6	114,7
10	133,8	114,9	111,8	103,8	114,9	123,0	118,3	93,1
11 ^a	74,9	105,3	87,5	76,9	99,7	93,6	98,5	63,0
12	132,8	121,5	119,4	104,9	121,4	116,1	124,6	103,9

^a loại bỏ vì không phù hợp.

Bảng A.4 – Kết quả từ 8 phòng thử nghiệm còn lại đối với các mẫu rennet dạng sệt

Mẫu	Trung bình IMCU/ml	RSD(r)	<i>r</i>	<i>r</i> (tương đối) %	RSD(R)	<i>R</i>	<i>R</i> (tương đối) %	Ngoại lệ
Cừu P1/P5	127,4	6,50	23,19	18,20	17,96	64,09	50,30	
Dê P2/P6	118,4	5,83	19,34	16,33	10,66	35,36	29,86	
Cừu P3/P7	116,9	4,57	14,96	12,80	13,66	44,74	38,26	
Dê P4/P8	104,0	6,99	20,36	19,59	8,67	25,23	24,27	
Trung bình		5,97		16,70	12,74		35,70	

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
 - [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
-