

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7907 : 2013

ISO 15174-2012

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –
CHẤT LÀM ĐÔNG TỤ SỮA TỪ VI SINH VẬT –
XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘNG ĐÔNG TỤ SỮA TỔNG SỐ**

*Milk and milk products – Microbial coagulants –
Determination of total milk-clotting activity*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 7907:2013 thay thế TCVN 7907:2008;

TCVN 7907:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 15174:2012;

TCVN 7907:2013 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

Các chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật thu được từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau, các nguồn phổ biến nhất là *Rhizomucor miehei* (EC 3.4.23.23), *Rhizomucor pusillus* (EC 3.4.23.23) và *Cryphonectria parasitica* còn gọi là *Endothia parasitica* (EC 3.4.23.22).

Mỗi loại enzym này có đặc tính riêng như là hoạt tính đông tụ sữa và đặc tính chế biến phomat có liên quan. Chúng khác nhau về độ nhạy cảm nhiệt độ và độ nhạy cảm pH, độ nhạy cảm với các ion canxi của các enzym này ảnh hưởng đến tốc độ hình thành gel sữa.

Vì những lý do thực tiễn và kinh tế, điều quan trọng là cần có phương pháp quốc tế để xác định hoạt độ đông tụ sữa tổng số của các chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật tương ứng với chuẩn đối chứng được công nhận ở cấp quốc tế. Cũng vì lý do thực tế mà quyết định sử dụng enzym *Rhizomucor miehei* làm chất chuẩn đối chứng đông tụ vi khuẩn đối với tất cả các loại chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật.

Phương pháp này phù hợp với phép thử hoạt độ đông tụ sữa tương đối của các rennet bò quy định trong ISO 11815.

Phép định lượng các chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật trong mẫu có thể được thực hiện theo TCVN 10021 (ISO 15163) [7], Phụ lục A. Đối với các hỗn hợp enzym đông tụ khác nhau, chưa có phép xác định chính xác hoạt độ đông tụ sữa tổng số đối với mẫu.

Sữa và sản phẩm sữa - Chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật - Xác định hoạt độ đông tụ sữa tổng số

*Milk and milk products - Microbial coagulants -
Determination of total milk-clotting activity*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp so sánh hoạt độ đông tụ sữa tổng số của mẫu chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật với hoạt độ đông tụ sữa của chất chuẩn đối chứng quốc tế làm đông tụ sữa từ vi sinh vật trên cơ chất sữa chuẩn được chuẩn bị với dung dịch canxi clorua nồng độ 0,5 g/l (pH ≈ 6,5).

2 Nguyên tắc

Xác định thời gian cần thiết để ngưng kết 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 chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật được so sánh với thời gian đông tụ của chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật có hoạt độ đông tụ sữa đã biết, trong các điều kiện vật lý và hóa học giống nhau.

3 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.

3.1 Dung dịch đệm, pH 5,5

Dùng pipet (4.1) lấy 10,0 ml dung dịch axit axetic (CH_3COOH) 1 mol/l cho vào 10,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) và trộn. Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml. Chỉnh pH đến 5,5, bằng dung dịch axit axetic 1 mol/l hoặc dung dịch natri axetat 1 mol/l, nếu cần.

TCVN 7907:2013

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

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 sẵn trong thương mại¹⁾. 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).

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

Sử dụng tỷ trọng của dung dịch gốc canxi clorua (3.2) để tính khối lượng canxi clorua cần thiết để thu được nồng độ cuối cùng của dung dịch làm việc là 0,5 g/l 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 $\rho(\text{CaCl}_2) = 500 \text{ g/l}$; trong trường hợp này khối lượng dung dịch là $\approx 2,70 \text{ g}$.

Nên cân dung dịch gốc canxi clorua (3.2) 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 (3.2) 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 2 000 ml và trộn. Chuẩn bị dung dịch canxi clorua mới trong ngày sử dụng.

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

3.4 Bột sữa sấy phun có hàm lượng chất béo thấp được sấy 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 được sấy nhiệt thấp đáp ứng được các yêu cầu, có bán sẵn trên thị trường¹⁾²⁾

3.5 Bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (*Rhizomucor miehei*) đựng trong các ống thủy tinh. Hoạt độ đông tụ sữa tổng số chính xác được ghi trên các ống thủy tinh.

Bảo quản bột chất chuẩn làm đông tụ sữa từ vi sinh vật ở nơi tối ở - 18 °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.

¹⁾ Chr. Hansen's A/S, 1-27 Jernholmen, 2650 Hvidovre, Đan mạch là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

²⁾ Cecalait, Poligny, Pháp, là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

Bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật là 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.

