

## Xác định hàm lượng tinh bột bền trong nền mẫu thực phẩm bằng phương pháp enzyme

Đoàn Thu Thương<sup>1\*</sup>, Mạc Thị Thanh Hoa<sup>1</sup>, Trần Hùng Sơn<sup>1,2</sup>, Cao Công Khánh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup> Viện Khoa học và Công nghệ Hàn Quốc (KIST), Seoul, Hàn Quốc

(Ngày đến tòa soạn: 13/09/2022; Ngày chấp nhận đăng: 03/10/2022)

### Tóm tắt

Tinh bột bền hay còn gọi là tinh bột kháng (*Resistant Starch*) là loại chất xơ được quan tâm ngày càng nhiều nhờ tác động có lợi với sức khỏe con người. Nghiên cứu này đã tiến hành thẩm định phương pháp xác định hàm lượng tinh bột bền theo phương pháp AOAC 2002.02. Phương pháp đã được thẩm định các thông số đường chuẩn, độ lặp lại, độ tái lập trung gian, độ đúng đạt theo yêu cầu của AOAC. Đánh giá độ vững của phương pháp bằng cách so sánh hàm lượng tổng tinh bột bền và tinh bột tiêu hóa với hàm lượng tinh bột tổng số theo phương pháp AOAC 996.11. Phương pháp đã được ứng dụng để phân tích 36 mẫu thực, kết quả cho thấy hàm lượng tinh bột bền khác nhau, dao động trong khoảng 1 - 42 % tùy theo nguồn gốc, đặc điểm cấu trúc và cách biến tính tinh bột.

**Từ khóa:** tinh bột bền, tinh bột kháng, AOAC 2002.02, chất xơ.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quá trình tiêu hóa tinh bột là một quá trình gồm nhiều bước, bắt đầu bởi  $\alpha$ -amylase trong nước bọt ở miệng, sau đó là  $\alpha$ -amylase của tuyến tụy và cuối cùng là glucoamylase của niêm mạc ruột, maltase- glucoamylase và sucrase-isomaltase chuyển đổi thành các sản phẩm đường đơn có thể hấp thu trực tiếp vào mạch máu. Tinh bột được phân loại theo tốc độ tiêu hóa của chúng: tinh bột tiêu hóa nhanh (*rapidly digestible starch* -RDS), tinh bột tiêu hóa chậm (*slowly digestible starch*-SDS) và tinh bột bền (*resistant starch*-RS), RDS được tiêu hóa ở ruột non và dẫn đến đường huyết tăng nhanh trong khi SDS được tiêu hóa với tốc độ chậm hơn, RS có khả năng chống lại sự thủy phân bằng enzyme trong vòng 120 phút kể từ khi bắt đầu tiêu hóa, do đó, RS không làm tăng đường huyết sau ăn. Thay vào đó, các vi sinh vật có sẵn trong ruột già lên men RS thành các acid chuỗi béo ngắn (chủ yếu là butyrat, propionat, acetat) và khí ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ). Các acid béo chuỗi ngắn trong ruột già có ý nghĩa quan trọng đối với sức khỏe của ruột kết, ngoài việc giảm khả năng hình thành hội chứng ruột kích thích, bệnh viêm ruột, tim mạch, ... [1-2].

\*Điện thoại: 0377187305

Email: [doanthuthuong0202@gmail.com](mailto:doanthuthuong0202@gmail.com)

Mặc dù cả quá trình tiêu hóa *in vivo* và tiêu hóa tinh bột trong môi trường giả lập đều nhận được sự quan tâm đáng kể, nhưng vẫn cần có những phương pháp *in vitro* được cải tiến, được xác nhận để phản ánh quá trình tiêu hóa *in vivo* trong vô số điều kiện mà tinh bột có thể gặp phải trong quá trình tiêu hóa của động vật và con người. Phân tích hàm lượng chất xơ và tinh bột bền trong thực phẩm dựa trên quá trình thủy phân carbohydrat có sẵn trong mẫu, có thể kèm theo quá trình phân giải protein để loại bỏ protein bao quanh tinh bột và làm cho tinh bột dễ bị thủy phân amylase và phương pháp Englyst để phân tích chất xơ trong thực phẩm [1]. Các phương pháp được thiết kế đặc biệt để xác định hàm lượng tinh bột bền trong thực phẩm bao gồm phương pháp AOAC 2002.02 và phương pháp Englyst.

