

**TCVN**

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9590:2013

ISO 16472:2006

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG XƠ  
XỬ LÝ BẰNG CHẤT TẨY TRUNG TÍNH VÀ AMYLAZA (aNDF)**

*Animal feeding stuffs – Determination of amylase-treated  
neutral detergent fibre content (aNDF)*

HÀ NỘI – 2013

**Lời nói đầu**

TCVN 9590:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 16472:2006;

TCVN 9590:2013 do Cục Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng xơ xử lý bằng chất tẩy trung tính và amylaza (aNDF)

*Animal feeding stuffs – Determination of amylase-treated neutral detergent fibre content (aNDF)*

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp xác định hàm lượng còn lại của xơ không hòa tan khi xử lý bằng chất tẩy trung tính và amylaza trong tất cả các loại thức ăn chăn nuôi.

Tiêu chuẩn này sử dụng phương pháp khối lượng thông dụng và phương pháp chuẩn.

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau 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, bổ sung (nếu có).

TCVN 6952 (ISO 6498), *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử*.

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

### 3.1

Hàm lượng xơ xử lý bằng chất tẩy trung tính và amylaza (amylase-treated neutral detergent fibre content)

Hàm lượng aNDF (aNDF content)

Phần khối lượng của xơ không hòa tan còn lại xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng aNDF được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

## 4 Nguyên tắc

Sử dụng dung dịch chất tẩy trung tính (ND) và alpha-amylaza bền nhiệt để hòa tan các chất dễ phân hủy như protein, lipid, đường, tinh bột và các pectin trong thức ăn chăn nuôi, còn lại phần xơ không tan có nguồn gốc từ thành tế bào của các nguyên liệu thực vật (xenluloza, hemixenluloza và lignin) và từ các chất chứa nitơ không phân hủy trong các sản phẩm động vật.

## 5 Thuốc thử

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

5.1 Natri sulfit, khan ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ).

5.2 Bột ngô khô (bột ngô nguyên liệu), được nghiền để lọt qua sàng cỡ lỗ 1 mm trong máy nghiền cắt.

5.3 Dung dịch iot, chứa 2 g kali iot và 1 g iot trong 100 ml nước.

Bảo quản dung dịch này trong chai màu hổ phách hoặc chai sẫm màu.

5.4 Alpha-amylaza bền nhiệt, dung dịch hoặc dịch chiết của bột enzym đông khô trong nước (khoảng 1 g bột được chiết trong 100 ml nước).

VÍ DỤ: Termamyl 120 I của hãng Enzymes Novo hoặc loại tương đương.

Chuẩn hóa dung dịch alpha-amylaza bền nhiệt hoặc dịch chiết bột enzym sao cho sau hai lần bổ sung, mỗi lần 2 ml, loại bỏ được tinh bột ra khỏi 0,5 g bột ngô nguyên liệu (5.2). Xem phụ lục B để biết chi tiết về quy trình chuẩn hóa dung dịch alpha-amylaza bền nhiệt.

5.5 Dung dịch chất tẩy trung tính (ND)

Rót khoảng 400 ml đến 500 ml nước vào bình định mức 1 lit. Thêm 4,0 g natri hydroxyt ( $\text{NaOH}$ ), 14,6 g EDTA, 4,56 g natri hydro phosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 6,81 g natri borat decahydrat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) và trộn cho đến khi hòa tan hết (gia nhiệt, nếu cần). Có thể thay  $\text{NaOH}$  và EDTA bằng 18,6 g dinatri EDTA.

Thao tác trong tủ hút an toàn, thêm 30 g natri lauryl sunfat, sau khi hòa tan, cho 10 ml trietylen glycol (chất chống tạo bọt). Thêm nước đến khoảng 950 ml và trộn. Chính pH từ 6,95 đến 7,05 bằng axit clohydric đậm đặc (HCl) hoặc natri hydroxit (NaOH) và pha loãng bằng nước đến 1 000 ml. Nếu pH nằm ngoài dải giá trị nêu trên quá 0,5 đơn vị thì loại bỏ dung dịch.

Bảo quản dung dịch ND ở nhiệt độ phòng. Nếu thấy có kết tủa thì đun nóng dung dịch đến 25 °C và trộn trước khi sử dụng. Ghi lại ngày chuẩn bị dung dịch ND, số đo pH và mọi điều chỉnh về thuốc thử.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

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

**6.1 Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,1 mg, đọc được đến 0,1 mg.

**6.2 Máy nghiền xoáy** có sàng cỡ lỗ 2 mm, hoặc **máy nghiền cắt** có sàng cỡ lỗ 1 mm, có thể nghiền các mẫu thành các hạt kích cỡ trung bình từ 220 µm đến 260 µm.

**6.3 Thiết bị hồi lưu**, có bộ phận gia nhiệt và bình ngưng tụ nước lạnh riêng lắp vừa bình định mức dung tích 600 ml.

Mọi thiết bị thích hợp dùng cho phép xác định sơ thô cũng có thể được chấp nhận. Hiệu chỉnh bộ gia nhiệt sao cho 50 ml nước sôi trong 4 min đến 5 min khi sử dụng bình ngưng tụ nước lạnh. Có thể dùng thiết bị kiểu Fibertec và cần đun sôi 50 ml nước trong 10 min.

**6.4 Chén nung Gooch**, chén thủy tinh xốp (cỡ lỗ từ 40 µm đến 60 µm), dáng cao, dung tích 40 ml đến 50 ml, hoặc P2 (cỡ lỗ từ 40 µm đến 100 µm), dung tích từ 26 ml đến 28 ml.

Làm sạch chén nung mới và tro hóa ở 500 °C trong 1 h. Làm sạch chén nung sau mỗi lần sử dụng bằng cách nung trong 3 h ở 500 °C, loại bỏ tro, đảo chiều chén trong dung dịch chất tẩy và siêu âm trong 7 min đến 10 min. Tráng chén trong nước nóng và ngâm trong nước ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 min. Đậy miệng của từng chén nung bằng nắp cao su có ống nối để nối với xi phông và ống hút chân không. Dùng nước rửa sạch từng chén nung nhiều lần bằng cách nhúng ngập đáy chén vào nước rồi nhấc ra.

Thình thoảng kiểm tra tốc độ lọc như sau: đổ đầy mỗi chén 50 ml nước cát (25 ml đối với chén Fibertec P2) và ghi lại thời gian cần để làm khô hết mà không cần hút chân không (cần 180 s ± 60 s đối với chén Gooch hoặc 75 s ± 30 s đối với chén P2). Nếu thời gian làm khô nhỏ hơn 100 s (hoặc nhỏ hơn 30 s đối với chén P2) thì loại bỏ chén. Nếu thời gian làm khô nhỏ hơn 120 s (hoặc nhỏ hơn 45 s đối với chén P2), thì kiểm tra vết nứt trên chén nung. Nếu thời gian lọc lớn hơn 240 s (hoặc lớn hơn 105 s đối với chén P2) thì làm sạch chén nung bằng dung dịch làm sạch kiềm hoặc axit (xem Tài liệu tham khảo [1]). Nếu việc làm sạch không cải thiện được tốc độ lọc thì loại bỏ chén nung.