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số của bột chất chuẩn đối chứng quốc tế làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (*R. miehei*) là lượng hoạt độ tương ứng với mẻ thứ nhất của bột chất chuẩn đối chứng quốc tế của rennet bé, được xác định có chứa 1 000 IMCU/g (xem ISO 11815)^[6].

CHÚ THÍCH 1: Hoạt độ đông tụ sữa tổng số được biểu thị bằng phần trăm trung bình của các kết quả.

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số của bột chất chuẩn đối chứng quốc tế làm đông tụ sữa từ vi sinh vật được ghi trên ống thủy tinh và/hoặc trong giấy chứng nhận đi kèm. Đây là yêu cầu đối với việc chuẩn bị các chất chuẩn đối chứng tiếp theo để đảm bảo liên kết với mẻ trước của chất chuẩn.

CHÚ THÍCH 2 Hoạt độ phân giải protein tổng số (đông tụ sữa) của bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật, cứ đến năm thứ hai lại kiểm tra bằng phương pháp loại trừ, ví dụ trên cơ chất hexapeptit tổng hợp do NIZO thực hiện³⁾.

Bột chất chuẩn đối chứng quốc tế làm đông tụ sữa từ vi sinh vật có bán sẵn trên thị trường, do cơ quan chuyên ngành thực phẩm DSM cung cấp⁴⁾.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 **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 %.

4.2 **Pipet một vạch**, phù hợp với loại A của TCVN 7151 (ISO 648)^[1], 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 tương tự để pha loãng chất đông tụ. 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 %.

4.3 **Bình định mức một vạch**, phù hợp với loại A của TCVN 7153 (ISO 1042)^[3], với dung tích thích hợp.

4.4 **Nhiệt kế**, đã được hiệu chuẩn, được chia vạch từ 20 °C đến 45 °C, có độ chính xác $\pm 0,1$ °C.

³⁾ Cơ quan nghiên cứu thực phẩm NIZO, Ede, Hà Lan là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

⁴⁾ Cơ quan chuyên ngành thực phẩm DSM, tập đoàn sản xuất bơ sữa, Delft, Hà Lan là ví dụ về nhà cung cấp thích hợp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

TCVN 7907:2013

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

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

4.7 Đồng hồ bấm giờ, có thể đọc đến đơn vị giây.

4.8 Bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm, có dung tích thích hợp, để kiểm tra sự đồng tụ sữa (xem 7.4).

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

4.9.1 Mô tơ điện, có trục quay được lắp với bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm (4.8), 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, tốc độ quay không quan trọng, tốc độ từ 2 r/min đến 4 r/min là thích hợp.

4.9.2 Đèn điện, được đặt ở vị trí sao cho chiếu sáng được toàn bộ bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm (4.8) một cách hiệu quả.

CHÚ THÍCH: 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.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật dạng lỏng (6.1) theo Điều 9 của TCVN 6400 (ISO 707) và chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật dạng bột (6.2) theo Điều 13 của TCVN 6400 (ISO 707)^[2].

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.

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

6 Chuẩn bị mẫu thử

6.1 Chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật dạng lỏng

Vừa trộn mẫu thử vừa khuấy, 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 chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.3).

Chất làm đông vi khuẩn dạng lỏng thường ở dạng đặc sánh. Khi sử dụng pipet, cần dùng kỹ thuật chính xác. Cách khác, có thể chuẩn bị các dung dịch pha loãng chính xác, đặc biệt là đối với các chất làm đông có độ nhớt cao. Cân các mẫu dạng lỏng bằng cân phân tích chia cho thể tích bằng mililit, chia cho khối lượng để có được tỷ trọng của chất làm đông được sử dụng.

6.2 Chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật 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 chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.3).

CHÚ THÍCH: Các sản phẩm dạng bột có thể tách rất nhanh.

Xem xét khối lượng của phần mẫu thử cần được lấy từ mẫu thử. Thông thường các phần mẫu thử từ 3 g đến 5 g là đủ. Tuy nhiên, khi kiểm tra các mẫu thử không đồng nhất và yêu cầu các kết quả thử nghiệm chính xác thì cần có các phần mẫu lớn hơn.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị cơ chất

Cho 1000 ml dung dịch làm việc canxi clorua (3.3) đến vạch mức của bình định mức một vạch 1000 ml (4.3).

Cân 110 g bột sữa sấy phun có hàm lượng chất béo thấp, được xử lý nhiệt thấp (3.4), chính xác đến 0,1 g cho vào cốc có mỏ 2 000 ml. Thêm khoảng 100 ml trong số 1000 ml dung dịch làm việc canxi clorua vào bột đựng trong cốc có mỏ. Khuấy bằng tay để thu được hỗn hợp đồng nhất.