Phương pháp AOAC 991.43 xác định hàm lượng tổng chất xơ thực phẩm dưới dạng căn lọc của mẫu thực phẩm sau khi phân hủy bằng  $\alpha$ -amylase có thể điều nhiệt từ *Bacillus licheniformis* [3]. Phương pháp này nhanh chóng nhưng chỉ thích hợp để xác định tinh bột bền nhiệt, vì một số loại tinh bột bền, chẳng hạn như hạt tinh bột khoai tây sống (RS2), có thể bị phá hủy trong quá trình xử lý mẫu.

Phương pháp Englyst (1992) để phân tích tinh bột bền nhằm mô phỏng quá trình tiêu hóa của con người một cách chính xác nhất có thể đạt được trong ống nghiệm. Phương pháp này sử dụng dịch chiết xuất từ tụy tạng lợn trộn với amyloglucosidase để thủy phân tinh bột trong thời gian 2 giờ. Các mẫu thường được sử dụng như đối với thực phẩm nguyên hạt hoặc được đun sôi đối với thực phẩm sống trước khi thủy phân. Phần dịch thu được sau quá trình thủy phân bằng enzym được lấy ra sau 20 phút và 120 phút để xác định tương ứng là tinh bột tiêu hóa nhanh và tinh bột tiêu hóa chậm; tinh bột bền được xác định là phần tinh bột chưa tiêu hóa còn lại trong tổng lượng tinh bột của mẫu. Một số biến thể của phương pháp này sử dụng bằng trypsin, acid chlorhydric hoặc cả hai để mô phỏng quá trình tiêu hóa tốt hơn quá trình tiêu hóa sinh lý. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi kỹ thuật và điều kiện tuân thủ nghiêm ngặt về thời gian [4-5].

Phương pháp AOAC 2002.02 là một phương pháp glucogenic được thiết kế để sử dụng với các mẫu tinh bột thô và cho phép đo trực tiếp tinh bột bền trong hạt tinh bột nguyên vẹn. Các mẫu được thủy phân trong 16 giờ bằng cách sử dụng  $\alpha$ -amylase tụy lợn tinh khiết và amyloglucosidase từ *Aspergillus niger*. Phần còn lại thu được sau khi phân hủy được làm khô và phân tán trong dung dịch kali hydroxit và được tiêu hóa bằng cách sử dụng amyloglucosidase để tạo ra phần kháng tinh bột. Tổng hàm lượng tinh bột của mẫu được xác định bằng tổng của phần tinh bột tiêu hóa và tinh bột bền [3]. Hàm lượng tinh bột tổng số cũng được xác định bằng AOAC 996.1, sử dụng hệ enzyme amylase và amyloglucosidase để thủy phân tinh bột, đây cũng là một phương pháp đối chứng để xác định hàm lượng tinh bột tổng tổng trong mẫu so với AOAC 2002.02.

Hiện nay, tinh bột bền được bổ sung vào các sản phẩm cho bệnh nhân tiểu đường như bánh kẹo, sữa ... Dựa trên tính thực tế về điều kiện của phòng thí nghiệm, tính ứng dụng cũng như ưu điểm của phương pháp, nghiên cứu đã sử dụng phương pháp Ref

AOAC.2002.02 để thẩm định và ứng dụng phương pháp để xác định hàm lượng tinh bột bền trong một số nền mẫu thực trên thị trường.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: mẫu CRM tinh bột bền của Megazyme và 30 mẫu nguyên liệu thực phẩm, thực phẩm bổ sung có chứa tinh bột bền được gửi đến Viện Kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm quốc gia và 06 mẫu thực phẩm có chứa tinh bột bền được mua trên thị trường.