## TCVN 9590:2013

Thay vì sử dụng chén P2, có thể sử dụng chén kim loại bằng thép không gỉ có sàng kim loại bằng thép không gỉ cỡ lỗ 90 µm.

### 6.5 Thiết bị lọc chân không (ví dụ: loại Fibertec), cho phép ngâm đủ phần xơ còn lại.

Thiết bị lọc phải được trang bị các chén làm kín chân không để làm giảm sự hình thành bọt bên trong. Sử dụng ống chân không có thành dày để nối thiết bị lọc chân không với xiphông (4 l đến 18 l) và nguồn chân không. Nên lắp bình thu nhận chân không (18 l) ở giữa xi phông và nguồn chân không để đảm bảo khả năng hút chân không của thiết bị đủ để loại bỏ bọt.

### 6.6 Thiết bị cung cấp nước sôi

Nên sử dụng thiết bị đun nước sôi liên tục như quy định trong Tài liệu tham khảo [1] hoặc thiết bị phù hợp. Thiết bị phải có khả năng cấp đủ lượng nước sôi (lớn hơn 95 °C) cho tất cả các mẫu được rửa tại một thời điểm, cấp qua bộ đầu phun tạo luồng hơi mạnh (tốc độ dòng từ 35 ml đến 40 ml trong 10 s; có thể chấp nhận được khi dùng đầu pipet bằng chất dẻo 2,5 ml dùng một lần làm đầu phun). Đầu phun tốt giảm thiểu lượng nước cần để chuyển các phân tử vào chén nung, nhưng phải đảm bảo áp suất nước đủ để loại bỏ phần còn lại bám trên thành bình. Điều quan trọng là nước khi cho vào chén nung phải đang sôi, đặc biệt là đối với các mẫu có chứa tinh bột, các chất pectic, các chất nhầy hoặc các glyco-protein. Đối với thiết bị kiểu Fibertec, nên sử dụng xyranh có đầu phun hình nón để tráng bình ngưng, xyranh 60 ml dùng một lần có 12 đầu đo dài 10 cm để loại bỏ phần còn sót lại bám dính vào bình ngưng.

## 7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497).

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

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 6498).

Để bảo quản mẫu và dễ nghiền thì mẫu phải dạng khô không khí (hàm lượng chất khô khoảng 90 %).

Làm khô các mẫu ướt ở nhiệt độ nhỏ hơn 60 °C để tránh tạo hiện tượng giả xơ. Hàm lượng còn lại sau khi chiết bị ảnh hưởng bởi cỡ hạt mẫu. Nghiền mẫu đại diện để thu được cỡ hạt trung bình từ 220 µm đến 260 µm (xem 6.2).

Cần nghiền riêng mẫu, đối với các mẫu có hàm lượng xơ cao nhất thì nghiền sau cùng. Không được loại bỏ mẫu trong máy nghiền, mà gộp chúng với mẫu thu được trong hộp chứa của máy nghiền. Trộn

mẫu đã nghiền bằng cách đổ chúng lên tờ giấy vuông (kích thước khoảng 40 cm x 40 cm) được gấp dọc theo hai đường chéo. Nhấc hai góc đối diện của tờ giấy lên đôn cho mẫu tập trung dọc đường gấp ở giữa. Dàn tờ giấy cho phẳng, xoay 90° và nhấc hai góc đối diện còn lại của tờ giấy. Lặp lại 11 lần. Chuyển mẫu vào vật chứa thích hợp.

CHÚ THÍCH: Có thể phân tích aNDF của mẫu ướt; tuy nhiên đây không phải là phương pháp tiến hành thông dụng vì rất khó để nghiền mẫu đến kích cỡ hạt giống như đã nêu trên.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Đối với phương pháp truyền thống tiến hành như mô tả trong Tài liệu viện dẫn [1].

#### 9.1.1 Phân mẫu thử

Làm khô chén nung rỗng trong 4 h ở 105 °C ± 1 °C rồi cân. Ghi lại khối lượng chén nung rỗng để đựng mẫu ( $m_c$ ) hoặc mẫu trắng ( $m_b$ ) chính xác đến 0,000 1 g.

Trộn mẫu kỹ và cân 1 g ± 0,001 g thức ăn dạng khô không khí, hoặc cân một lượng mẫu thử ướt tương đương ( $m_s$ ), cho vào chén nung hoặc bình hồi lưu, tùy thuộc vào quy trình khử chất béo sơ bộ.

Cần làm khô các mẫu không đồng nhất trước khi nghiền (xem Điều 8). Chỉ những mẫu ướt để đồng nhất mới có thể được cân trực tiếp.

Nếu các kết quả được biểu thị theo chất khô thì cân một mẫu thứ hai ở cùng thời điểm với phép xác định chất khô.

Đối với 20 đến 30 mẫu đầu tiên khi chạy phân tích, gồm có một mẫu chuẩn nội bộ và hai mẫu trắng và cứ mỗi lần bổ sung 20 đến 30 mẫu thì lại lấy thêm một mẫu đối chứng và một mẫu trắng.

#### 9.1.2 Khử chất béo sơ bộ

Các mẫu chứa chất béo lớn hơn 5 % nên được chiết sơ bộ. Còn các mẫu chứa chất béo lớn hơn 10 % thì phải được chiết sơ bộ để loại bỏ chất béo.

Để chiết sơ bộ bằng axeton, cho phần mẫu thử vào chén nung và cân. Đặt chén lên thiết bị lọc chân không và chiết bốn lần, mỗi lần dùng 40 ml đến 50 ml axeton (ngâm mẫu ít nhất trong 5 min và khuấy ba lần trong mỗi lần ngâm). Hút chân không để loại bỏ hết axeton, làm khô bằng không khí từ 10 min đến 15 min để bảo đảm rằng đã hết axeton rồi chuyển mẫu vào bình hồi lưu. Dùng chén nung này để thu lấy phần xơ còn lại đối với mẫu thử sau khi chiết bằng ND.

Nếu dùng chất trợ lọc thì chúng phải được làm khô và cân cùng với chén nung, sau đó chuyển vào vật chứa khác, cho mẫu vào chén nung và chiết bằng axeton. Cho chất trợ lọc trở lại chén nung trước khi lọc xơ còn lại sau khi đã chiết bằng ND.

## TCVN 9590:2013

### 9.1.3 Phân hủy

Dùng thìa có chia vạch lấy  $0,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  natri sulfit (5.1) và  $50 \text{ ml} \pm 5 \text{ ml}$  dung dịch ND (5.5) cho vào từng bình hồi lưu và xoay bình (việc này rất quan trọng đối với thức ăn chăn nuôi chứa tinh bột, vì chúng thường bám vào đáy bình trong quá trình hồi lưu). Không cho ND và natri sulfit vào mẫu quá 60 min trước khi hồi lưu.

