

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của nghiên cứu

Tình trạng rối loạn chuyển hoá đặc biệt là bệnh béo phì và đái tháo đường týp 2 đang gia tăng trên toàn thế giới. Thay đổi lối sống, đặc biệt là lựa chọn chế độ ăn phù hợp là yếu tố quan trọng trong phòng và điều trị các rối loạn chuyển hoá. Chế độ ăn được xây dựng nhằm kiểm soát tốt nồng độ glucose sau ăn và năng lượng tiêu thụ. Tinh bột đề kháng (RS) là một trong những loại thực phẩm làm giảm nồng độ glucose máu sau ăn và giảm mức năng lượng tiêu thụ do đề kháng sự thủy phân của enzym tiêu hoá, điều này có ý nghĩa lớn trong phòng và điều trị các rối loạn chuyển hoá.

Tinh bột lúa mì acetat (TBLMAC) là một loại RS có nguồn gốc từ tinh bột lúa mì được biến đổi cấu trúc hoá học với tác nhân là anhydrid acetic, đạt các yêu cầu chất lượng sản phẩm dùng trong thực phẩm. Cho đến nay, TBLMAC vẫn chưa được nghiên cứu tổng hợp nguyên liệu thực phẩm; xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, đánh giá tính an toàn và đánh giá hiệu quả trên rối loạn chuyển hoá glucose, lipid. Với mong muốn nghiên cứu nguồn nguyên liệu thực phẩm mới có tiềm năng trong chăm sóc sức khỏe, đề tài **“Nghiên cứu tạo nguyên liệu tinh bột mì acetat đề kháng enzym amylase hỗ trợ điều trị các rối loạn chuyển hoá”** được thực hiện với các nội dung sau:

- 1) Điều chế và xác định đặc tính lý, hóa của TBLMAC.
- 2) Đánh giá khả năng đề kháng enzym amylase *in vitro*.
- 3) Đánh giá tính an toàn của TBLMAC trên động vật thực nghiệm.
- 4) Đánh giá tác dụng của TBLMAC trên chuột béo phì và chuột béo phì kèm tăng đường huyết.
- 5) Khảo sát sản phẩm chuyển hóa (SCFAs) trong ruột già của chuột thí nghiệm ăn TBLMAC.

2. Những đóng góp mới của nghiên cứu

Luận án đã đóng góp những dữ liệu khoa học mới như sau:

- Tinh bột lúa mì acetat (TBLMAC) được tạo thành từ phản ứng este giữa tinh bột lúa mì và anhydrid acetic, đạt tiêu chuẩn chất lượng theo tiêu chí an toàn thực phẩm quy chuẩn về bột ngũ cốc của Bộ Y tế, có thời hạn sử dụng 17 tháng ở nhiệt độ 25⁰C, độ ẩm 65-75%; được mô tả đầy đủ về đặc điểm hình thái; cấu trúc tinh thể; đặc tính lý, hoá.
- TBLMAC chứa hàm lượng tinh bột đề kháng cao (32,11%) gấp 4,36 lần dạng chưa biến đổi; có khả năng đề kháng enzym amylase *in vitro* cao vượt trội.
- TBLMAC an toàn khi dùng ngắn hạn với mức liều cao nhất 25 g/kg và an toàn khi dùng dài hạn trên chuột thực nghiệm.
- TBLMAC làm giảm nồng độ glucose sau ăn; dùng kéo dài 4 tuần liều 5 g/kg, 2 lần/ngày, làm giảm thể trọng, giảm nồng độ glucose máu lúc đói; dùng kéo dài 8 tuần, liều 5 g/kg, 2 lần/ngày, làm giảm nồng độ triglycerid, cholesterol máu và cải thiện tình trạng đề kháng insulin trên mô hình chuột béo phì do chế độ ăn giàu chất béo.
- TBLMAC làm tăng khả năng dung nạp glucose thông qua làm giảm nồng độ glucose máu lúc đói, giảm mức HbA1c, tăng dung nạp glucose trong thử nghiệm dung nạp glucose (IPGTT) khi dùng kéo dài 8 tuần với mức liều 5 g/kg, 2 lần/ngày, trên chuột béo phì kèm tăng đường huyết do streptozotocin.
- TBLMAC làm tăng nồng độ các acid béo mạch ngắn ở ruột già chuột thử nghiệm.

3. Bố cục luận án: luận án gồm 139 trang, 30 bảng, 25 hình, 16 sơ đồ, 207 tài liệu tham khảo, 6 tài liệu tham khảo nước ngoài, 211 tài liệu tham khảo nước ngoài, 29 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

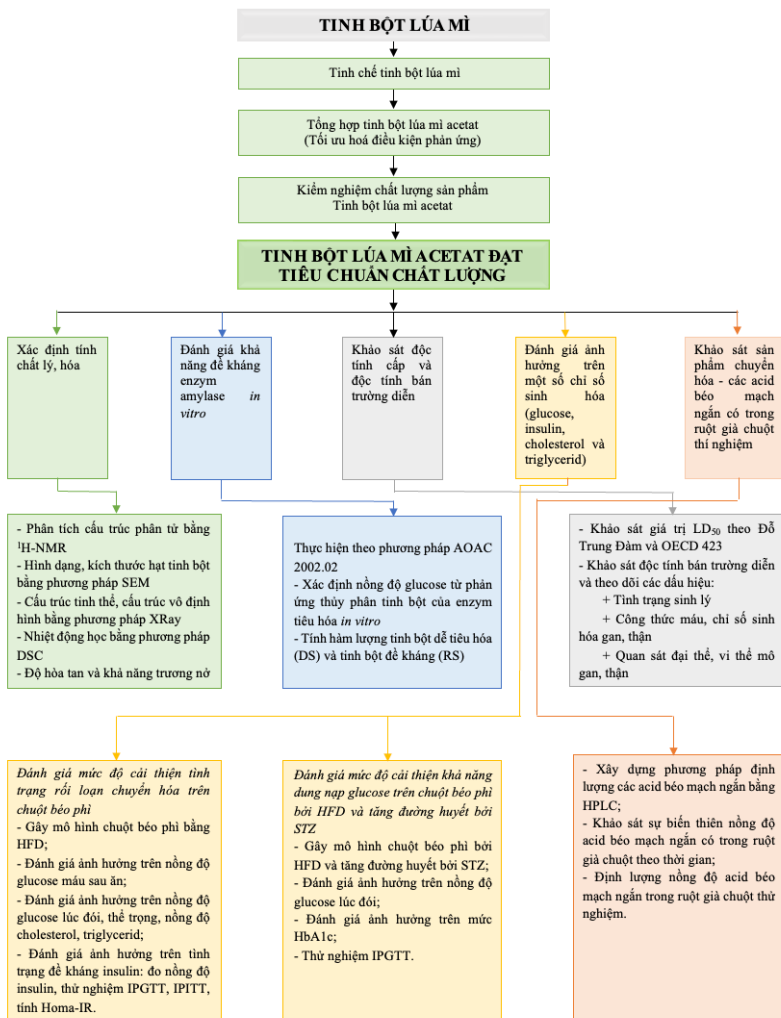
1.1. Tinh bột lúa mì: công thức phân tử: $(C_6H_{10}O_5)_n$ ($n = 300-1000$), có tên khoa học là *Amylum tritici* thuộc họ Lúa (*Poaceae*). Tinh bột lúa mì có màu trắng đục, mùi đặc trưng của lúa mì, không tan trong nước lạnh, ethanol và ete, tan trong nước nóng tạo thành gel, sánh khi để nguội. Hạt tinh bột chủ yếu dạng hạt lớn, kích thước từ 10-45 μm ; tỷ trọng 0,50 g/cm^3 ; hàm ẩm 13%; nhiệt độ hồ hóa 58 $^{\circ}C$. Bột lúa mì chứa khoảng 70% tinh bột.