### 2.2. Hóa chất

Amyloglucosidase 3,300 Unit/mL; Pancreatic  $\alpha$ -amylase (3 Ceralpha Units/mg); chất chuẩn Glucose 1 mg/mL, thuốc thử GOPOD của Megazyme và các hóa chất tinh khiết phân tích khác như acid maleic, acid acetic, kali hydroxid, calci clorid, natri hydroxid, ethanol của Merck.

### 2.3. Thiết bị

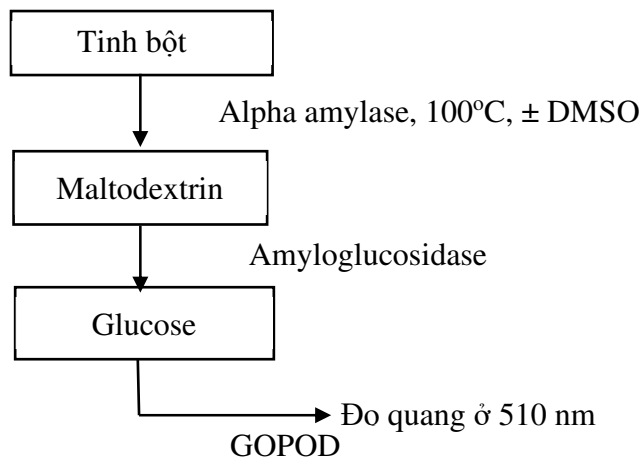
Máy đo quang phổ UV - VIS Biospectrometer Kinetic (sản xuất: Đức), bể điều nhiệt có thể duy trì nhiệt độ  $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , cân phân tích và một số thiết bị phụ trợ khác trong phòng thí nghiệm.

