

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.090 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 25/10/2018 Trang: 1/6
--	--	---

**ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN TIÊU HÓA TRONG THỨC ĂN
CHĂN NUÔI**
**(DETERMINATION OF DIGESTIBLE PROTEIN IN
ANIMAL FEEDING STUFFS)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Phạm Thị Kim Cúc	Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	15/10/2017
2	D.2	Ghi rõ cách sử dụng nồng độ pepsin	25/10/2018

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.090 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 25/10/2018 Trang: 2/6</p>
--	--	---

A. GIỚI THIỆU

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng protein tiêu hóa trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp Kjeldahl.

Phương pháp này không áp dụng cho nền mẫu thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ rau.

2. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: AOAC 971.09

3. Nguyên tắc

Mẫu sau khi loại béo được ủ 16 tiếng với dung dịch pepsin 0.2% ở nhiệt độ 45°C và khuấy trộn liên tục. Sau thời gian ủ, mẫu được lọc và phần cặn được đem đi xác định protein. Hàm lượng protein tiêu hóa là hiệu số giữa protein tổng và protein có trong phần cặn.

B. THÔNG TIN AN TOÀN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.

Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

C. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ

1. Thiết bị

- Bếp đun cách thủy
- Máy khuấy từ
- Bộ lọc chân không
- Bộ phá mẫu kjeldahl (ống kjeldahl 250ml và bếp gia nhiệt tới 420°C).
- Máy chưng cất kjeldahl.
- Buret 25ml.
- Erlen 250ml.
- Pipet vạch, bầu và micropipet các loại
- Dụng cụ thủy tinh các loại

D. HÓA CHẤT VÀ DUNG DỊCH THỬ

1. Hóa chất

- HCl 0.075M
- Pepsin: có hoạt độ 1:10000 = 1.67U/mg FIP. Kiểm tra hoạt độ pepsin theo phương pháp nêu trong phụ lục.
- H₂SO₄ đđ.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.090 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 25/10/2018 Trang: 3/6
---	----------------------------------	---

- d. K_2SO_4
- e. $CuSO_4$
- f. NaOH
- g. Methyl đỏ, methylen xanh
- h. Celite
- j. $(NH_4)_2SO_4$
- i. Nước cất dùng trong phân tích

2. Chuẩn bị hoá chất:

Tất cả các hóa chất sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích.

Các dung dịch hóa chất phải được pha với nước cất 2 lần khử ion.

- HCl 0.075M: hút 6.1 mL HCl đđ vào bình định mức 1L và định mức tới vạch bằng nước cất.
- Pepsin 0.2%: cho từ từ 0.2g pepsin 1:10000 = 1.67U/mg FIP (hoặc 0.47g pepsin 0.7U/mg FIP) vào 100ml dung dịch HCl đã được ổn ở nhiệt độ 42 – 45°C, khuấy nhẹ nhàng cho đến khi hòa tan.
- H_2SO_4 0.1N: hút 2.7ml H_2SO_4 đđ vào bình định mức 1L và định mức tới vạch bằng nước cất.
- Hỗn hợp chỉ thị: 0.2g methyl đỏ và 0.1g xanh methylene trong 100ml ethanol 96%
- NaOH 0.1N: Cân 4g NaOH hoà tan trong 1L nước cất.

Chuẩn độ lại nồng độ chính xác của NaOH 0.1N: Hút 10ml hoặc 25ml $H_2C_2O_4$ 0.1N thêm vài giọt phenolphthalein và chuẩn độ bằng dd NaOH trên, ghi nhận thể tích chuẩn độ (V).

$$C_{NaOH} (N) = \frac{V_{H_2C_2O_4} \times C_{H_2C_2O_4}}{V_{NaOH}}$$

E. KIỂM SOÁT QA/AC

Để đảm bảo chất lượng của quá trình phân tích, kiểm nghiệm viên phải thực hiện các công việc sau:

- Vệ sinh thiết bị cất trước khi cất.
- Kiểm tra độ kín của bộ cất bằng dung dịch $(NH_4)_2SO_4$.
- Thực hiện mẫu Blank
- Mẫu Lặp
- Thực hiện mẫu QC

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.090 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 25/10/2018 Trang: 4/6</p>
--	--	---

F. PHƯƠNG PHÁP TIỀN HÀNH

1. Chuẩn bị mẫu

- Mẫu được nghiền mịn (lọt hết qua rây 1.00mm)
- Nếu mẫu chứa chất béo thì phải loại béo bằng eter dầu (2*15ml), sau đó làm khô ở không khí

2. Xử lý mẫu

- Cân khoảng 0.5-1.0(g) mẫu đã nghiền mịn vào cốc 400ml,
- Thêm vào cốc trên 150ml dung dịch pepsin 0.2% .
- Ủ dung dịch trên 16 tiếng tại 45°C nên khuấy thường xuyên (đun trên bếp cách thủy).
- Sau 16 tiếng, cho thêm 0.3 – 0.5 (g) bột celite đã được xử lý phủ lên giấy lọc bằng xanh rồi tiến hành lọc, tráng kỹ cốc bằng nước cất, tráng tiếp bằng acetone.
- Lấy toàn bộ cặn và giấy lọc bỏ vào ống Kjeldahl để xác định protein theo TCVN 4328-1:2007.
- Tiến hành xác định hàm lượng protein tổng có trong mẫu theo TCVN 4328-1:2007.

3. Mẫu trắng:

Làm song song một mẫu trắng, tiến hành giống F.2 nhưng không có mẫu.