Đun sôi trong vòng 4 min đến 5 min, thêm 2 ml dung dịch amylaza đã chuẩn hóa (5.4), khuấy để cho các hạt không bám vào đáy hoặc thành bình và xoay bình.

Cho hồi lưu trong 60 min với tốc độ đủ để các hạt chuyển động, nhưng không quá mạnh để tạo thành bọt đưa các hạt bám lên thành bình. Các mẫu có thể sủi bọt mạnh trong 1 min đến 2 min (không được giảm nhiệt độ của bộ gia nhiệt). Sau khi thêm amylaza từ 5 min đến 10 min thì dùng chai có đầu phun nhỏ, tráng thành bình bằng một lượng tối thiểu dung dịch ND và nếu thấy cần thì phun rửa để các hạt không bám vào thành chén (tối đa hai lần).

### 9.1.4 Lọc

Tháo rời bình chứa mẫu đã chiết ra khỏi bộ gia nhiệt và để cho các hạt lắng trong thời gian từ 30 s đến 60 s. Trước khi chuyển cần quan sát hỗn hợp để xác định xem có các hạt lipid trên bề mặt hay không, hoặc dung dịch có màu sữa đục hay không, màu sữa đục chứng tỏ mẫu có hàm lượng chất béo cao, mẫu đó cần phải được chiết lại sau khi chiết sơ bộ bằng axeton (9.1.2).

Cho đĩa khuấy teflon vào chén nung và gia nhiệt sơ bộ bằng cách thêm 40 ml nước sôi vào trong thời gian 30 s đến 60 s. Hút chân không để bỏ loại nước và gạn ngay 30 ml đến 40 ml dung dịch ra khỏi bình, đặt úp bình lên trên chén nung. Dùng mức chân không tối thiểu để hút dịch lỏng còn sót lại và đóng chân không trước khi chặn bị khô.

CHÚ THÍCH: Chân không dư và hút chân không để làm khô có thể dẫn đến việc một số mẫu làm tắc chén nung và không rửa sạch được chén.

Dùng hơi nước sôi tráng hết các hạt rời ra trong bình vào chén. Cho nước nóng đến nửa chén. Thêm 2 ml dung dịch làm việc amylaza (5.4) và khuấy.

Để cho phản ứng với amylaza xảy ra trong ít nhất từ 45 s đến 60 s trong khi dùng dao cao su tách hết các hạt khỏi đáy và thành bình hồi lưu. Hút dung dịch amylaza, dùng 20 ml đến 30 ml nước sôi chuyển hết phần còn lại từ bình hồi lưu sang chén nung. Thường tráng hai lần là đủ. Sau khi chuyển hết phần còn lại từ bình sang chén nung, cho nước sôi đến ba phần tư chén và ngâm trong 3 min.

Hút nước, thêm 40 ml đến 50 ml nước sôi, ngâm từ 3 min đến 5 min và lặp lại thao tác. Nếu phần còn lại khó lọc sau khi ngâm lần đầu thì thêm 2 ml dung dịch làm việc amylaza. Nếu phần còn lại trở nên



mờ đục và khó lọc sau mỗi lần ngâm thì không cần ngâm nước lần thứ ba. Nếu bị tắc, có thể súc rửa chén nung bằng cách tháo ra khỏi thiết bị lọc sau đó lại lắp lại.

Hút nước, đổ đầy lại chén nung bằng 40 ml đến 50 ml axeton, khuấy cho các hạt tách ra, ngâm trong 3 min đến 5 min và lặp lại thao tác. Tráng đũa khuấy để loại bỏ bất kỳ hạt xơ còn bám dính. Không hút hết nước khỏi phần xơ còn lại bằng chân không trước khi thêm axeton. Việc hút quá khô xơ còn lại sẽ làm vón cục, các hạt khó phân hủy trong axeton và làm giảm hiệu quả chiết của axeton.

Sử dụng chân không để làm khô mẫu. Tháo chén nung ra khỏi thiết bị chân không và phơi khô từ 10 min đến 60 min để loại bỏ axeton.

### 9.1.5 Sấy

Sấy chén nung ở  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong ít nhất 8 h. Để nguội trong bình hút ẩm rồi cân chính xác đến 0,000 1 g ( $m_{ce}$  và  $m_{be}$ ).

### 9.1.6 Tro hóa

Nung chén có xơ còn lại 5 h trong lò nung ở nhiệt độ  $500\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hoặc cho đến khi không còn cacbon. Để nguội trong bình hút ẩm rồi cân chính xác đến 0,000 1 g ( $m_{ca}$  và  $m_{ba}$ ).

## 9.2 Tiến hành xác định sử dụng thiết bị kiểu Fibertec

### 9.2.1 Phần mẫu thử

Cho chất trợ lọc vào chén nung P2, sấy từ 2 h đến 4 h ở  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  sau đó cân chính xác đến 0,000 1 g ( $m_c$  hoặc  $m_b$ ). Trộn kỹ mẫu và cân 0,5 g  $\pm$  0,050 0 g thức ăn chăn nuôi dạng khô không khí, hoặc cân một lượng mẫu thử ướt tương đương ( $m_s$ ) cho vào chén nung.

Nếu kết quả biểu thị theo chất khô thì cân một mẫu thứ hai ở cùng thời điểm với phép xác định chất khô.

Đối với 20 đến 30 mẫu đầu tiên khi chạy phân tích, gồm có một mẫu chuẩn nội bộ và hai mẫu trắng và cứ mỗi lần bổ sung 20 đến 30 mẫu thì lại lấy thêm một mẫu đối chứng và một mẫu trắng.

### 9.2.2 Khử chất béo sơ bộ

Thông thường, các mẫu chưa biết trước hàm lượng chất béo thì cần được chiết sơ bộ. Đối với các mẫu có hàm lượng chất béo lớn hơn 10 % phải được chiết sơ bộ để loại bỏ chất béo.

Đặt chén vào bộ chiết lạnh và chiết bốn lần, mỗi lần bằng 20 ml đến 30 ml axeton (để mẫu được ngâm ít nhất trong 5 min và khuấy ba lần trong mỗi lần ngâm). Hút chân không để loại bỏ hết axeton, làm khô bằng không khí 10 min đến 15 min để đảm bảo đã loại bỏ hết axeton.

### 9.2.3 Phân hủy

Khởi động thiết bị kiểu Fibertec, theo các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Cho  $0,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  natri sulfit và  $50 \text{ ml} \pm 5 \text{ ml}$  dung dịch ND (5.5) vào mỗi chén nung và trộn bằng nghịch áp (back-pressure) (điều này rất quan trọng đối với thức ăn giàu tinh bột bám dính vào đáy chén trong quá trình hồi lưu). Không cho dung dịch ND và natri sulfit vào mẫu quá 60 min trước khi hồi lưu. Thêm 2 ml dung dịch amylaza đã được chuẩn hóa (5.4) và đun sôi trong 10 min. Dùng nghịch áp để trộn amylaza với dung dịch ND và mẫu.