### 2.4. Nội dung nghiên cứu

#### 2.4.1. Thẩm định và phân tích mẫu thực

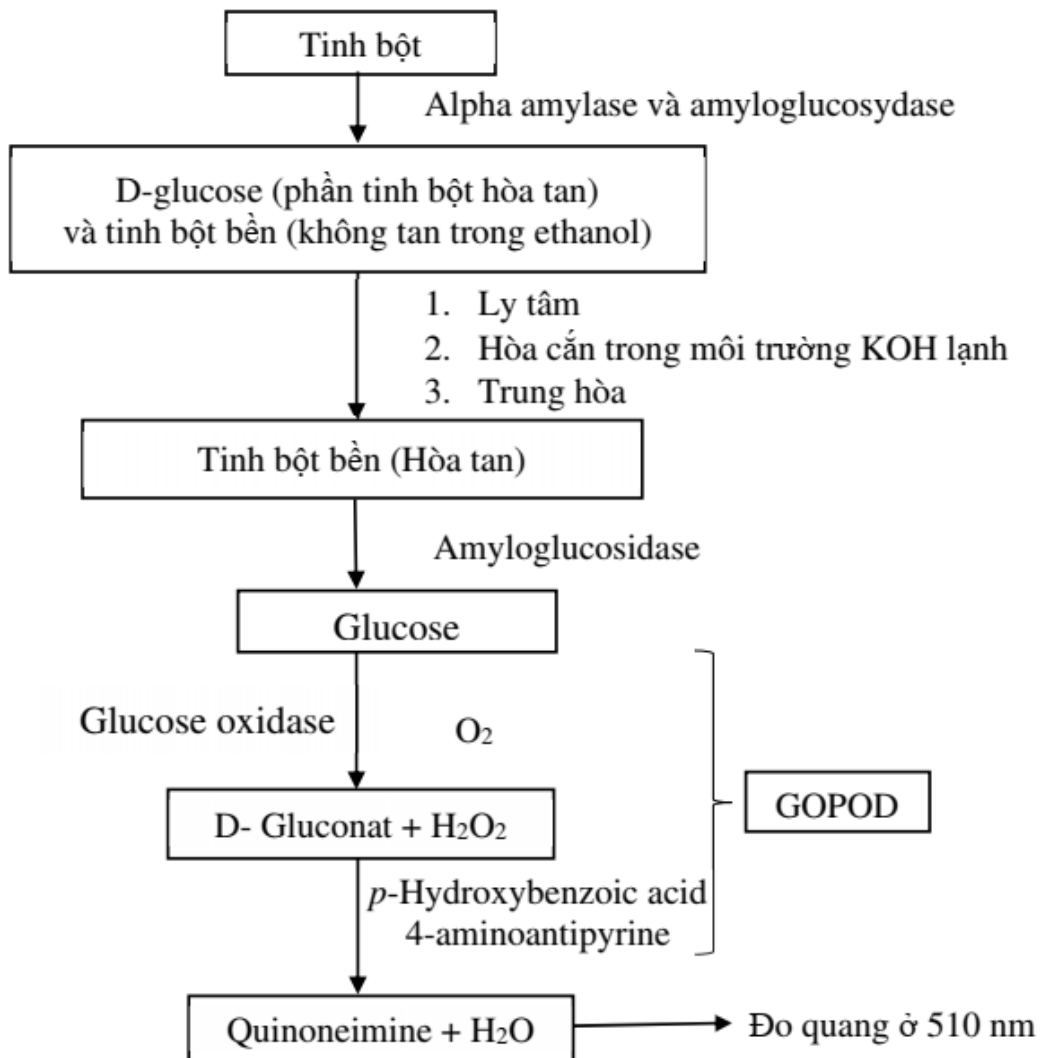
➤ Thẩm định phương pháp với các thông số sau:

- Đường chuẩn: chuẩn glucose - nhận biết bằng thuốc thử GOPOD
- Độ lặp lại: thực hiện trên các nền mẫu CRM, mẫu tinh bột bền hàm lượng cao, mẫu tinh bột đậu xanh có hàm lượng tinh bột bền trung bình và mẫu tinh bột bền có hàm lượng thấp.
- Độ tái lập: thực hiện trên mẫu CRM, mẫu tinh bột bền hàm lượng cao, mẫu tinh bột đậu xanh có hàm lượng tinh bột bền trung bình và mẫu tinh bột bền có hàm lượng thấp; thực hiện khác thời điểm cùng điều kiện so với thí nghiệm xác định độ lặp lại.
- Độ đúng: phân tích mẫu CRM và so sánh với giá trị chứng nhận của Megazyme
- Độ vững: so sánh thông qua hàm lượng tinh bột tổng số, xác định thông qua phương pháp tiêu chuẩn AOAC 996.11. Quy trình thực hiện đánh giá độ vững theo AOAC 996.11 được mô tả ở Hình 1



**Hình 1.** Sơ đồ quy trình phân tích mẫu theo AOAC 996.11

➤ Quy trình thực hiện theo theo AOAC 2002.02 được mô tả ở Hình 2.



**Hình 2.** Sơ đồ quy trình phân tích mẫu

Mẫu trắng là đệm acetate 100 mM, pH 4,5 được thực hiện tạo màu thuốc thử đồng thời với chuẩn và mẫu thủy phân.

Quinoneimine là phức hợp có màu tím đỏ thu được sau phản ứng do glucose (sản phẩm tạo thành sau thủy phân tinh bột) phản ứng với thuốc thử GOPOD, tạo chênh lệch hấp thụ quang Abs (Absorbance) tại bước sóng 510 nm.

Abs mẫu thử được so sánh với tín hiệu của chuẩn glucose được tạo màu tương tự mẫu thử.