1.2. Tinh bột đề kháng: tinh bột đề kháng được định nghĩa là phần tinh bột không tiêu hóa ở ruột non và là cơ chất cho hệ vi sinh vật ở ruột già lên men tạo các sản phẩm acid béo mạch ngắn (SCFAs). RS có thể được tạo ra từ phương pháp vật lý, hoá học hay enzym. TBLMAC được tạo bởi phản ứng este với anhydrid acetic để thay đổi cấu trúc, làm cho phân tử tinh bột trở nên cồng kềnh gây cản trở không gian hạn chế sự tiếp cận của đại phân tử enzym amylase đến các điểm gắn trên liên kết α -1,4-glycosid, làm giảm sự thủy phân tinh bột và giảm hình thành glucose. TBLMAC được tổng hợp và xây dựng các tiêu chuẩn chất lượng an toàn dùng trong thực phẩm.

1.3. Vai trò của tinh bột đề kháng trên các rối loạn chuyển hoá: giảm sự hình thành glucose và tăng hàm lượng SCFAs là đặc điểm quan trọng thể hiện vai trò sinh học của tinh bột đề kháng trên các rối loạn chuyển hóa. RS có khả năng giảm đáp ứng glucose-insulin sau ăn, dùng lâu dài gây hao hụt năng lượng, tác động tích cực đến điều hoà chuyển hoá glucose-lipid thông qua các cơ quan như ruột, gan, mô mỡ, mô cơ, tuyến tụy và thần kinh trung ương như tăng tiết PYY và GLP-1, tăng tạo glycogen, ức chế tân tạo glucose ở gan, tăng sử dụng glucose ở mô đích, tăng trao đổi chất và oxy hóa acid béo chuỗi dài, tăng tiết insulin.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ tiến hành nghiên cứu

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Điều chế và xác định đặc tính lý, hoá của TBLMAC: bột lúa mì được tinh chế và cho tham gia phản ứng este hoá với anhydrid acetic tạo sản phẩm TBLMAC. Kiểm nghiệm tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm dựa trên hướng dẫn của DĐVN V, TCVN, QCVN, AOAC. Xác định hình thái hạt tinh bột bằng kính hiển vi điện tử quét, xác định cấu trúc phân tử bằng $^1\text{H-NMR}$, cấu trúc tinh thể bằng nhiễu xạ tia X, đo nhiệt động học bằng phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai, đo độ trương nở (g/g) và độ hoà tan (%).

2.2.2. Xác định khả năng đề kháng enzym amylase in vitro: TBLMAC bị thủy phân bởi hệ enzym tiêu hoá *in vitro*, đo nồng độ glucose bằng phản ứng với thuốc thử GOPOD tạo dung dịch màu, đo quang ở bước sóng 546 nm. Xác định hàm lượng tinh bột đề kháng.

2.2.3. Khảo sát độc tính cấp, độc tính bán trường diễn: thử nghiệm độc tính cấp: chuột uống 1 liều TBLMAC lớn nhất, $V_{\text{uống}} = 0,1 \text{ ml/10 g}$, theo dõi chuột sống/chết trong 72 giờ và 14 ngày; thử nghiệm độc tính bán trường diễn: chuột uống TBLMAC 3 mức liều thấp, trung bình, cao trong 8 tuần. Đánh giá tình trạng sinh lý, thể trọng hàng tuần. Tuần thứ 8, gây mê quá liều bằng diethyl ether, phẫu thuật chuột, lấy máu tim, xác định công thức máu, chức năng gan, thận bằng máy sinh hoá; tách mô gan, thận quan sát đại thể và vi thể bằng kính hiển vi.

2.2.4. Đánh giá tác dụng của TBLMAC trên chuột béo phì và chuột béo phì kèm tăng đường huyết

A. Gây chuột gây béo phì bằng HFD, chọn chuột béo phì có tăng triglycerid, glucose $\geq 8,3 \text{ mmol/L}$: 1) cho uống 1 liều 5 g/kg TBLMAC hoặc tinh bột lúa mì tự nhiên (TBLMTN), $V_{\text{uống}} = 0,1 \text{ ml/10 g}$. Đo nồng độ glucose máu sau ăn bằng que thử và máy đo Accu-Check trước và sau ăn 30, 60, 90, 120 phút; 2) chia 4 nhóm: nhóm

chúng, TN, AC5, AC10 lần lượt cho ăn cám tiêu chuẩn, TBLMTN, TBLMAC liều thấp, TBLMAC liều cao. Ở các thời điểm 0, 4, 8 tuần, đo trọng lượng, nồng độ glucose; sau 8 tuần, đo nồng độ triglycerid, cholesterol bằng các kit định lượng; đo nồng độ insulin bằng kit mouse ELISA test và thử nghiệm dung nạp glucose (IPGTT) và thử nghiệm dung nạp insulin (IPITT).

B. Gây mô hình chuột béo phì, tăng đường huyết bằng cách tiêm STZ liều 40 mg/kg x 5 ngày liên tiếp trên chuột béo phì có tăng triglycerid, sau 7 ngày, **chọn chuột có glucose $\geq 11,1$ mmol/L**; chuột được chia nhóm chứng, TN, AC5, AC10 và cho uống chất thử nghiệm gồm TBLMTN và TBLMAC liều thấp, liều cao tương tự như thử nghiệm trên. Sau 8 tuần, đo nồng độ glucose, mức HbA1c và thực hiện thử nghiệm IPGTT.