G. YÊU CẦU VỀ ĐỘ TIN CẬY CỦA PHÉP PHÂN TÍCH

Kiểm soát thông qua các thông số sau:

- Mẫu Blank không phát hiện hoặc phát hiện < LOD
- Mẫu lặp có độ lặp không vượt quá theo giới hạn cho phép tùy nồng độ của phụ lục f AOAC
- Mẫu kiểm tra độ kín của hệ thống phải có hiệu suất trên 99%
- Mẫu QC có hiệu suất đạt theo yêu cầu của phụ lục f AOAC.

H. TÍNH KẾT QUẢ

Hàm lượng protein tiêu hóa (X) trong mẫu được xác định như sau:

$$X(\%) = A - B$$

Trong đó:

A: Protein tổng (%)

B: Protein có trong phần cặn (%)

I. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong BM.15.04b và BM.15.06

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.090 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 25/10/2018 Trang: 5/6
---	----------------------------------	---

Phụ lục

XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ PEPSIN

1. Phạm vi áp dụng:

Phụ lục này quy định phương pháp xác định hoạt độ của pepsin được sử dụng trong phép xác định hàm lượng protein tiêu hóa khi sử lý với pepsin trong HCl loãng.

2. Nguyên tắc:

Xử lý hemoglobin bằng pepsin trong HCl loãng. Tạo kết tủa protein không thủy phân bằng axit tricloaxetic.

3. Thuốc thử:

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử khoáng.

- HCl 0.2mol/l
- HCl 0.06mol/l
- HCl 0.025mol/l
- Dung dịch axit tricloaxetic
- NaOH 0.5mol/l
- Thuốc thử Folin-Ciocalteu's
- Dung dịch hemoglobin
- Dung dịch chuẩn tyrosin 0.2mmol/l: hòa tan 181.2mg tyrosin trong HCl loãng và thêm HCl loãng này tới vạch 1L.

4. Thiết bị và dụng cụ:

- Nồi cách thủy, có thể duy trì ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Máy quang phổ UV-VIS
- Đồng hồ bấm giờ chính xác tới 1s
- Máy đo pH
- Que khuấy thủy tinh

5. Cách tiến hành



Chuẩn bị dung dịch

Hòa tan 150mg pepsin (hoặc một lượng cần thiết để thu được giá trị hấp thụ 0.35 ± 0.035) trong 100ml HCl loãng

Hút 2ml dung dịch này vào bình định mức 50ml và pha loãng bằng HCl loãng tới vạch. pH của dung dịch là 1.6 ± 0.1

Ngâm bình trong nồi cách thủy để ở 25°C



Thủy phân:

Hút 5ml dung dịch hemoglobin vào ống nghiệm và làm ấm đến nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy. Thêm 1ml dung dịch pepsin và trộn bằng que khuấy với 10 lần di chuyển qua lại. Giữ ống nghiệm trong nồi cách thủy ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $10 \text{ min} \pm 1 \text{ s}$, thời gian tính từ khi thêm dung dịch pepsin. Thời gian và nhiệt độ phải được quan sát chính xác. Thêm 10ml dung dịch axit tricloacetic đã được làm ấm trước ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, trộn và lọc qua giấy lọc khô.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.090 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 25/10/2018 Trang: 6/6</p>
--	--	---

🌈 Hiện màu và đo độ hấp thụ
Hút 5ml dịch lọc vào bình 50ml, thêm 10ml dung dịch NaOH 0.5M, và 3ml thuốc thử Folin-Ciocalteu đã pha loãng, lắc liên tục. Sau 5 phút đến 10 phút, xác định độ hấp thụ của dung dịch so với nước ở $\lambda = 750\text{nm}$ với cuvet 1cm.

🌈 Phép thử trắng
Hút 5ml dung dịch hemoglobin vào ống nghiệm. Làm ấm tới $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, thêm 10ml dung dịch axit tricloacetic đã đưa về $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, trộn và thêm 1ml dung dịch pepsin. Dùng que khuấy để trộn và giữ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $10\text{ min} \pm 1\text{s}$. Trộn và lọc qua giấy lọc. Sau đó mang đi đo quang.

🌈 Đường chuẩn
Chuẩn bị 6 bình 50ml, cho lần lượt 0ml, 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml dung dịch chuẩn tyrosin, tương ứng với $0\mu\text{mol}$, $0.2\mu\text{mol}$, $0.4\mu\text{mol}$, $0.6\mu\text{mol}$, $0.8\mu\text{mol}$ và $1.0\mu\text{mol}$ tyrosin. Thêm một lượng axit HCl loãng để đưa tổng thể tích dung dịch là 5ml. Thêm vào mỗi bình 10ml dung dịch NaOH 0.5M và 3ml Folin-Ciocalteu đã pha loãng, lắc liên tục. đo độ hấp thụ như mẫu
Dựng đường chuẩn biểu thị độ hấp thụ dựa vào lượng tyrosin tính bằng micromole

6. Tính kết quả:

Từ đường chuẩn, xác định lượng tyrosin bằng μmol , tương ứng với độ hấp thụ
Tính hoạt độ của pepsin ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bằng μmol tyrosin trên mg và trên phút, theo công thức sau:

$$a = \frac{3.2 * n}{m * t}$$

Trong đó:

a: hoạt độ pepsin ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$

m: khối lượng pepsin đã sử dụng (mg)

n: lượng tyrosin đọc được từ đường chuẩn (μmol)

t: thời gian phản ứng ($t=10\text{ min}$)