Đun sôi trong 60 min. Các mẫu có thể sủi bọt mạnh trong 1 min đến 2 min (không được giảm nhiệt độ của bộ cấp nhiệt). Sau khi cho amylaza vào được 5 min đến 10 min, thì dùng chai có đầu phun nhỏ tráng thành chén bằng một lượng tối thiểu dung dịch ND và nếu thấy cần thì phun rửa để các hạt không bám vào thành chén (tối đa hai lần).

### 9.2.4 Lọc

Trước khi bắt đầu lọc, quan sát hỗn hợp để xác định xem có các giọt lipid trên bề mặt hay không hoặc dung dịch có màu sữa đục hay không, màu sữa đục chứng tỏ mẫu có hàm lượng chất béo cao, mẫu đó cần phải được chiết lại sau khi chiết sơ bộ bằng axeton (9.2.2).

Hút dung dịch nhưng không làm cho phần xơ còn lại bị khô. Dùng mức chân không tối thiểu để hút dịch lỏng còn sót lại và đóng chân không trước khi phần còn lại bị khô.

CHÚ THÍCH 1: Chân không dư và hút chân không để làm khô có thể dẫn đến việc một số mẫu làm tắc chén nung và không thể rửa sạch được chén.

Thêm 30 ml nước nóng ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) và 2 ml dung dịch amylaza đã chuẩn hóa (5.4). Dùng nghịch áp để trộn amylaza trong hỗn hợp nước ngâm lần đầu. Sau ít nhất 60 min phản ứng thì loại bỏ nước có amylaza đã ngâm.

CHÚ THÍCH 2: Có thể chuyển các chén nung từ bộ lọc nóng sang bộ lọc nguội đối với các mẫu để lọc còn ngâm trong nước nóng. Thao tác này cho phép thực hiện với loạt mẫu tiếp theo khi bắt đầu chiết ND trong bộ lọc nóng. Các mẫu khó lọc có thể được rửa trên bộ gia nhiệt Fibertec có nhiệt độ giảm để giảm thiểu việc khuấy trộn các hạt.

Thêm 30 ml nước nóng, ngâm từ 3 min đến 5 min rồi loại bỏ nước. Nếu phần còn lại khó lọc sau khi ngâm lần đầu tiên thì thêm 2 ml dung dịch amylaza. Nếu phần còn lại trở nên mờ đục và khó lọc sau mỗi lần ngâm thì không cần ngâm nước lần thứ ba. Nếu bị tắc, có thể dùng nghịch áp để làm thông chén.

Không hút hết nước ra khỏi xơ còn lại bằng chân không trước khi rửa bằng axeton. Việc hút quá khô xơ còn lại sẽ làm vón cục và làm các hạt khó phân hủy trong axeton và làm giảm hiệu quả chiết của axeton.

Chuyển chén vào bộ chiết nguội. Đổ đầy chén 30 ml axeton và dùng áp lực tối thiểu để làm phân tán các hạt. Ngâm từ 3 min đến 5 min rồi hút hết axeton. Lặp lại quy trình rửa bằng axeton.

Làm khô phần còn lại trong chân không, tháo chén ra khỏi thiết bị chân không và phơi khô từ 10 min đến 60 min để loại bỏ axeton.

### 9.2.5 Sấy

Sấy chén trong ít nhất 8 h ở  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Để đến nguội trong bình hút ẩm rồi cân chính xác đến 0,000 1 g ( $m_{ce}$  và  $m_{be}$ ).

### 9.2.6 Tro hóa

Nung chén cùng với phần còn lại 5 h trong lò nung ở  $500\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hoặc cho đến khi không còn cacbon. Để trong bình hút ẩm rồi cân chính xác đến 0,000 1 g ( $m_{ca}$  và  $m_{ba}$ ).

## 9.3 Cải tiến cách tiến hành đối với các loại mẫu đặc thù

9.3.1 Trong khi chuyển phần còn lại hoặc sau lần ngâm nước đầu tiên nếu thấy dung dịch ND đã chiết có màu sữa, đục và quá trình lọc bị chậm thì cho thấy trong mẫu đó có hàm lượng tinh bột cao. Xử lý thêm bằng 2 ml amylaza trong khi ngâm nước lần thứ hai. Thời gian ngâm được rút ngắn tối thiểu để giữ được dung dịch ngâm càng nóng càng tốt (lớn hơn  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

9.3.2 Nếu xơ còn lại làm tắc chén nung trong khi chuyển và khi bổ sung amylaza không cải thiện được việc lọc, thì mẫu thức ăn chăn nuôi có thể chứa protein, chất keo, chất nhầy (như trường hợp các sản phẩm thịt và một số loại bột hạt có dầu). Gia nhiệt sơ bộ chén nung bằng nước sôi có tính quyết định để lọc những mẫu này. Chất trợ lọc tốt nhất đối với loại mẫu dạng này là 12 g đến 15 g (6 g đến 8 g đối với chén Fibertec P2) cát silica (cát, cristobalit, được tinh sạch bằng axit, cỡ hạt 40 mesh đến 200 mesh, Fluka Cat. No 84880 hoặc loại tương đương)<sup>1)</sup>. Các chất keo có trong thức ăn dạng này có thể sẽ dính vào các hạt cát, ngăn cản keo làm tắc đĩa lọc và tạo điều kiện cho phần còn lại được rửa sạch. Tất cả các chất trợ lọc phải được cho vào chén (cả trong mẫu trắng) trước khi ghi lại khối lượng ban đầu.

9.3.3 Nếu phần còn lại bóng, óng ánh và khó lọc hơn sau mỗi lần ngâm nước, thì cho thấy mẫu có chứa các chất pectic. Gia nhiệt sơ bộ chén nung bằng nước sôi và chuyển thật nhanh phần còn lại không cần để lắng khi lấy chúng ra từ bộ hồi lưu. Giảm thiểu thời gian ngâm để duy trì nhiệt độ lớn hơn  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  tránh cho pectin trong chén bị nguội và tạo keo. Các chất trợ lọc sau đây có thể cải thiện được việc lọc (tốt nhất nên sử dụng): 12 g đến 15 g (6 g đến 8 g đối với chén Fibertec P2) cát silica, 0,25 g (0,15 g đối với chén Fibertec P2) bông thủy tinh và tấm vi sợi thủy tinh (Whatman GF/D 4,25 cm hoặc loại tương đương)<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Ví dụ này là sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu chúng cho cùng một kết quả.

## TCVN 9590:2013

9.3.4 Nếu thấy các giọt chất béo nổi trên bề mặt dung dịch ND hoặc nước rửa và mẫu khó lọc, hoặc nếu đã biết trước là mẫu chứa chất béo trên 10 %, thì cần chiết sơ bộ mẫu đó bằng axeton hoặc ete (xem 9.1.2 hoặc 9.2.2).