2.2.5. Xác định sản phẩm chuyển hóa – SCFAs trong ruột già chuột thí nghiệm: chuột được chia nhóm TN và AC lần lượt cho ăn TBLMTN và TBLMAC liều 5 g/kg, sáng-chiều; $V_{uống} = 0,1$ ml/10 g, kéo dài 20 ngày. Sau thử nghiệm gây mê chuột quá liều bằng diethyl ether, phẫu thuật và thu thập phân chuột ở các phân đoạn tiêu hoá ruột non, manh tràng, trực tràng, đại tràng. Bảo quản lạnh, xử lý mẫu, tạo dẫn xuất hydrazid và xác định hàm lượng SCFAs bằng phương pháp HPLC đã được thẩm định.

2.3. PHÂN TÍCH SỐ LIỆU

Tất cả dữ liệu được lưu trữ và xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS phiên bản 25.0. Sự khác biệt về các chỉ số được phân tích bằng phân tích bằng phép kiểm Mann-Whitney và Kruskal-Wallis. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM hoặc giá trị trung bình $\pm$ SD. Quy ước trị số $p < 0,05$ là ngưỡng có ý nghĩa thống kê.

Chương 3. KẾT QUẢ

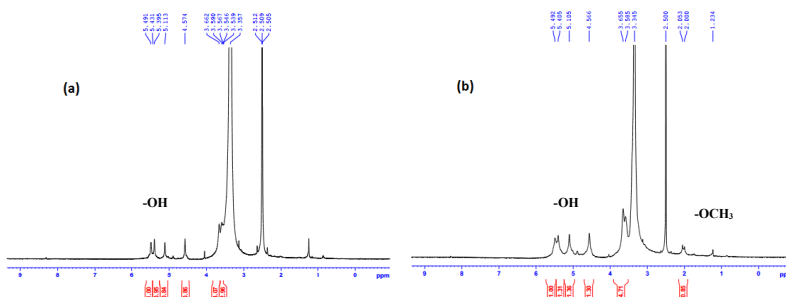
3.1. Điều chế và xác định đặc tính lý, hóa của TBLMAC

3.1.1. Điều chế TBLMAC

Bảng 3.1. Khối lượng tinh bột lúa mì tinh chế và TBLMAC thu được

Mẫu	Khối lượng bột lúa mì (gam)	Khối lượng tinh bột lúa mì tinh chế (gam)	Khối lượng TBLMAC (gam)
1	500	357	310,6
2	500	395	335,8
3	500	382	332,4
Trung bình	500	378	326,3
Hiệu suất		70-75%	85-87%

Điều kiện thời gian phản ứng 150 phút, tỷ lệ anhydrid acetic 9% được lựa chọn để tạo TBLMAC có hàm lượng acetyl < 2,5%, mức thay thế = 0,09 phù hợp yêu cầu của FDA. Phân tích cấu trúc phân tử bằng ^1H -NMR thấy có các đỉnh proton của nhóm acetyl tại δH 2,0-2,1 ppm.



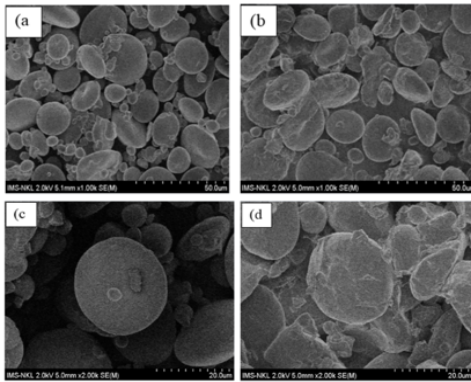
Hình 3.1. Phổ ^1H -NMR của TBLMTN (a) và TBLMAC (b)

Sau thời gian bảo quản các mẫu TBLMAC ở các điều kiện theo dõi tự

nhiên và dựa trên kết quả kiểm nghiệm, quan trọng nhất là các chỉ số vi sinh vật đã xác định được hạn sử dụng của TBLMAC là 17 tháng nếu bảo quản ở 25 °C và hạn sử dụng là 11 tháng nếu bảo quản ở nhiệt độ ở 30 °C với độ ẩm 65 - 75%. Đạt các chỉ tiêu kim loại nặng, độc tố, dư lượng hoá chất thuốc bảo vệ thực vật và chỉ tiêu vi sinh vật.

3.1.2. Xác định đặc tính lý, hóa của TBLMAC

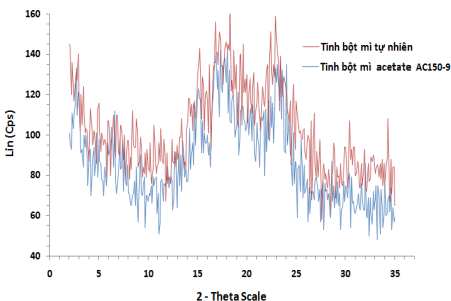
Đặc điểm về hình dạng, kích thước hạt tinh bột



TBLMAC có 2 loại hạt lớn và nhỏ; số lượng hạt lớn > hạt nhỏ. Bề mặt hạt TBLMAC có các điểm rỗ, sần sùi, không đồng nhất.

Hình 3.2. Hình ảnh TBLMTN và TBLMAC dưới kính hiển vi điện tử quét. (a) TBLMTN độ phóng đại 1000X – (c) độ phóng đại 2000X; (b) TBLMAC độ phóng đại 1000X – (d) độ phóng đại 2000X

Đặc điểm về cấu trúc tinh thể và cấu trúc vô định hình



TBLMAC có các đỉnh nhiễu xạ tương tự TBLMTN, nhưng cường độ các đỉnh nhiễu xạ thấp hơn so với TBLMTN.

Hình 3.3. Giảm đồ nhiễu xạ tia X của TBLMTN và TBLMAC**Đặc điểm về nhiệt độ gelatin hóa****Bảng 3.2.** Thông số nhiệt động học của quá trình gelatin hóa

	$T_0(^{\circ}\text{C})$	$T_p(^{\circ}\text{C})$	$T_c(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H (\text{J/g})$
Tinh bột TN	$49,32 \pm$	$62,14 \pm$	$71,20 \pm$	$5,63 \pm$
(N = 3)	0,43	1,0	0,98	0,06
Tinh bột AC	$32,14 \pm$	$49,54 \pm$	$59,82 \pm$	$3,45 \pm$
(N = 3)	0,54	0,52	0,52	0,38

T_0 : nhiệt độ khởi đầu; T_p : nhiệt độ đỉnh; T_c : nhiệt độ kết thúc quá trình gelatin hóa; ΔH : sự biến đổi nhiệt của quá trình gelatin hóa; dữ liệu biểu diễn giá trị trung bình $\pm SD$

Nhiệt độ tạo gelatin TBLMAC là $59,82^{\circ}\text{C}$ và nhiệt lượng tạo ra thấp hơn so với TBLMTN.