➤ Kết quả hàm lượng tinh bột bên được xác định theo công thức:

$$\text{Hàm lượng} \left( \frac{\text{g}}{100\text{g}} \right) = \frac{A \times C' \times D \times V \times 100}{A' \times 0,1 \times m \times 1000} \times \frac{162}{180} = \frac{A \times C' \times D \times V \times 0,9}{A' \times m}$$

A            chênh lệch độ hấp thụ của 0,1 mL dung dịch mẫu thử so với mẫu thử trắng;

A'            chênh lệch độ hấp thụ của 0,1 mL dung dịch chuẩn so với mẫu thử trắng;

D            hệ số pha loãng mẫu;

V            thể tích định mức (mL);

C'            nồng độ của điểm chuẩn glucose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

0,1           thể tích của dịch đã sử dụng tạo màu thuốc thử;

100/1000   hệ số chuyển đổi từ  $\mu\text{g}/\text{mg}$  sang  $\text{g}/100\text{g}$ ;

m            khối lượng phần mẫu thử, tính bằng mg;

162/180    hệ số chuyển đổi từ glucose tự do sang glucose liên kết.

*Ghi chú* : tín hiệu Abs mẫu so với điểm chuẩn chênh lệch trong khoảng  $\pm 20\%$

#### 2.4.2. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý các số liệu thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2020.

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Thẩm định phương pháp

Phương pháp được thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC, Tiến hành phân tích các mẫu CRM (Mẫu 1), mẫu tinh bột bên hàm lượng cao (Mẫu 2), mẫu tinh bột đậu xanh có hàm lượng tinh bột bên trung bình (Mẫu 3) và mẫu tinh bột bên có hàm lượng thấp (Mẫu 4).

##### 3.1.1. Đường chuẩn

Tiến hành tạo màu thuốc thử với chuẩn đường Glucose, thực hiện với dãy nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 mg/mL. Ghi lại Abs (Absorbance) tại bước sóng 510 nm. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát (0,1 - 1,0 mg/mL) có sự tương quan tuyến tính giữa giá trị Abs đo được và nồng độ, hệ số tương quan hồi quy  $R^2 = 0,9999$ ; giá trị Bias  $< 15\%$ .

**Bảng 1. Đường chuẩn Glucose**

<i>C</i> (mg/mL)	<i>Abs</i>	<i>C'</i> (mg/mL)	<i>Bias</i>
0,100	0,123	0,102	- 1,64
0,200	0,231	0,201	- 0,42
0,500	0,552	0,496	0,86
1,000	1,103	1,002	- 0,18
a	1,0887		
b	0,0123		

**3.1.2. Độ lặp lại - Độ tái lập**

Tiến hành phân tích các mẫu CRM (Mẫu 1), mẫu tinh bột bền hàm lượng cao (Mẫu 2), mẫu tinh bột đậu xanh có hàm lượng tinh bột bền trung bình (Mẫu 3) và mẫu tinh bột bền có hàm lượng thấp (Mẫu 4). Kết quả thể hiện ở Bảng 2.

**Bảng 2. Độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp**

<i>Mẫu</i>	<i>Hàm lượng trung bình g/100g</i>	<i>Độ lặp lại (n = 6)</i>		<i>Độ tái lập (n = 9)</i>	
		<i>RSD %</i>	<i>Yêu cầu</i>	<i>RSD %</i>	<i>Yêu cầu</i>
<i>Mẫu 1</i>	38,5	1,72 %	< 1,90 %	1,59 %	< 3,00 %
<i>Mẫu 2</i>	41,7	1,71 %	< 1,90 %	1,37 %	< 3,00 %
<i>Mẫu 3</i>	12,1	1,17 %	< 1,90 %	1,15 %	< 4,00 %
<i>Mẫu 4</i>	1,48	2,63 %	< 2,70 %	5,46 %	< 6,00 %