Từ bình định mức một vạch 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, thật cẩn thận để tránh tạo bọt.

Để cơ chất thu được ở nơi tối 30 min ở nhiệt độ phòng. Có thể giữ cơ chất ở nơi tối ở nhiệt độ phòng không quá 4 h hoặc có thể giữ lạnh trong khi chuẩn bị, nếu cần.

CHÚ THÍCH pH của cơ chất đã chuẩn bị phải ở khoảng 6,50. pH không phải là tới hạn và không cần phải điều chỉnh.

7.2 Chuẩn bị dung dịch đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật

7.2.1 Dung dịch chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật

Hoà tan bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (3.5) theo chỉ dẫn dưới đây:

TCVN 7907:2013

Để ống thủy tinh chứa bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật cân bằng đến nhiệt độ phòng (từ 18 °C đến 22 °C) trước khi mở để tránh bột hút ẩm.

Mở ống và cân lượng bột chất chuẩn làm đông tụ sữa từ vi sinh vật, chính xác đến 1 mg, có chứa 2 500 IMCU cho vào bình định mức một vạch 50 ml (4.3). Thêm từ 15 ml đến 20 ml dung dịch đệm (3.1) và trộn bằng cách xoay để hoà tan bột, tránh tạo bọt. Pha loãng đến vạch 50 ml bằng dung dịch đệm (3.1) và trộn kỹ.

CHÚ THÍCH: Trong TCVN 7907:2008 (ISO 15174:2002) và ISO 11815⁽⁶⁾ sử dụng bột chất chuẩn đối chứng (3.5) khoảng 1 000 IMCU/g và quy định lượng cân là 2 500 g bột có chứa khoảng 2 500 IMCU tổng số. Để sản xuất mẻ thứ hai, không thể đạt được lượng quy định 1 000 IMCU/g. Do đó, con số 2 500 IMCU được giữ lại và chỉnh lượng cân tùy thuộc vào tổng hoạt độ đông tụ sữa của bột chất chuẩn đối chứng. Ví dụ, nếu chất chuẩn đối chứng có hoạt độ đông tụ sữa tổng số là 2 200 IMCU/g, thì lượng cân là 1,136 g (2500/2200) bột chất chuẩn.

7.2.2 Dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật

Để thu được thời gian đông tụ phù hợp, dùng pipet lấy 3 ml dung dịch chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.2.1) cho vào một bình định mức một vạch 50 ml khác. Pha loãng đến vạch 50 ml bằng dung dịch đệm (3.1) và trộn kỹ.

CHÚ THÍCH Thời gian đông tụ dự tính đối với dung dịch làm việc đối chứng phải nằm trong khoảng từ 350 s đến 550 s.

Giữ dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C (trên đá lạnh) và sử dụng trong ngày chuẩn bị.

7.3 Chuẩn bị dung dịch thử chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật

Lấy một lượng mẫu thử thích hợp (khoảng từ 3 g đến 5 g mẫu dạng bột) từ mẫu thử đã chuẩn bị (6.1 hoặc 6.2). Pha loãng phần mẫu thử bằng dung dịch đệm (3.1) đến khi thu được dung dịch thử làm đông tụ sữa từ vi sinh vật có thời gian đông tụ giống với thời gian đông tụ của dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.2.2) với sai lệch 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 (8.1).

7.4 Đông tụ

7.4.1 Dùng pipet (4.2) lấy 25 ml $\pm 0,1$ ml cơ chất (7.1) cho vào bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm khô (4.8). 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 (4.9). Ngay sau đó dùng micropipet (4.1) lấy nhanh 0,5 ml dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.2.2) cho vào cơ chất. Bật luôn đồng hồ bấm giờ (4.7). Trộn bằng cách xoay, tránh tạo bọt và gắn ngay bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm vào trục quay.

Đọc thời gian đông tụ trên đồng hồ khi quan sát thấy sự ngưng kết đầu tiên trong màng cơ chất trên thành bình thử nghiệm hoặc ống nghiệm.

Luôn đặt các phần mẫu thử gần các mẫu đối chứng trong nồi cách thủy, để có cùng điều kiện như nhau. Phương pháp này cho kết quả tương quan. Việc duy trì nhiệt độ (làm đông) giống nhau đối với các mẫu thử và các mẫu đối chứng là rất quan trọng. Để kiểm tra sự đáp ứng yêu cầu ở trên, kiểm tra nhiệt độ bằng cách đo nhiệt độ của các mẫu sữa ở các vị trí khác nhau trong nồi cách thủy. Nếu sai lệch nhiệt độ tối đa cho phép trong nồi cách thủy $\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (xem 4.9), thì cần cải tiến thiết kế của nồi cách thủy hoặc cải thiện hệ thống tuần hoàn nước.