Độ hòa tan và khả năng trương nở**Bảng 3.3.** Độ trương nở và độ hòa tan của TBLMTN và TBLMAC

	Độ trương nở (g/g)	Độ hòa tan (%)
Tinh bột TN (N = 3)	$6,47 \pm 0,28$	$4,86 \pm 0,49$
Tinh bột AC (N = 3)	$10,87 \pm 0,72$	$9,43 \pm 0,92$

Dữ liệu biểu diễn giá trị trung bình $\pm SD$

3.2. Khả năng đề kháng enzym amylase *in vitro***Bảng 3.4.** Hàm lượng tinh bột tiêu hóa và tinh bột đề kháng

Hàm lượng	Tinh bột AC (N = 3)	Tinh bột TN (N = 3)
RS (%)	$32,11^{**} \pm 0,99$	$7,36 \pm 0,65$
DS (%)	$59,11^{**} \pm 1,01$	$86,75 \pm 0,76$

^{**} $p < 0,01$ so với tinh bột TN (Mann-Whitney); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm SD$

Hàm lượng RS ở TBLMAC cao gấp 4,36 lần so với TBLMTN

3.3. Độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của TBLMAC

3.3.1. Độc tính cấp

Ở mức liều cao nhất là 25 g/kg, chuột vẫn an toàn và không có bất kỳ dấu hiệu bất thường nào về trạng thái sinh lý sau 14 ngày.

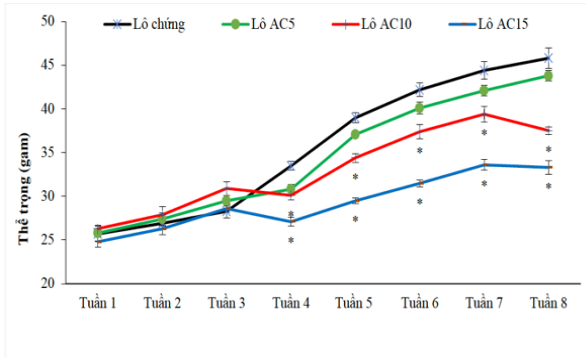
3.3.2. Độc tính bán trường diễn

Liều thử độc tính bán trường diễn của TBLMAC liều thấp được chọn là 5 g/kg, liều trung bình 10 g/kg, liều cao 15 g/kg, 1 lần/ngày-sáng, thể tích uống 0,1 ml/10 g bằng kim đầu tù, kéo dài 8 tuần.

Bảng 3.4. Các dấu hiệu về tình trạng sinh lý của chuột sau 8 tuần

Vị trí	Các dấu hiệu	Ghi nhận
- Da	- Tím tái, đỏ bừng	Không có
- Lông	- Xù lông, lông dựng đứng, rụng lông	Không có
- Mắt	- Mắt mờ, rỉ mắt, thay đổi niêm mạc mắt	Không có
- Tiêu hóa	- Chảy nước bọt, tiêu chảy	Không có
- Hô hấp	- Thở nhanh, thở dốc, thở chậm	Không có
- Vận động	- Nhảy lung tung, đi lệch mình, bò lết	Không có
- Thần kinh	- Hành vi, hoạt động, co giật, run, ngủ lịm, hôn mê	Không có

Thể trọng chuột thử nghiệm



Nhóm AC10, AC15, thể trọng chuột giảm có ý nghĩa so với nhóm chứng từ tuần thứ 4.

Hình 3.5. Thể trọng chuột trong thử nghiệm độc tính bán trường diễn ($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$ so với nhóm chứng (Mann-Whitney); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM

Công thức máu chuột thử nghiệm

Bảng 3.5. Số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu của các chuột

Nhóm	Hồng cầu (T/L)	Bạch cầu (G/L)	Tiểu cầu (G/L)
Chứng (N = 8)	8,8 $\pm$ 0,61	8,4 $\pm$ 0,46	713,7 $\pm$ 64,14
AC10 (N = 8)	8,8 $\pm$ 0,48	8,2 $\pm$ 1,21	689,0 $\pm$ 35,2
AC15 (N = 8)	8,2 $\pm$ 0,35	7,5 $\pm$ 0,45	669,5 $\pm$ 39,01

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nhóm chứng

Chức năng gan, thận

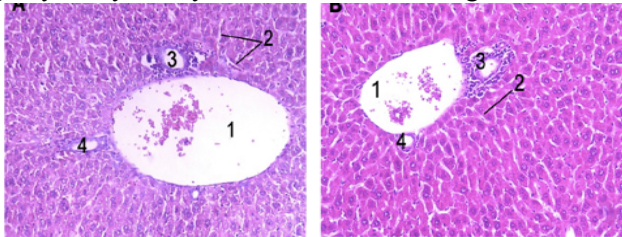
Bảng 3.6. Chỉ số AST, ALT, ure, triglycerid và albumin của chuột

Nhóm	Ure (mmol/l)	Creatinin (mmol/l)	Albumin (g/l)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)
------	-----------------	-----------------------	------------------	---------------	---------------

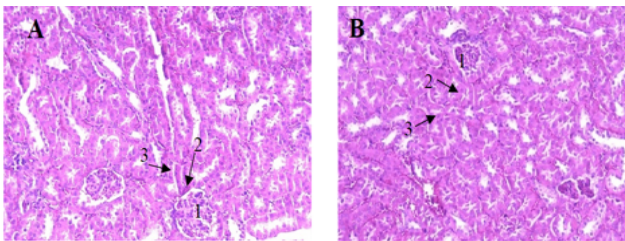
Chứng	10,7 ±	26,4 ±	34,5 ±	115,8 ±	61,0 ±
(N = 8)	0,65	0,99	0,71	6,26	5,98
AC10	14,7 ±	28,9 ±	33,5 ±	121,8 ±	66,9 ±
(N = 8)	0,94	1,40	1,60	25,9	3,60
AC15	17,1 ±	26,1 ±	33,7 ±	137,7 ±	65,2 ±
(N = 8)	0,98	1,95	1,18	7,63	4,46

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nhóm chứng

Đại thể và vi thể mô gan, thận: hình ảnh đại thể mô gan, thận không có xung huyết hay bất kỳ dấu hiệu bị tổn thương nào.