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ tái lập có RSD đáp ứng yêu cầu của AOAC ở các khoảng hàm lượng từ 1,48% - 41,7% trên các mẫu thực. Theo hướng dẫn của AOAC, phương pháp áp dụng để xác định hàm lượng tinh bột bền trong khoảng 2 - 64%, số liệu thực tế ở Bảng 2 cho thấy tại mức hàm lượng 1,48% (< 2%) phương pháp vẫn đáp ứng tốt. Vì vậy, phương pháp có thể áp dụng để phân tích mẫu thực tế trên thị trường hiện nay ở các mức hàm lượng tinh bột bền khác nhau.

**3.1.3. Độ đúng**

Tiến hành phân tích mẫu CRM của Megazyme có CoA QC = 39 ± 2%, kết quả phân tích được thể hiện ở Bảng 5. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ thu hồi tốt, đáp ứng yêu cầu của vật liệu chuẩn được chứng nhận bởi Megazyme. So với CoA của mẫu CMR, độ lệch thực tế chỉ từ 0,1 - 0,8% (< 2%). Để đạt được độ đúng tốt, trong quá trình xử lý mẫu, quá trình thủy phân ban đầu ống ly tâm được đặt nằm ngang, đảm bảo sự tiếp xúc bề mặt giữa enzyme và mẫu, tránh lắng cặn, tuân thủ về điều kiện thời gian và nhiệt độ. Quá trình ly tâm, thu cặn cần thực hiện ở nhiệt độ thấp, đồng thời thực hiện nhẹ nhàng quá trình nhắc mẫu ra sau ly tâm sẽ giảm bớt sai số do mất mẫu.

**Bảng 3. Độ thu hồi của phương pháp trên mẫu CRM**

Hàm lượng (g/100g)	Độ lệch %	Yêu cầu	Kết luận
39,1	0,1		
38,7	0,3		
39,3	0,3	37 - 41 %	Đạt
38,5	0,5		
38,2	0,8		
39,1	0,1		

### 3.1.4. Độ vững

AOAC 996.11 (AACC 76-13.01) là một phương pháp tiêu chuẩn để xác định hàm lượng tinh bột tổng số. Hàm lượng tinh bột tổng số theo phương pháp xác định tinh bột bền (AOAC 2002.02) được xác định là tổng của phần tinh bột tiêu hóa và tinh bột bền. Độ vững của phương pháp được xác định dựa trên thông số thu được thực hiện trên nền mẫu CRM (mẫu 1), tinh bột bền có hàm lượng cao (mẫu 2) và tinh bột bền có hàm lượng thấp (mẫu 4). Kết quả thu được được xác định theo bảng dưới đây với  $\alpha$  là mức ý nghĩa, lấy giá trị  $\alpha = 0,05$  (tương ứng với độ tin cậy 95%).

**Bảng 4. So sánh hai phương sai**

Mẫu	Hệ số	F thực nghiệm	F tra bảng
Mẫu 1	$\alpha = 0,05$ ; $k_1 = 8$ ; $k_2 = 8$	2,11	3,44
Mẫu 2	$\alpha = 0,05$ $k_1 = 5$ ; $k_2 = 5$	2,86	5,05
Mẫu 4	$\alpha = 0,05$ $k_1 = 5$ ; $k_2 = 5$	3,99	5,05

**Bảng 5. So sánh hai giá trị trung bình**

Mẫu	Hệ số	Độ lệch chuẩn chung $S_c^2$	T thực nghiệm	T tra bảng
Mẫu 1	$\alpha = 0,05$ $k = 16$	0,367	0,039	2,12
Mẫu 2	$\alpha = 0,05$ $k = 10$	2,12	0,337	2,228
Mẫu 4	$\alpha = 0,05$ $k = 10$	4,17	2,05	2,228