9.3.5 Nếu mẫu chứa các hạt mịn, chất vón cục kết tủa, bụi bẩn (đất sét) hoặc chất thải, nhưng không phải là pectic hoặc tinh bột, thì tăng thời gian ngâm tối đa 2 min sau khi tháo chén ra khỏi bình hồi lưu và cho chất trợ lọc vào chén nung. Các chất trợ lọc (tốt nhất nên sử dụng) gồm: tám vi sợi thủy tinh, sợi gốm, 12 g đến 15 g cát silica và 0,25 g bông thủy tinh. Có thể cạo nhẹ bề mặt tám vi sợi để làm mới lại bề mặt trong quá trình lọc.

9.3.6 Nếu tất cả các cách cải tiến này đều không thành công, thì giảm lượng mẫu thử đến 0,3 g và lặp lại phép phân tích với chất trợ lọc trong chén nung. Việc giảm lượng mẫu sẽ ảnh hưởng đáng kể đến sai số cân và làm tăng sự dao động về kết quả. Đôi khi việc giảm lượng mẫu và tăng lượng dung dịch ND lên 70 ml đến 100 ml sẽ có ích trong việc xác định. Nếu hàm lượng chất xơ nhỏ hơn 1,5 %, thì không giảm lượng mẫu; nếu không thể lọc được, thì báo cáo kết quả là: "khó phân tích, hàm lượng chất xơ nhỏ hơn 1,5 %".

9.3.7 Không được thêm axeton trước khi loại bỏ hết nước tráng. Mặc dù việc này đôi khi cải thiện được khả năng lọc, nhưng không loại bỏ được chất tẩy hoặc các chất hòa tan trong chất tẩy ra khỏi cặn. Thêm axeton trước khi loại hết nước rửa sẽ cho hàm lượng xơ không chính xác.

## 9.4 Bảo đảm chất lượng

9.4.1 Duy trì nhật kí chuẩn bị thuốc thử và chuẩn hóa amylaza. Kiểm tra pH của mỗi mẻ hoặc mỗi lô dung dịch ND và chỉnh pH nếu cần. Xác định hoạt tính của mỗi nguồn amylaza và mỗi lô trong dung dịch ND nóng và chỉnh dung dịch làm việc amylaza một cách phù hợp. Kiểm tra hoạt tính của amylaza gốc sáu tháng một lần trong quá trình bảo quản và điều chỉnh dung dịch làm việc amylaza tương ứng.

9.4.2 Đối với 20 đến 30 mẫu đầu tiên khi chạy phân tích, gồm có ít nhất một mẫu chuẩn nội bộ hoặc mẫu kiểm soát chất lượng (QC) và hai mẫu trắng và cứ 20 đến 30 mẫu tiếp theo thì lại thêm một mẫu kiểm soát chất lượng và một mẫu trắng. Mẫu QC phù hợp gồm có: hạt mạch nấu bia, cỏ khô hoặc ngô ủ xilô đã được làm khô ở dưới 60 °C. Các nguyên liệu này nhạy cảm với sự thay đổi về hóa chất và quy trình kỹ thuật, nhưng tốt nhất dùng ngô ủ xi lô vì chứa tinh bột và thành tế bào cở. Độ lệch chuẩn chấp nhận được giữa các phép phân tích lặp lại của mẫu chuẩn phải là  $\pm 1,00$  % aNDF. Dựng biểu đồ các kết quả mẫu kiểm soát chất lượng trên đồ thị kiểm soát X và kiểm tra xu hướng của đồ thị. Các kết quả nằm ngoài giới hạn cảnh báo trên hoặc giới hạn cảnh báo dưới (độ lệch chuẩn là  $\pm 2,00$ ) chứng tỏ hệ thống phân tích có thể có vấn đề. Các kết quả nằm ngoài giới hạn cảnh báo trên hoặc giới hạn cảnh báo dưới có độ lệch chuẩn là  $\pm 3,00$  cho thấy đã mất kiểm soát chất lượng, các kết quả của phép phân tích này phải bị loại bỏ và cần tiến hành phân tích lại. Hai phép phân tích kế tiếp có kết quả nằm ngoài

các giới hạn cảnh báo và giới hạn kiểm soát về một phía của giá trị trung bình cũng cho thấy mất kiểm soát chất lượng.

**9.4.3** Lấy kèm theo ít nhất một bộ mẫu kép trong mỗi lần chạy nếu thực hiện các phép xác định đơn lẻ. Các mẫu kép không được chạy liên tiếp, nhưng một mẫu được chạy ở lúc bắt đầu và một mẫu được chạy cuối cùng. Độ lệch có thể chấp nhận giữa dải phân tích mẫu kép từ 1,50 % aNDF đối với mẫu có aNDF nhỏ hơn 20 % đến 3,00 % aNDF đối với các mẫu có aNDF lớn hơn 70 %.

**9.4.4** Sự thay đổi về khối lượng của chén nung đựng mẫu trắng phải nhỏ hơn 0,010 0 g cả sau khi chiết ND hoặc sau khi tro hóa. Nếu khối lượng của chén nung có mẫu trắng thay đổi nhiều hơn 10 mg, hoặc khối lượng của chén sau khi tro hóa nhỏ hơn khối lượng của chén rỗng, thì do chưa rửa sạch chén hoặc có sai sót trong kỹ thuật cân.

## 10 Tính và biểu thị kết quả

### 10.1 Tính kết quả

Tính hàm lượng aNDF theo khối lượng "như khi nhận được", tính bằng phần trăm ( $w_{\text{aNDF, ar}}$ ) hoặc hàm lượng aNDF theo khối lượng chất khô ( $w_{\text{aNDF, dm}}$ ), tính bằng phần trăm, sử dụng công thức sau:

$$w_{\text{aNDF, ar}} = 100 \times \frac{(m_{\text{ce}} - m_{\text{c}} - m_{\text{be}} + m_{\text{b}})}{m_{\text{s}}}$$

$$w_{\text{aNDF, dm}} = 100 \times \frac{(m_{\text{ce}} - m_{\text{c}} - m_{\text{be}} + m_{\text{b}})}{m_{\text{s}} \times D}$$

Trong đó:

$w_{\text{aNDF, ar}}$  là hàm lượng chất xơ xử lý bằng chất tẩy trung tính và amylaza, tính theo khối lượng như khi nhận được, tính bằng phần trăm (%);

$w_{\text{aNDF, dm}}$  là hàm lượng chất xơ xử lý bằng chất tẩy trung tính và amylaza, tính theo khối lượng chất khô, tính bằng phần trăm (%);

$m_{\text{ce}}$  là khối lượng của mẫu và chén nung sau khi chiết và sấy, tính bằng gam (g);

$m_{\text{c}}$  là khối lượng của chén nung bao gồm cả chất trợ lọc, trước khi cho mẫu vào, tính bằng gam (g);

$m_{\text{s}}$  là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

$m_{\text{b}}$  là khối lượng trung bình đối với chén nung đựng mẫu trắng gồm cả chất trợ lọc, tính bằng gam (g);

## TCVN 9590:2013

$m_{be}$  là khối lượng trung bình đối với chén nung đựng mẫu trắng gồm cả chất trợ lọc sau khi chiết và sấy, tính bằng gam (g);

$D$  là chất khô (khối lượng đã qua sấy/khối lượng mẫu được làm khô bằng không khí hoặc khối lượng mẫu ướt), tính bằng gam (g).