1: tĩnh mạch cửa; 2: mao mạch nan hoa; 3: ống mật; 4: động mạch



1: tiểu cầu thận; 2: ống lượn gần; 3: ống lượn xa

Hình 3.6. Hình ảnh vi thể mô gan, thận chuột A (chứng); B (AC15)

3.4. Đánh giá tác dụng của TBLMAC trên chuột béo phì và chuột béo phì, tăng đường huyết

3.4.1. Gây mô hình chuột béo phì bằng chế độ ăn giàu chất béo

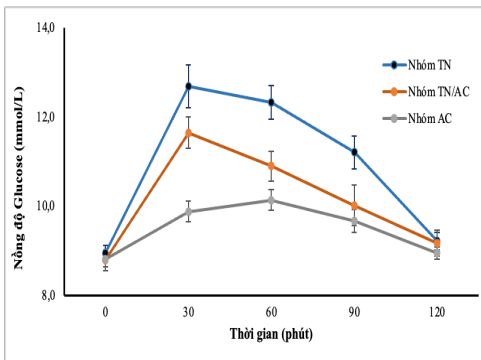
Bảng 3.7. Các chỉ số chuyển hóa ở chuột ăn chế độ ăn giàu chất béo

Chỉ số	ND (N = 10)	HFD (N = 101)	Hiệu suất gây mô hình 63,5%.
Năng lượng hấp thu/ngày (cal)	20,8 ± 0,5	26,8** ± 1,3	Các chuột được lựa chọn cho nghiên cứu có thể trọng ≥ 30%, TG. ≥ 30% và glucose ≥ 8,3 mmol/L
Thể trọng (gam)	31,9 ± 1,0	49,2** ± 0,7	
Glucose (mmol/L)	6,6 ± 0,3	8,7** ± 0,4	
Triglycerid (mmol/L)	1,03 ± 0,05	1,85** ± 0,06	
Insulin (mUI/ml)	170 ± 2,1	194,2** ± 5,9	

(N = 10, mỗi mẫu; ** p < 0,01 so với nhóm ND (Mann-Whitney)); dữ liệu biểu diễn trung bình ± SEM

3.4.2. Đánh giá tác dụng của TBLMAC trên chuột béo phì

Tác động của TBLMAC trên nồng độ glucose máu sau ăn



Nhóm AC, nồng độ glucose máu sau ăn đạt đỉnh sau 60 phút, nồng độ đỉnh là 10,14 mmol/L, tăng 14,97% so với nồng độ ban đầu, giá trị AUC_{glucose} giảm 15% so với nhóm TN (p < 0,05)

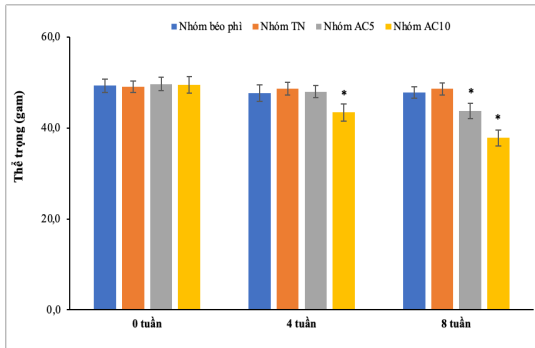
Hình 3.7. Nồng độ glucose máu sau ăn của chuột béo phì

Bảng 3.8. Giá trị AUC_{glucose} sau 120 phút ở các nhóm thử nghiệm

Khoảng thời gian (phút)	AUC _{glucose} (mmol/L*phút)			
	0-30	0-60	0-90	0-120
TN (N = 10)	324 ± 9	702 ± 15	1.056 ± 20	1.362 ± 31
TN/AC (N = 10)	306 ± 9	642 ± 24	954 ± 32	1.248* ± 48
AC (N = 10)	282 ± 6	582 ± 10	882 ± 15	1.158* [#] ± 18

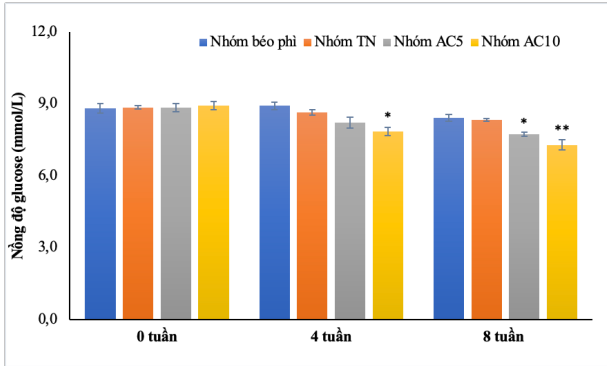
(N = 10, mỗi mẫu; *p < 0,05 so với nhóm TN, *[#]p < 0,05 so với nhóm TN/AC (Mann-Whitney); dữ liệu biểu diễn trung bình ± SEM)

Tác động của TBLMAC dài hạn trên thể trọng và nồng độ glucose



4 tuần – nhóm AC10 giảm 10,7% thể trọng (p < 0,05) và ở tuần thứ 8, nhóm AC5 giảm 10,8% thể trọng, nhóm AC10 giảm 22,2% thể trọng so với nhóm TN (p < 0,05).

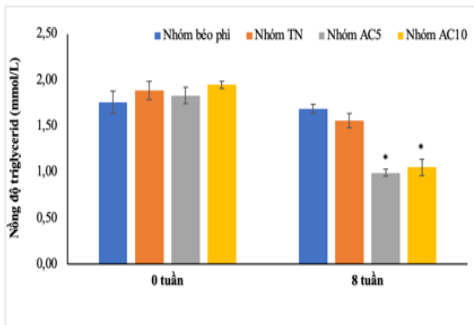
Hình 3.8. Thể trọng chuột béo phì (N = 10, mỗi mẫu; *p < 0,05 so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình ± SEM)



Sau 4 tuần, nhóm AC10 giảm 9,12% ($p < 0,05$) và sau 8 tuần, nhóm AC5 giảm 7,2%; nhóm AC10 giảm 12,5% so với nhóm TN ($p < 0,05$).

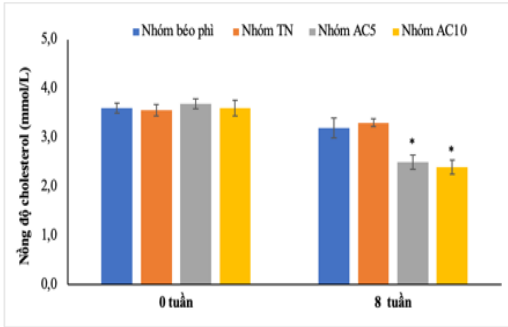
Hình 3.9. Nồng độ glucose lúc đói ở chuột béo phì ($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)

Tác động của TBLMAC dài hạn trên nồng độ triglycerid và cholesterol



Sau 8 tuần, nhóm AC5 và nhóm AC10 giảm tương ứng là 36,3 và 32,5% so với nhóm TN ($p < 0,05$) và giảm 45,8 và 45,9%, tương ứng so với mức ban đầu ($p < 0,05$)

Hình 3.10. Nồng độ triglycerid sau 8 tuần ở chuột béo phì ($N = 6$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)



Sau 8 tuần, nhóm AC5 và nhóm AC10 giảm tương ứng là 24,2 và 27,2% so với nhóm TN ($p < 0,05$) và giảm 32; 33% so với mức ban đầu ($p < 0,05$).