**Nhận xét:** Kết quả thực nghiệm trên 3 nền mẫu cho thấy

- Giá trị phương sai  $F_{\text{thực nghiệm}} < F_{\text{tra bảng}}$ , hai phương sai có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê

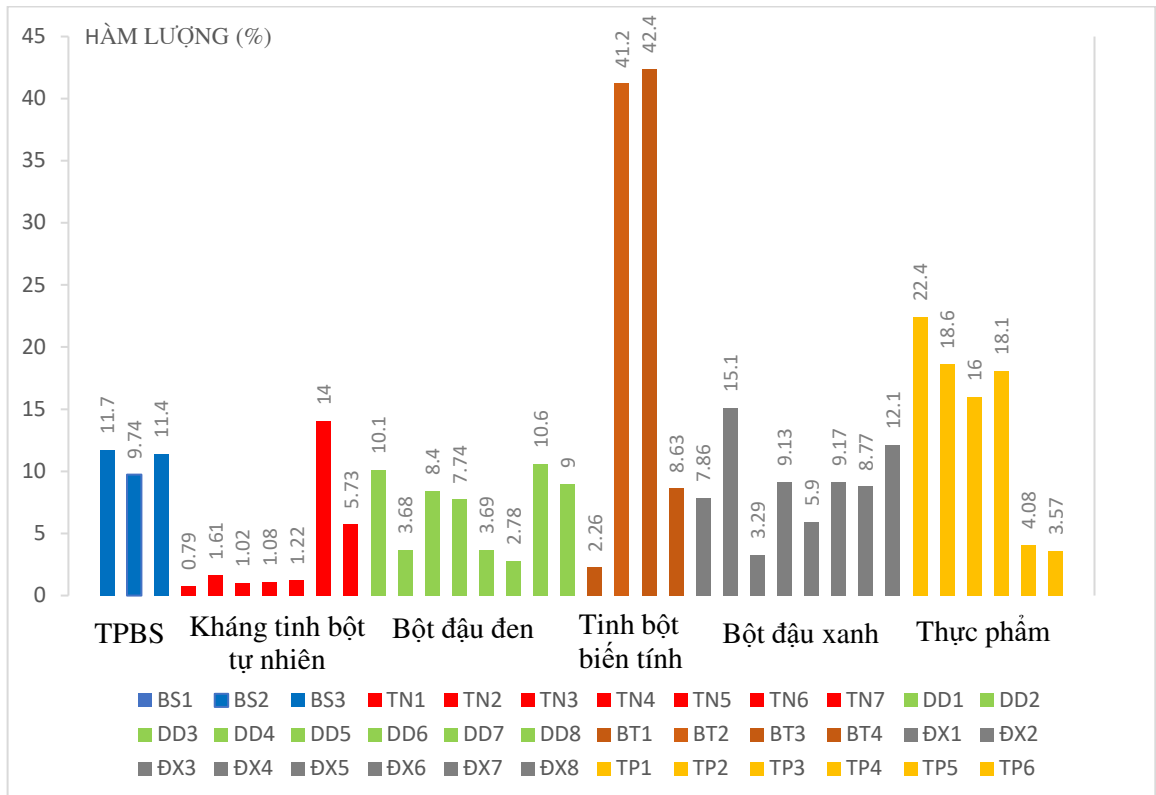
- So sánh hai giá trị trung bình cho thấy  $t_{\text{thực nghiệm}} < t_{\text{tra bảng}}$ , sự khác biệt của hai giá trị trung bình không có ý nghĩa thống kê.

Từ số liệu so sánh phương sai và giá trị trung bình cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê của hai phương pháp AOAC 996.11 (AACC 76-13.01) và (AOAC 2002.02).