7.4.2 Lập lại ngay quy trình 7.4.1 nhưng thay dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.2.2) bằng dung dịch thử chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.3).

7.4.3 Lập lại ngay các thao tác trong 7.4.1 và 7.4.2 để thu được hai kết quả. Tính trung bình của thời gian đông tụ tương ứng với dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật và dung dịch thử chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật.

CHÚ THÍCH: Thay 25 ml cơ chất và 0,5 ml dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật trong 7.4.1 bằng 10 ml cơ chất và 0,2 ml dung dịch làm việc hoặc có thể sử dụng 50 ml cơ chất và 1,0 ml dung dịch làm việc. Tuy nhiên, điều quan trọng là tỷ lệ giữa cơ chất và dung dịch làm việc phải là 50:1.

8 Tính và biểu thị kết quả

8.1 Tính kết quả

Tính hoạt độ đông tụ sữa tổng số của mẫu thử được so sánh với bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ vi khuẩn, a_r , được biểu thị bằng đơn vị đông tụ sữa quốc tế (IMCU) trên gam hoặc trên mililit, theo công thức sau đây:

$$a_r = \frac{t_r m_r V_1 d a_r}{t_r V_2 V_3} \quad (1)$$

Trong đó:

t_r là thời gian đông tụ trung bình thu được với dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.4.1 và 7.4.3), tính bằng giây (s);

m_r là khối lượng chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật đã cân được trong 7.2, tính bằng gam (g);

V_1 là thể tích đã lấy trong 7.2 từ dung dịch chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật, tính bằng mililit ($V_1 = 3\text{ ml}$);

d là giá trị cuối cùng của hệ số pha loãng thu được với dung dịch thử nghiệm (7.3);

a_r là hoạt độ đông tụ sữa (nồng độ) của bột chất chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (3.5), tính bằng IMCU/g; giá trị này được ghi trên ống thủy tinh đựng bột chuẩn;

t_i là thời gian đông tụ trung bình thu được với dung dịch thử chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (7.4.2 và 7.4.3), tính bằng giây;

V_2 là thể tích cuối cùng trong 7.2.1 từ dung dịch chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật, tính bằng mililit ($V_2 = 50$ ml);

V_3 là thể tích cuối cùng trong 7.2.2 từ dung dịch làm việc đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật, tính bằng mililit ($V_3 = 50$ ml);

Công thức (1) này có thể lược giản thành Công thức (2) bằng cách đưa luôn con số như sau: $V_1 = 3$ ml; $V_2 = 50$ ml; $V_3 = 50$ ml.

$$a_r = \frac{t_r m_r \times 0,0012 \times da_r}{t_i} \quad (2)$$

8.2 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.

9 Độ chụm

9.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các giá trị đã nêu.

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ các độ lệch chuẩn, s_d , là các giá trị ước tính của độ lệch chuẩn đúng của phương pháp. Nếu khi thực hiện trong thời gian dài, có ít hơn 95 % các trường hợp nằm trong các giá trị nêu trong 9.2 và 9.3, thì nên cải tiến trình tự của phương pháp.

Do có sự khác nhau về độ hòa tan và độ không đồng nhất của mẫu dạng bột, mà các phần trăm về thông số độ chụm, độ lặp lại, độ tái lập đề cập dưới đây có phần nào cao hơn khi phân tích mẫu bột chất làm đông.

Phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp đã được tiến hành sử dụng các chuẩn đối chứng làm đông tụ sữa từ vi sinh vật đối với mỗi loại chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật (tương ứng đối với *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* và *Cryphonectria parasitica*).

Vi các lý do thực tế mà người ta quyết định rằng một chất chuẩn đối chứng làm đồng tụ sửa từ vi sinh vật cũng có thể đủ cho mục đích của phương pháp, nhưng không có phép thử liên phòng thử nghiệm nào đã thực hiện mà chỉ sử dụng một chất chuẩn đối chứng làm đồng tụ sửa từ vi sinh vật. Tuy nhiên, vẫn hy vọng rằng độ chụm của phương pháp ít nhất sẽ phải đạt như trong phương pháp này.

9.2 Độ lặp lại

Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, tính bằng phần trăm, biểu thị độ biến thiên các kết quả phân tích độc lập 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 2,0 % trung bình của các kết quả thử nghiệm.