Cách khác, tính aNDF theo khối lượng chất hữu cơ ( $w_{om,ar}$ ) hoặc theo khối lượng chất hữu cơ khô ( $w_{om,dm}$ ), dùng công thức sau đây:

$$w_{om,ar} = 100 \times \frac{(m_{ce} - m_{ca} - m_{be} + m_{ba})}{m_s}$$

$$w_{om,dm} = 100 \times \frac{(m_{ce} - m_{ca} - m_{be} + m_{ba})}{m_s \times D}$$

Trong đó:

$w_{om,ar}$  là aNDF của chất hữu cơ, tính theo khối lượng như khi nhận được, tính bằng phần trăm;

$w_{om,dm}$  là aNDF của chất hữu cơ, tính theo khối lượng chất khô, tính bằng phần trăm;

$m_{ca}$  là khối lượng của chén nung bao gồm cả chất trợ lọc, sau khi tro hóa, tính bằng gam (g);

$m_{ba}$  là khối lượng trung bình đối với chén nung đựng mẫu trắng gồm cả chất trợ lọc, sau khi tro hóa, tính bằng gam (g).

### 10.2 Biểu thị kết quả

Các kết quả phải được báo cáo chính xác đến 0,1 %. Các kết quả nhỏ hơn 1,5 % đối với aNDF hoặc aNDF của chất hữu cơ phải được báo cáo là "aNDF nhỏ hơn 1,5 %" hoặc "aNDF của chất hữu cơ nhỏ hơn 1,5 %".

Khi hàm lượng chất xơ nhỏ hơn 25 %, thì cần hiệu chỉnh mẫu trắng.

Khối lượng của chén nung sau khi tro hóa ( $m_{ca}$ ) mà nhỏ hơn khối lượng chén nung rỗng ( $m_c$ ) cho thấy chén đã bị thất thoát khối lượng trong suốt quy trình xác định aNDF. Khối lượng chén nung sau khi tro hóa ( $m_{ca}$ ) là giá trị chính xác nhất về khối lượng đúng của chén trong việc tính hàm lượng chất xơ và phải được sử dụng để tính aNDF của chất hữu cơ. Trong trường hợp này, aNDF của chất hữu cơ là giá trị chính xác hơn để đánh giá về hàm lượng chất xơ, so với hàm lượng aNDF.

Nếu các kết quả đối với mẫu chuẩn nội bộ hoặc các mẫu kiểm soát chất lượng nằm ngoài các giới hạn kiểm soát, thì không báo cáo kết quả và tiến hành phân tích lại mẫu.

## 11 Độ chụm

### 11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập lấy từ kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm được tiến hành theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm được tóm tắt trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

### 11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, trên vật liệu thử giống hệt nhau, thực hiện trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 1,8 % đến 4,7 % đối với aNDF hoặc lớn hơn 1,4 % đến 5,5 % đối với aNDF của chất hữu cơ, tùy thuộc vào loại mẫu (xem Phụ lục A).

### 11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các người phân tích khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 1,8 % đến 6,2 % đối với aNDF, hoặc lớn hơn 1,0 % đến 8,1 % đối với aNDF của chất hữu cơ, tùy thuộc vào loại mẫu (xem Phụ lục A).

## 12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả thử;
- kết quả thử nghiệm thu được, trong đó nêu rõ các phần aNDF xác định được (ví dụ: aNDF của chất hữu cơ tính theo khối lượng chất khô);
- nếu kiểm tra về độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Phép thử liên phòng thử nghiệm đã được tổ chức AOAC Quốc tế thực hiện vào năm 2001 phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Trong phép thử này, mười ba phòng thử nghiệm tham gia. Mười một mẫu kép mù đã được khảo sát gồm có: cỏ linh lăng (alfalfa) ủ xi lô, hạt mạch nấu bia, bã thịt quả cam quýt và củ cải đường, ngô hạt cả lõi, hạt ngô ủ xi lô, thân cây ngô, thức ăn hỗn hợp cho động vật lấy sữa, cỏ khô, chất thay thế sữa, hạt đậu tương rang và mùn cưa.

**Bảng A.1 – Các kết quả thống kê của phép thử nghiệm liên phòng đối với aNDF**

Thông số	Mẫu <sup>a</sup>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Số phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	13	12	13	12	13	13	12	11	12
Hàm lượng aNDF trung bình, % (mẫu trắng được hiệu chỉnh theo khối lượng chất khô)	40,8	49,2	29,9	21,7	37,2	73,1	12,9	58,2	neg.	13,5	90,0
Độ lệch chuẩn lặp lại, ( $s_r$ ), %	0,9	1,7	1,0	0,6	0,8	0,6	0,8	1,1	0,7	0,8	1,7
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	2,2	3,4	3,4	2,9	2,0	1,4	6,4	1,9	neg.	6,0	1,9
Giới hạn lặp lại, $r [r = 2,8 s_r]$ , %	2,5	4,6	2,8	1,8	2,1	1,8	2,3	3,1	1,8	2,3	4,7
Giá trị Horrat đối với độ lặp lại	1,5	1,5	1,6	1,7	1,3	0,6	3,6	1,3		3,4	1,4
Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ ), %	0,9	2,2	1,4	0,8	0,9	1,1	1,3	1,5	0,7	1,6	2,1
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	2,2	4,4	4,6	3,7	2,4	1,5	10,1	2,6	neg.	11,8	2,4
Giới hạn tái lập ( $R$ ) [ $R = 2,8 s_R$ ], %	2,5	6,2	3,9	2,3	2,4	3,1	3,6	4,3	1,8	4,5	6,0
Giá trị Horrat đối với độ tái lập	0,9	2,0	1,9	1,5	1,0	0,7	3,7	1,2		4,4	1,1
<sup>a</sup> Mẫu 1: Cỏ linh lăng ủ xi lô Mẫu 2: Hạt mạch nấu bia Mẫu 3: Bã thịt quả cam quýt và củ cải đường Mẫu 4: Ngô hạt cả lõi Mẫu 5: Hạt ngô ủ xi lô Mẫu 6: Thân cây ngô neg. = giá trị âm tính Mẫu 7: Thức ăn hỗn hợp cho động vật lấy sữa Mẫu 8: Cỏ khô Mẫu 9: Chất thay thế sữa Mẫu 10: Hạt đậu tương rang Mẫu 11: Mùn cưa											