### 3.2. Phân tích mẫu thực tế

Phương pháp AOAC 2002.02 đã được áp dụng để phân tích trên các mẫu thực. Các mẫu nghiên cứu là 30 mẫu do khách hàng gửi đến Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, tên mẫu do khách hàng cung cấp được mã hóa và phân thành 5 nhóm: thực phẩm bổ sung (BS), tinh bột bền tự nhiên (TN), bột đậu đen (DD), tinh bột biến tính (BT), bột đậu xanh (ĐX) và 6 mẫu thực phẩm chứa tinh bột bền mua trên thị trường được phân thành nhóm thực phẩm (TP).

Kết quả phân tích hàm lượng tinh bột bền được mô tả tại Hình 1.



Hình 1. Hàm lượng tinh bột bền trên 36 mẫu thực

Kết quả thực nghiệm trên 36 mẫu thực cho thấy hàm lượng tinh bột bền có sự dao động khá lớn từ 1- 42 %, điều này có thể lý giải do các mẫu trên có nguồn gốc, đặc điểm về cấu trúc cũng như các biến tính tinh bột khác nhau. Phương pháp có độ phủ rộng, có thể ứng dụng để phân tích các mẫu trên thị trường hiện nay.

### 4. KẾT LUẬN

Tinh bột bền đóng vai trò như một prebiotic, đã và đang ngày càng được quan tâm. Phương pháp định lượng hàm lượng tinh bột bền theo AOAC 2002.02 đã được công bố và tiến hành rộng rãi với những ưu điểm của nó. Phương pháp đã được thẩm định về đường chuẩn, độ lặp lại, độ tái lập, độ đúng, độ vững đạt yêu cầu của AOAC trên nền mẫu CRM và nền mẫu thực. Phương pháp đã được ứng dụng để phân tích 36 mẫu thực tế, kết quả cho



thấy hàm lượng tinh bột bền khác nhau, dao động trong khoảng 1 - 42 % tùy theo nguồn gốc, đặc điểm cấu trúc và cách biến tính tinh bột. Kết quả là dữ liệu ban đầu để đánh giá hàm lượng tinh bột bền trong thực phẩm. Phương pháp phù hợp để ứng dụng xác định hàm lượng tinh bột bền trên thị trường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. D. F. Birt, T. Boylston, S. Hendrich et al., “Resistant Starch: Promise for Improving Human Health,” *Advances in Nutrition*, vol. 4, no.6, pp. 587-601, 2013.
- [2]. Csiro, “Understanding resistant starch and its role in gut health”. [Online]. Available: <https://www.csiro.au/en/research/health-medical/nutrition/resistant-starch>. [Accessed 09/12/2022].
- [3]. AOAC, “Official methods of analysis of AOAC International. [cited 2013 Jan 4]”. [Online]. Available: <http://www.eoma.aoac.org/>. [Accessed 09/12/2022].
- [4]. H. N. Englyst, S. M. Kingman, and J. H. Cummings, “Classification and measurement of nutritionally important starch fractions,” *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 46 (Supp 2), S33-50, 1992.
- [5]. H. N. Englyst, M. E. Quigley, and G. J. Hudson, “Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars” *Analyst (Lond)*, vol. 119, no. 7, pp.1497-1509, 1994.

## Determination of resistant starch content on food samples by enzyme method

Doan Thu Thuong<sup>1</sup>, Mac Thi Thanh Hoa<sup>1</sup>, Tran Hung Son<sup>1,2</sup>, Cao Cong Khanh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seoul, Korea

### Abstract

Resistant Starch is a type of fiber of increasing interest due to its beneficial effects on human health. This study has validated the method of determining resistant starch content according to AOAC 2002.02 method. The method has been validated with parameters of calibration curve, repeatability, intermediate reproducibility, and accuracy as required by AOAC. The robustness of the method was evaluated by comparing the content of total resistant starch and digestible starch with the total starch content according to the AOAC 996.11 method. The method has been applied to analyze 36 real samples, the results show that the content of resistant starch varies, ranging from 1 - 42 % depending on the origin, structural characteristics and the way starch is modified.

**Keywords:** resistant starch, AOAC 2002.02, fiber