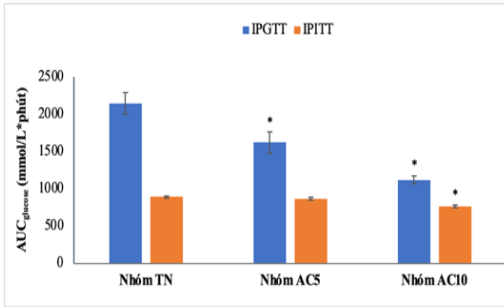
Hình 3.11. Nồng độ cholesterol sau 8 tuần ở chuột béo phì ($N = 6$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)

Tác động của TBLMAC dài hạn trên tình trạng đề kháng insulin

Bảng 3.9. Nồng độ insulin và chỉ số Homa-IR trên chuột béo phì

	Nhóm béo phì (N = 10)	Nhóm TN (N = 10)	Nhóm AC5 (N = 10)	Nhóm AC10 (N = 10)
Nồng độ insulin (ng/ml)	5,4 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,11	4,7 $\pm$ 0,26	4,6 $\pm$ 0,13
Homa-IR	2,1 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	1,6* $\pm$ 0,1	1,5** $\pm$ 0,07

($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)



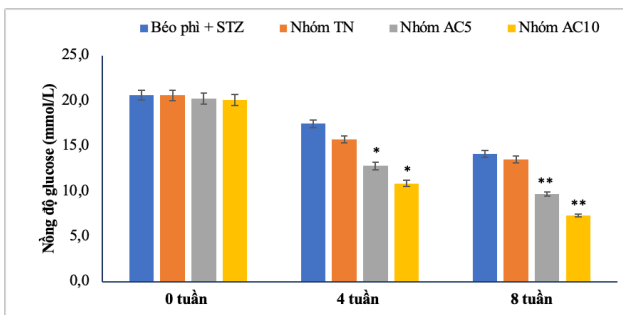
Sau 120 phút, IPGTT, nhóm ACS, AC10 giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm TN ($p < 0,05$). IPITT cũng cho kết quả AUC_{glucose} nhóm AC10 thấp hơn so với nhóm TN ($p < 0,05$)

Hình 3.12. AUC_{glucose} ở chuột béo phì trong IPGTT và IPITT ($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$ so với nhóm TN (Mann-Whitney); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)

3.4.3. Gây mô hình chuột béo phì, tăng đường huyết bằng streptozotocin

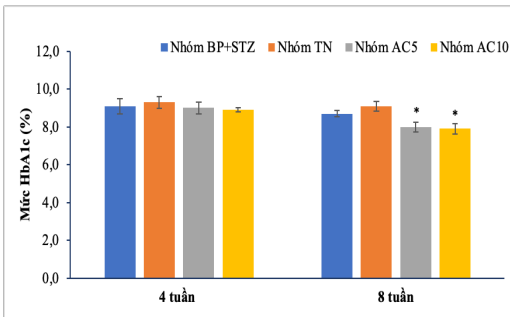
Sau 7 ngày tiêm STZ, 80% số chuột đạt mức đường huyết $\geq 11,1$ mmol/L, các chuột mạnh khỏe, vận động, ăn uống, tiêu hóa bình thường, mô hình ổn định trong 10 tuần.

Tác động của TBLMAC dài hạn trên khả năng dung nạp glucose



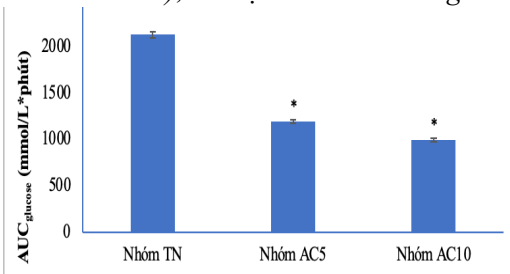
Hình 3.13. Nồng độ glucose của chuột béo phì, tăng đường huyết ($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)

Sau 4 tuần, nhóm AC5 và AC10 giảm tương ứng 19 và 28% ($p < 0,05$); sau 8 tuần, giảm tương ứng 31 và 45,6% so với nhóm TN ($p < 0,01$). Đồng thời, nồng độ glucose máu lúc đói ở nhóm AC10 cũng giảm 24,4% so với nhóm AC5 ($p > 0,05$).



Sau 4 tuần thử nghiệm, chỉ số HbA1c ở nhóm AC5 và AC10 giảm tương ứng 3,3 và 4,9% ($p > 0,05$); sau 8 tuần thử nghiệm, giảm tương ứng 4,9 và 13,3% so với nhóm TN ($p < 0,05$)

Hình 3.14. Mức HbA1c của chuột béo phì, tăng đường huyết ($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)



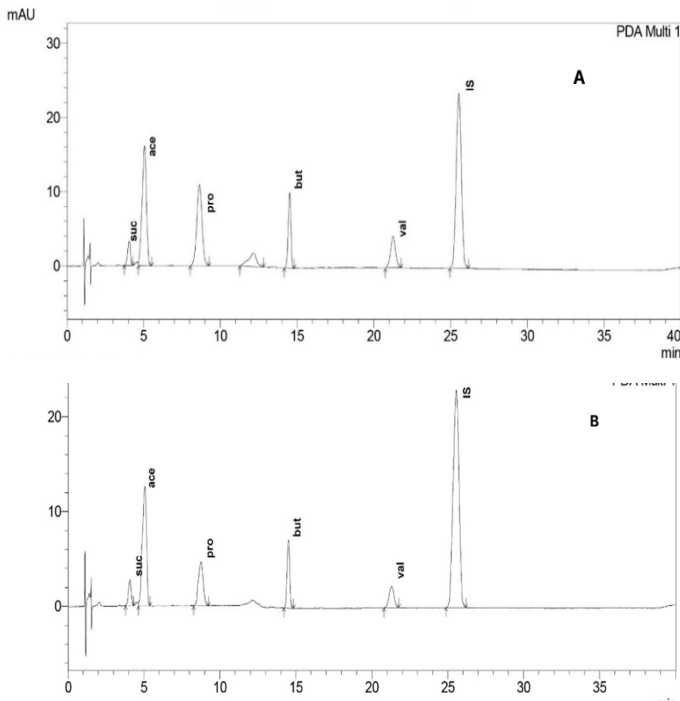
Giá trị AUC_{glucose} sau 120 phút của nhóm AC5 và AC10 giảm tương ứng 38,9 và 46,02% so với nhóm TN ($p < 0,05$)

Hình 3.15. Giá trị AUC_{glucose} trong thử nghiệm IPGTT ($N = 10$, mỗi mẫu; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ so với nhóm TN (Mann-Whitney và Kruskal-Wallis); dữ liệu biểu diễn trung bình $\pm$ SEM)

3.5. Xác định thành phần các acid béo mạch ngắn có trong ruột già chuột ăn TBLMAC bằng HPLC

Quy trình HPLC định lượng SCFAs đã được thẩm định, mẫu phân chuột được xử lý và tạo dẫn xuất hydrazid theo quy trình tối ưu.