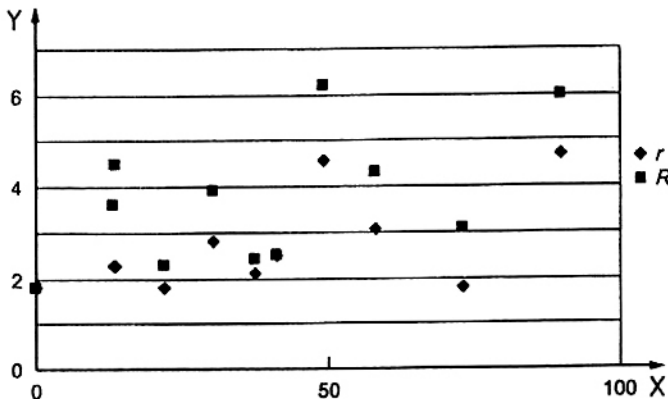


Bảng A.2 – Kết quả thống kê của phép thử nghiệm liên phòng đối với aNDF của chất hữu cơ

Thông số	Mẫu <sup>a</sup>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Số phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	13	12	13	12	13	12	13	13	12	13	12
Hàm lượng aNDF trung bình, % (mẫu trắng được hiệu chỉnh theo khối lượng chất khô)	39,3	48,1	27,4	21,5	36,4	69,4	12,3	55,6	0,11	14,1	88,7
Độ lệch chuẩn lặp lại, ( $s_r$ ), %	0,9	1,8	0,7	0,5	0,6	1,0	0,7	1,9	0,2	2,0	1,9
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	2,3	3,7	2,7	2,3	1,6	1,4	5,7	3,3	195,4	14,0	2,1
Giới hạn lặp lại, $r$ [ $r = 2,8 s_r$ ], %	2,5	5,0	2,1	1,4	1,6	2,8	1,9	5,2	0,6	5,5	5,2
Giá trị Horrat đối với độ lặp lại	1,5	2,5	1,7	1,4	1,0	1,0	3,1	2,3	52,6	7,9	1,6
Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ ), %	1,2	2,3	1,1	0,8	0,9	1,5	1,2	2,2	0,4	2,9	2,1
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	3,1	4,9	3,9	3,5	2,4	2,1	9,5	3,9	340,2	20,6	2,4
Giới hạn tái lập ( $R$ ) [ $R = 2,8 s_R$ ] %	3,4	6,6	3,0	2,1	2,5	4,1	3,3	6,0	1,0	8,1	6,0
Giá trị Horrat đối với độ tái lập	1,3	2,2	1,6	1,4	1,0	1,0	3,5	1,8	61,3	7,7	1,2

<sup>a</sup> Các mẫu tương tự như trong Bảng A.1.

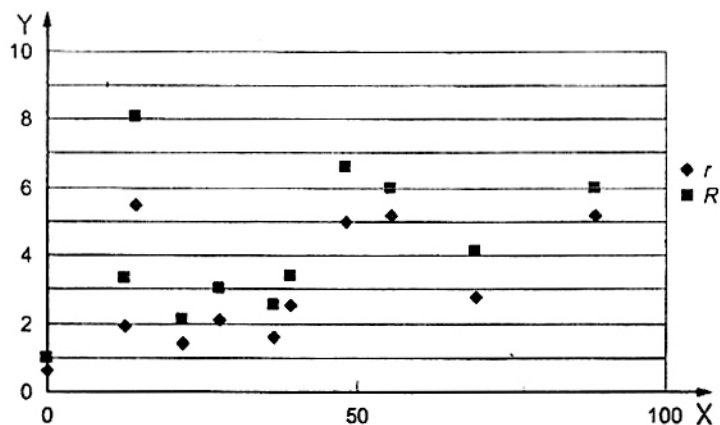
CHÚ THÍCH Giá trị Horrat bằng 1 thường cho thấy độ chụm thỏa mãn, trong khi giá trị lớn hơn 2 cho thấy độ chụm không thỏa mãn, có nghĩa là: độ chụm đó quá biến động đối với hầu hết các mục đích phân tích hoặc sự biến động thu được lớn hơn dự kiến đối với loại phương pháp đã áp dụng.



## CHÚ DẪN

- X giá trị trung bình của aNDF, %.  
Y giá trị độ chụm, %.

Hình A.1 – Mối liên quan giữa giá trị độ chụm ( $r$ ,  $R$ ) và giá trị trung bình đối với aNDF



**CHÚ DẪN**

X giá trị trung bình của aNDF của chất hữu cơ, %

Y giá trị độ chụm, %

**Hình A.2 – Mối liên quan giữa giá trị độ chụm ( $r, R$ ) và giá trị trung bình của aNDF của chất hữu cơ**

Phụ lục B  
(Tham khảo)

**Chuẩn hóa dung dịch làm việc alpha-amylaza bền nhiệt**

Dung dịch alpha-amylaza bền nhiệt hoặc dịch chiết bột enzyme có thể được chuẩn hóa bằng phương pháp sau đây, sao cho hai lần thêm, mỗi lần 2 ml dung dịch sẽ loại bỏ hết tinh bột ra khỏi 0,5 g tinh bột ngô nguyên liệu.

- a) Cân 0,5 g  $\pm$  0,005 g bột ngô khô, đã được nghiền vào mỗi bình trong loạt sáu bình giống như bình sử dụng để chiết xơ còn lại.
- b) Làm nóng sơ bộ bình hồi lưu đã được hiệu chuẩn, chuẩn bị bể đá lạnh để làm nguội các bình (bể chứa đủ đá lạnh để duy trì nhiệt độ dưới 1 °C) và chuẩn bị bể ổn nhiệt (bể đáy phẳng chứa đủ nước có nhiệt độ chính xác 20 °C đủ để ngâm ngập dung dịch trong bình).
- c) Thêm vào bình 50 ml dung dịch ND (**KHÔNG ĐƯỢC** cho natri sulfit), xoay bình, đặt lên thiết bị hồi lưu được làm nóng sơ bộ ở khoảng thời gian 1 min.
- d) Sau khi dung dịch ND bắt đầu sôi (khoảng 5 min), thêm một trong số sáu dung dịch gốc hoặc dung dịch chiết từ bột (pha loãng theo cấp số nhân; ví dụ: 0 ml, 0,025 ml, 0,05 ml, 0,10 ml, 0,20 ml và 0,40 ml; liều chính xác tùy thuộc vào nguồn amylaza) vào các bình theo thứ tự nồng độ tăng dần.
- e) Cho hồi lưu trong 10 min, cứ 1 min hút một lần, cho thêm liều amylaza thứ hai (đúng bằng lần đầu), xoay bình, dùng một lượng tối thiểu dung dịch ND nhiệt độ phòng để tráng thành bình.
- f) Để cho liều enzyme phản ứng trong 60 s và lọc qua bông thủy tinh hoặc lọc qua hai lớp vải thưa vào cốc có mỏ bằng thủy tinh dung tích 100 ml. Chuẩn bị mẫu trắng bằng cách cho hai liều trung gian này vào 40 ml ND nhiệt độ phòng đựng trong cốc có mỏ bằng thủy tinh dung tích 100 ml.
- g) Đặt các cốc có mỏ, ngoại trừ cốc đựng mẫu trắng, vào bể đá lạnh. Sau 5 min, lấy cốc ra khỏi bể (nhiệt độ của dung dịch phải khoảng 1 °C) và cho toàn bộ cốc vào bể ổn nhiệt (20 °C).
- h) Khi nhiệt độ của dung dịch ở 20 °C  $\pm$  0,5 °C (có thể sau 5 min hoặc lâu hơn), lấy cốc ra khỏi bể ổn nhiệt và xếp các chén trên nền trắng theo thứ tự nồng độ enzyme tăng dần.
- i) Thêm nhanh 0,5 ml dung dịch iốt vào các cốc và trộn.
- j) Không quan sát các cốc ngay. Sau 90 s, nhìn xuyên qua dung dịch trong cốc từ phía trên và quyết định nhanh (trước 120 s) về màu sắc của mỗi dung dịch, dùng thước đo sau:

## TCVN 9590:2013

- dung dịch màu tím có nghĩa là không đủ enzym;
- dung dịch màu hồng hổ phách hoặc dung dịch màu hổ phách có nghĩa là không đủ enzym; và
- dung dịch màu vàng nhạt có nghĩa là đủ enzym

(so sánh với mẫu trắng; màu nâu nhạt của dung dịch enzym không được nhầm với màu hồng hổ phách hoặc màu hổ phách).

Nếu sự khác biệt về màu sắc không rõ ràng, thì đặt các cốc vào bể ổn nhiệt trong 5 min và lặp lại các bước từ h) đến j).

k) Sau khi liều enzym thấp nhất có màu vàng nhạt ( $V_2$ ) và liều thấp nhất sau đó ( $V_1$ ) có màu hồng hổ phách hoặc màu hổ phách xác định bằng phép hồi quy thì tiến hành chuẩn hóa lần cuối bằng cách dùng liều thấp hơn liều có màu hồng hổ phách một cấp ( $V_{.1}$ ) và liều của chuỗi hồi quy tuyến tính ( $0,25 V_1$ ) giữa  $V_1$  và  $V_2$  [ ví dụ: nếu xử lý bằng 0,05 ml cho màu hổ phách ( $V_1$ ) và xử lý bằng 0,10 ml cho màu vàng nhạt ( $V_2$ ), thì sử dụng các liều: 0,025 ml, 0,05 ml, 0,062 5 ml, 0,075 ml, 0,087 5 ml và 0,1 ml] dung dịch gốc trong phép chuẩn hóa cuối cùng.

l) Liều thấp nhất dung dịch cho màu vàng nhạt (và vượt quá liều không đầy đủ kế tiếp cao nhất với dung dịch có màu hồng hổ phách hoặc màu hổ phách) tương ứng với thể tích dung dịch gốc amylaza hoặc dịch chiết ( $V_3$ ) là được sử dụng để làm dung dịch làm việc amylaza.

m) Ghi ngày và mẻ hoặc lô amylaza, liều đã thử nghiệm, hàm lượng dung dịch iốt được sử dụng, màu sắc và nhiệt độ cuối cùng (trước khi thêm iốt) của mỗi liều vào trong sổ theo dõi thuốc thử.

n) Xác định số lượng ( $n$ ) mẫu cần phân tích trong 5 ngày sau đó hoặc ít hơn. Để thêm 2 ml dung dịch làm việc amylaza hai lần vào mỗi mẫu, thì cần tổng thể tích dung dịch làm việc amylaza là  $n \times 4$  ml. Trộn  $n(2V_3)$  ml dung dịch gốc amylaza với  $n(4 - 2V_3)$  ml nước. Bảo quản dung dịch làm việc amylaza trong tủ lạnh trong thời gian không quá 5 ngày, dùng bình chứa có nắp đậy.

o) Khẳng định sự phù hợp của dung dịch làm việc amylaza bằng cách lặp lại quy trình chuẩn hóa, dùng bột ngô khô với 0 ml, 2 ml và 4 ml dung dịch làm việc (mỗi lượng này được cho vào khi đang sôi và sau khi tháo bình ra khỏi thiết bị hồi lưu. Nếu không có sự khác biệt rõ về màu sắc giữa 2 ml và 4 ml dung dịch làm việc, thì thêm hai lần mỗi lần 2 ml là đủ đối với phương pháp xác định aNDF.

Thời gian và nhiệt độ là tiêu chí để đánh giá việc đủ liều amylaza. Các dung dịch phải ở 20 °C và quyết định về màu sắc phải được đưa ra trong vòng 90 s đến 120 s sau khi thêm dung dịch iốt. Màu hồng hổ phách hoặc màu hổ phách bị nhạt màu nhanh và việc chờ hơn 120 s trước khi quyết định sẽ làm cho liều quá thấp.

Liều ban đầu của dung dịch gốc hoặc của dịch chiết có thể cần chỉnh và chuẩn hóa lại. Nếu liều tối đa (0,4 ml) mà tạo ra màu đỏ tím hoặc hồng hổ phách, thì bắt đầu pha theo cấp số nhân ở liều 0,4 ml và tiến hành chuẩn hóa lại. Nếu liều tối thiểu (0,025 ml) có màu vàng, thì giảm dần cấp số nhân đến giữa 0 ml và 0,025 ml rồi tiến hành chuẩn hóa lại.

Mỗi nguồn hoặc lô enzym mới đều phải được chuẩn hóa và nếu chỉ có một lô đơn lẻ được sử dụng trong suốt thời gian đó thì lô phải được kiểm tra sáu tháng một lần về hoạt tính. Việc tăng quá lượng enzym là không có lợi và có thể gây hại. Không nên sử dụng dung dịch enzym đậm đặc làm dung dịch làm việc bởi vì nếu chỉ gây lỗi một giọt khi cho vào mẫu enzym chứa hoạt tính cao sẽ ảnh hưởng đến kết quả. Nhiều dịch chiết amylaza là hỗn hợp thô, chúng có thể có hoạt tính fibrolytic và proteolytic. Dung dịch amylaza bền nhiệt nên sử dụng trong dịch nóng (lớn hơn 80 °C) để làm bất hoạt các enzym nhiễm bẩn và giảm thiểu sự thất thoát xơ.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Goering, H.K. and Van Soest, P.J. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). USDA Agricultural Research Service Handbook No. 379. Washington, DC, 1970.
  - [2] Hintz, R.W., Mertens, D.R. and Albrecht, K.A. J. AOAC Inter. 79, 1996, pp. 16-22.
  - [3] Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. Biometry, W.H. Freeman and Company, NY, 2nd edn., 1981, p. 151.
  - [4] Van Soest, P.J. and Robertson, J.B. Analysis of Forages and Fibrous Foods, A Laboratory Manual. Cornell University, Ithaca, NY, 1987.
  - [5] Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. J. Dairy Sci. 74, 199-1, pp. 3583-3597.
  - [6] Mertens, D.R. J. AOAC Int. 85, 2002, pp. 1217-1240.
  - [7] Official Methods of Analysis, AOAC, Arlington, VA, Method 2002.04.
  - [8] 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.*
  - [9] 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.*
  - [10] TCVN 4325 (ISO 6497) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.*
-