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 được vượt quá 5,5 % trung bình của các kết quả.

9.3 Độ tái lập

Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, tính bằng phần trăm, biểu thị độ biến thiên các kết quả phân tích độc lập 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 5,6 % trung bình của các kết quả thử nghiệm.

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 được vượt quá 15,7 % trung bình của các kết quả.

CHÚ THÍCH: Các thông số về độ chụm có giá trị khi có nhiều phòng thử nghiệm tham gia. Kinh nghiệm cho thấy các phòng thử nghiệm đã được đào tạo có thể cho độ tái lập 2 %.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- 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;
- f) 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 15 phòng thử nghiệm của chín nước tham gia, thực hiện trên các mẫu làm đông tụ sữa từ vi sinh vật. Phép thử này do A. Andrén, Thụy Điển tổ chức thực hiện. Các kết quả thử nghiệm đã được phân tích thống kê⁵⁾ theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)⁶⁾.

A.2 Mẫu thử và kết quả

Phép thử liên phòng thử nghiệm này đã thực hiện trên ba chế phẩm làm đông tụ sữa từ vi sinh vật dạng lỏng khác nhau của *Rhizomucor miehei* (Rm, không chịu nhiệt), *Rhizomucor pusillus* (Rp) hoặc *Cryphonectria parasitica* (Cp). Mỗi chế phẩm đã được chia thành hai phần, một phần được pha loãng đến 85 % (Rm), 75 % (Rp) hoặc 65 % (Cp) nồng độ ban đầu. Sáu mẫu thu được này được chia làm hai, cho 12 mẫu mù lặp lại.

CHÚ THÍCH 1: *R. miehei* ở thời điểm nghiên cứu liên phòng có tên là *Mucor miehei* và được viết tắt là Mm.

CHÚ THÍCH 2: *C. parasitica* ở thời điểm nghiên cứu liên phòng có tên là *Endothia parasitica* và được viết tắt là Ep.

Phép thử liên phòng thử nghiệm này đã thực hiện sử dụng chất chuẩn đối chứng đối với mỗi loại chất làm đông tụ sữa từ vi sinh vật, còn đối với lần xuất bản này chỉ sử dụng một chất chuẩn đối chứng. Điều này chỉ cho sự chênh lệch không đáng kể về kết quả, điều quan trọng là tất cả các phòng thử nghiệm đều sử dụng cùng một phương pháp và cùng chất chuẩn đối chứng.

Các kết quả nêu trong Bảng A.1 thu được từ phép thử liên phòng thực hiện năm 1993⁶⁾. Các kết quả trong Bảng A.1 không bao gồm phòng thử nghiệm số 10 đối với các mẫu 7/11 (Cochran) và 9/12 (Cochran) và phòng thử nghiệm số 14 đối với các mẫu 1/5 (Cochran và Grubbs) và 3/6 (Grubbs).

⁵⁾ Các kết quả thu được sử dụng ISO 5725:1986 (đã được thay thế)

⁶⁾ Các kết quả thu được từ nghiên cứu liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725:1986 (đã được thay thế), nhưng được phân tích thống kê⁵⁾ theo TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994) và TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994).

Bảng A.1 – Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Mẫu số	Chất làm đồng	Trung bình IMCU/ml	$C_{V,r}$ %	r	r (tương đối) %	$C_{V,R}$ %	R	R (tương đối) %	Ngoại lệ
8/10	Rm 100 %	208,6	3,1	17,9	8,6	3,6	20,9	10,0	1 (Cochran, Grubbs)
1/5	Rm 85 %	178,7	1,4	7,2	4,0	4,0	20,1	11,3	
2/4	Rp 100 %	422,3	1,9	21,9	5,2	8,2	97,3	23,0	
9/12	Rp 75 %	312,8	2,3	20,0	6,4	9,2	80,8	25,8	1 Cochran
7/11	Cp 100 %	232,1	1,5	9,8	4,2	5,3	34,6	14,9	1 Cochran
3/6	Cp 65 %	154,9	1,7	7,4	4,8	3,2	13,9	9,0	1 Grubbs
Trung bình			2,0		5,5	5,6		15,7	

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7151 (ISO 648) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức*
- [2] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
- [3] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức.*
- [4] 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.*
- [5] 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.*
- [6] ISO 11815 *Milk – Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets*
- [7] TCVN 10021 (ISO 15163), *Sữa và sản phẩm sữa – Rennet từ bê và bò trưởng thành – Xác định hàm lượng chymosin và pepsin bỏ bằng sắc kí.*
- [8] International Collaborative Study on Microbial Coagulants – Determination of total milk-clotting activity. *Bull. IDF (in press).*
-