Xác định sự có mặt của các SCFAs trong phân chuột ăn TBLMAC



Hình 3.16. Sắc ký đồ mẫu chuẩn (A) và mẫu phân của chuột ăn TBLMAC (B)

Trong mẫu phân chuột ăn TBLMAC có mặt các SCFAs bao gồm acid succinic (Suc), acid acetic (Ace), acid propionic (Pro), acid butyric (But) và acid valproic (Val).

Tổng hàm lượng SCFAs ở đường tiêu hóa ($125,2 \mu\text{mol/g}$) của nhóm AC cao hơn 39% so nhóm TN ($p < 0,05$) và tập trung chủ yếu ở đại tràng, manh tràng, trong đó acid acetic cao hơn 35%, acid propionic cao hơn 46%, acid butyric cao hơn 55%.

Bảng 3.2. Hàm lượng SCFAs trong phân chuột sau 20 ngày

Nhóm	Phân đoạn tiêu hóa	Hàm lượng acid béo mạch ngắn ($\mu\text{mol/g}$)					Tổng
		Suc.	Ace.	Pro.	But.	Val.	
TN (N=10)	Ruột non	$0,7 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,04$	$0,2 \pm 0,00$	$0,1 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$2,7 \pm 0,02$
	Manh tràng	$0,9 \pm 0,00$	$29,6 \pm 0,12$	$5,2 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,00$	$38,1 \pm 0,6$
	Đại tràng	$0,7 \pm 0,03$	$33,5 \pm 0,31$	$4,0 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,11$	$0,1 \pm 0,00$	$39,8 \pm 0,07$
	Trực tràng	$0,0 \pm 0,00$	$7,2 \pm 0,23$	$1,9 \pm 0,16$	$0,3 \pm 0,07$	$0,1 \pm 0,00$	$9,5 \pm 0,09$
	Tổng	$2,3 \pm 0,02$	$72,0 \pm 1,27$	$11,3 \pm 0,98$	$4,2 \pm 0,76$	$0,3 \pm 0,23$	$90,2 \pm 2,71$
AC (N=10)	Ruột non	$0,3 \pm 0,00$	$3,0 \pm 0,13$	$0,2 \pm 0,00$	$0,1 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$3,6 \pm 0,03$
	Manh tràng	$2,7 \pm 0,10$	$37,8 \pm 0,57$	$6,5 \pm 0,07$	$2,4 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,00$	$49,5^* \pm 0,92$
	Đại tràng	$1,5 \pm 0,00$	$42,0 \pm 0,64$	$6,2 \pm 0,05$	$3,1 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,00$	$52,9^* \pm 0,67$
	Trực tràng	$0,2 \pm 0,01$	$14,4 \pm 0,35$	$3,6 \pm 0,20$	$0,9 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,00$	$19,2 \pm 0,70$
	Tổng	$4,7^* \pm 0,04$	$97,2^* \pm 0,55$	$16,5^* \pm 0,17$	$6,5^* \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,01$	$125,2^* \pm 1,05$

Chương 4. BÀN LUẬN

Tinh bột đề kháng là một thực phẩm làm giảm nồng độ glucose máu sau ăn do đề kháng sự thủy phân của enzym tiêu hoá, đồng thời là cơ chất tốt cho sự lên men của hệ vi khuẩn ruột tạo thành các sản phẩm chuyển hoá như các acid béo mạch ngắn có tác động tích cực trên sức khoẻ vật chủ. Các đặc điểm của tinh bột đề kháng có ý nghĩa đặc biệt trong điều hoà chuyển hoá glucose-lipid. Nghiên cứu tạo nguyên liệu tinh bột lúa mì acetat là sản phẩm của phản ứng este hoá giữa tinh bột lúa mì và anhydrid acetic, cho đến thời điểm hiện tại là nghiên cứu hoàn toàn mới trên thế giới. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở và kiểm nghiệm tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm tinh bột lúa mì, đánh giá tính an toàn và hiệu quả trên chuyển hoá glucose, lipid ở mô hình động vật thử nghiệm là giá trị cốt lõi của luận án nhằm đóng góp dữ liệu có tính hệ thống về vai trò của tinh bột đề kháng trong lĩnh vực chăm sóc sức khoẻ. Công trình nghiên cứu đã mở ra hướng phát triển và ứng dụng đầy tiềm năng của tinh bột lúa mì acetat.

Bột lúa mì có hàm lượng tinh bột cao (70-80%), kích thước lớn (10-45 μm), tỷ lệ hạt to nhiều hơn hạt nhỏ, tỷ lệ amylose cao (25-30%) và được tinh chế tạo điều kiện tốt cho quá trình biến đổi cấu trúc hóa học. Đồng thời, với sản lượng, mức tiêu dùng hàng năm lớn nhất thế giới, giá thành rẻ, tinh bột lúa mì là nguồn nguyên liệu thuận lợi và có tiềm năng lớn trong nghiên cứu và phát triển sản phẩm ứng dụng.

Sản phẩm TBLMAC được lựa chọn có hàm lượng acetyl < 2,5% và mức thay thế $D_s=0,09$ phù hợp với yêu cầu an toàn của FDA về giới hạn các nhóm thế. Điều kiện phản ứng tạo nguyên liệu TBLMAC được lựa chọn là 150 phút, tỷ lệ anhydrid acetic 9%. Các phân tích về cấu trúc phân tử, cấu trúc tinh thể, hình thái và đặc tính lý hoá của

TBLMAC cho thấy sản phẩm có các đặc điểm đặc trưng khác với dạng chưa biến đổi và phù hợp trong nghiên cứu tiếp theo. Đánh giá khả năng đề kháng enzym amylase thông qua nồng độ glucose được hình thành sau phản ứng thủy phân của enzym tiêu hoá *in vitro* ghi nhận được khả năng đề kháng với enzym amylase cao với hàm lượng tinh bột đề kháng 32,11%, tăng gấp 4,36 lần so với dạng chưa biến đổi. Như vậy, trên *in vitro* xác nhận rõ, với sự biến đổi cấu trúc phân tử, TBLMAC đã thể hiện khả năng đề kháng enzym amylase cao hơn so với dạng chưa biến đổi, đúng với mô tả trong định nghĩa của Englyst và cộng sự đưa ra (1992). Điều này có ý nghĩa lớn trong việc tiếp tục đánh giá vai trò sinh học của TBLMAC. Thực hiện khảo sát mức độ an toàn của TBLMAC trong thử nghiệm độc tính cấp, ghi nhận được ở mức liều cao nhất 25 g/kg, các chuột vẫn an toàn. Điều này phù hợp với các nghiên cứu y văn trước đây, các tinh bột đề kháng cũng chưa ghi nhận bất kỳ dấu hiệu ngộ độc ở mức liều cao nhất. Ở thử nghiệm độc tính bán trường diễn cũng không ghi nhận dấu hiệu gây độc ở cả mức liều thấp đến mức liều cao trên tình trạng sinh lý, công thức máu, chức năng gan, thận và hình ảnh đại thể, vi thể mô gan, thận. Tuy nhiên, ở mức liều trung bình trở lên có làm giảm thể trọng chuột sau 4 tuần, điều này phù hợp với công bố của FDA về tinh bột chứa hàm lượng tinh bột đề kháng > 25% có làm giảm thể trọng khi dùng kéo dài. TBLMAC chứa 32,11% hàm lượng tinh bột đề kháng. Tiếp tục đánh giá trên các rối loạn chuyển hoá, luận án xây dựng hai mô hình: 1) chuột có thể trọng $\geq 30\%$, triglycerid $\geq 30\%$, glucose $\geq 8,3$ mmol/L. Các chuột thử nghiệm mô tả tình trạng rối loạn chuyển hoá như người béo phì, tăng thể trọng, rối loạn lipid máu và tiền đái tháo đường týp 2. Đánh giá hiệu quả của TBLMAC trên các chuột này nhận thấy rõ, TBLMAC có làm giảm đáp ứng glucose sau ăn; khi dùng dài hạn,

TBLMAC đã cải thiện rõ thể trọng và nồng độ glucose máu lúc đói ngay từ tuần thứ 4 ở mức liều cao, tuần thứ 8 ở mức liều thấp; trên các chỉ số lipid gồm triglycerid và cholesterol cũng ghi nhận được sự cải thiện rõ rệt sau 8 tuần; tiếp tục đánh giá trên tình trạng đề kháng insulin, TBLMAC cũng thể hiện được vai trò thông qua làm giảm nồng độ insulin, giảm chỉ số Homa-IR và tăng dung nạp glucose, tăng dung nạp insulin. 2) chuột có thể trọng $\geq 30\%$, triglycerid $\geq 30\%$, glucose $\geq 8,3$ mmol/L tiêm STZ gây tổn thương tế bào tuyến tụy, chọn các chuột có glucose $\geq 11,1$ mmol/L để đánh giá khả năng dung nạp glucose khi dùng TBLMAC. Kết quả cũng ghi nhận được nồng độ glucose giảm, mức HbA1c giảm và cải thiện dung nạp glucose. Khi phân tích phân chuột ăn TBLMAC sau 20 ngày, kết quả cũng cho thấy sự có mặt các SCFAs và tăng 39% so với phân chuột ăn TBLMTN, điều này hoàn toàn phù hợp với mô tả trong định nghĩa về tinh bột đề kháng của Englyst và cộng sự. Các ảnh hưởng dài hạn của TBLMAC trên các rối loạn chuyển hoá này có thể được giải thích do sự biến đổi hoá học tinh bột, làm cho cấu trúc phân tử trở nên cồng kềnh, hạn chế sự tiếp xúc của enzym amylase với các liên kết α -1,4-glycosid, làm giảm hình thành glucose, đồng thời, sản phẩm SCFAs tạo ra với hàm lượng cao đã thể hiện vai trò của TBLMAC trên điều hoà chuyển hoá glucose-lipid thông qua các cơ quan như ruột, gan, mô mỡ, mô cơ, tuyến tụy và thần kinh trung ương như tăng tiết PYY và GLP-1, tăng tạo glycogen, ức chế tân tạo glucose ở gan, tăng sử dụng glucose ở mô đích, tăng trao đổi chất và oxy hóa acid béo chuỗi dài, tăng tiết insulin. Như vậy, TBLMAC có lợi ích sức khỏe trên các rối loạn chuyển hoá và có tiềm năng lớn để phát triển thành sản phẩm ứng dụng trong chăm sóc sức khỏe.

KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành nghiên cứu tạo sản phẩm mới - TBLMAC có tính an toàn và hiệu quả trên *in vivo* với các kết quả như sau:

- TBLMAC được tạo bởi phản ứng giữa anhydric acetic 9% và tinh bột lúa mì tinh chế trong 150 phút có hàm lượng acetyl = 2,42% và mức độ thay thế $D_s = 0,094$. Được kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn an toàn chất lượng sử dụng trong thực phẩm.
- TBLMAC chứa 32,11% hàm lượng tinh bột đề kháng và có khả năng đề kháng enzym amylase, giảm hình thành glucose.
- TBLMAC an toàn khi dùng ngắn hạn và dài hạn trên động vật thử nghiệm
- TBLMAC làm giảm đáp ứng glucose sau ăn; giảm thể trọng, giảm nồng độ triglycerid, cholesterol và cải thiện tình trạng đề kháng insulin ở chuột béo phì; tăng khả năng dung nạp glucose ở chuột béo phì kèm tăng đường huyết sau 8 tuần thử nghiệm với liều 5 g/kg, 1 lần/ngày.
- Trong phân chuột ăn TBLMAC có mặt các acid béo mạch ngắn với hàm lượng tăng 39% so với TBLMTN.

KIẾN NGHỊ

Qua kết quả nghiên cứu trên, luận án đưa ra các kiến nghị như sau:

- Nghiên cứu sâu hơn về vai trò của TBLMAC trên các biểu hiện gen liên quan đến cải thiện chức năng tế bào beta tuyến tụy.
- Nghiên cứu sâu hơn về vai trò của TBLMAC trên các biểu hiện gen liên quan đến cân bằng chuyển hóa glucose-lipid.
- Nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của TBLMAC trên sự phong phú và thành phần vi khuẩn ruột.
- Nghiên cứu sâu hơn về vai trò của tinh bột lúa mì acetat trên chuyển hóa lipid và lợi ích trên rối loạn chuyển hóa ở bệnh nhân béo phì và đái tháo đường týp 2.