# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

# ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2787051**

## СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КРАХМАЛА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ИНГРЕДИЕНТАХ

Патентообладатели: ***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха" (RU), ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ЯРМАРКА ПРОИЗВОДСТВО ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ" (RU)***

Авторы: ***Кузина Лидия Борисовна (RU), Кузьмина Любовь Григорьевна (RU), Никитина Марина Феликсовна (RU), Бызов Василий Аркадьевич (RU), Лукин Николай Дмитриевич (RU), Лунина Татьяна Леонидовна (RU), Карпина Ольга Валерьевна (RU), Резанов Вячеслав Викторович (RU)***

Заявка № **2022103223**
Приоритет изобретения **09 февраля 2022 г.**
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **28 декабря 2022 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **09 февраля 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы*
*по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 68b80077e14e40f0a94edbd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 2.03.2022 по 26.05.2023

*Ю.С. Зубов*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 787 051** (13) **C1**

(51) МПК
*A23L 29/212* (2016.01)
*G01N 33/02* (2006.01)

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
*A23L 29/212 (2022.08); G01N 33/02 (2022.08)*

(21)(22) Заявка: **2022103223, 09.02.2022**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
**09.02.2022**

Дата регистрации:
**28.12.2022**

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **09.02.2022**

(45) Опубликовано: **28.12.2022** Бюл. № 1

Адрес для переписки:
**140051, Московская обл., Люберецкий р-н, пос. Красково, ул. Лорха, 23, Литер В, ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР КАРТОФЕЛЯ ИМЕНИ А.Г. ЛОРХА"**

(72) Автор(ы):
**Кузина Лидия Борисовна (RU),**
**Кузьмина Любовь Григорьевна (RU),**
**Никитина Марина Феликсовна (RU),**
**Бызов Василий Аркадьевич (RU),**
**Лукин Николай Дмитриевич (RU),**
**Лунина Татьяна Леонидовна (RU),**
**Карпина Ольга Валерьевна (RU),**
**Резанов Вячеслав Викторович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):
**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха" (RU),**
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ЯРМАРКА ПРОИЗВОДСТВО ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ" (RU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **MCCLEARY B.V., MCNALLY M., ROSSISTER P. et al. "Measurement of Resistant Starch by Enzymatic Digestion in Starch and Selected Plant Materials: Collaborative Study" // Journal of AOAC International. - 2002. - 85 (5) - 1103-1111. КОПТЕЛОВА Е.К. "Оценка амилорезистентности крахмала различного происхождения и модификации", Достижения науки и техники** (см. прод.)

## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КРАХМАЛА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ИНГРЕДИЕНТАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к методам определения показателей качества в пищевой промышленности. Способ определения степени резистентности крахмала в продуктах питания и пищевых ингредиентах из зернового растительного сырья предусматривает определение массовой доли влаги и крахмала, расчет навески с учетом массовой доли сухих веществ, температурную обработку, ферментативный гидролиз панкреатической α-амилазой и амилоглюкозидазой при 37°С в течение 4 часов, причем поддержание pH среды осуществляют фосфатным буферным раствором, окончание процесса гидролиза путем добавления 50% этилового спирта, осаждение белков добавлением фосфорномолибденовой кислоты,



RU 2787051 C1

RU 2787051 C1

центрифугирование, фильтрование. Далее определяют углеводный состав гидролизата на высокоэффективном жидкостном хроматографе и рассчитывают степень резистентности крахмала по количественному содержанию глюкозы, которая образуется в результате ферментативного процесса. Изобретение направлено на разработку аналитически точного, менее продолжительного и энергозатратного простого способа количественного определения степени резистентности крахмала в пищевых продуктах и ингредиентах, изготовленных из зерновых культур. 1 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):
**АПК. 2017. Т. 31., с.60-62, УДК 637.1.023. CN 1719221 A, 11.01.2006. CN 0109916844 A, 21.06.2019. CN 0109142281 B, 29.12.2020.**

RU 2787051 C1

RU 2787051 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 787 051** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
*A23L 29/212* (2016.01)
*G01N 33/02* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
*A23L 29/212 (2022.08); G01N 33/02 (2022.08)*

(21)(22) Application: **2022103223, 09.02.2022**

(24) Effective date for property rights:
**09.02.2022**

Registration date:
**28.12.2022**

Priority:
(22) Date of filing: **09.02.2022**

(45) Date of publication: **28.12.2022** Bull. № **1**

Mail address:
**140051, Moskovskaya obl., Lyuberetskij r-n, pos. Kraskovo, ul. Lorkha, 23, Liter V, FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BYUDZHETNOE NAUCHNOE UCHREZHDENIE "FEDERALNYJ ISSLEDOVATELSKIJ TSENTR KARTOFELYA IMENI A.G. LORKHA"**

(72) Inventor(s):
**Kuzina Lidiya Borisovna (RU),**
**Kuzmina Lyubov Grigorevna (RU),**
**Nikitina Marina Feliksovna (RU),**
**Byzov Vasilij Arkadevich (RU),**
**Lukin Nikolaj Dmitrievich (RU),**
**Lunina Tatyana Leonidovna (RU),**
**Karpina Olga Valerevna (RU),**
**Rezanov Vyacheslav Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):
**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyj issledovatelskij tsentr kartofelya imeni A.G. Lorkha" (RU),**
**OBSHCHESTVO S OGRANICHENNOJ OTVETSTVENNOSTYU "YARMARKA PROIZVODSTVO PISHCHEVYKH INGREDIENTOV" (RU)**

## (54) METHOD FOR DETERMINING THE DEGREE OF STARCH RESISTANCE IN FOOD PRODUCTS AND INGREDIENTS

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to methods for determining quality indicators in the food industry. The method for determining the degree of starch resistance in food and food ingredients from grain vegetable raw materials provides for the determination of the mass fraction of moisture and starch, the calculation of the weight taking into account the mass fraction of dry substances, temperature treatment, enzymatic hydrolysis with pancreatic α-amylase and amyloglucosidase at 37 °C for 4 hours, and the pH of the medium is maintained with a phosphate buffer solution, the end of hydrolysis process by adding 50% ethyl alcohol, precipitation of proteins by adding phosphoric acid, centrifugation, filtration. Next, the carbohydrate composition of the hydrolysate is determined on a high-performance liquid chromatograph and the degree of starch resistance is calculated by the quantitative glucose content, which is produced as a result of the enzymatic process.

EFFECT: present invention involves the development of an analytically accurate, less time-consuming and energy-consuming simple method for quantifying the degree of starch resistance in food products and ingredients made from grain crops.

1 cl, 1 dwg, 4 ex

RU 2787051 C1

RU 2787051 C1

Изобретение относится к методам определения показателей качества в пищевой промышленности, а именно продуктов питания и пищевых ингредиентов на основе зерновых культур, содержащих крахмал, для оценки степени их резистентности к действию амилолитических ферментов.

Изобретение представляет собой экспресс-метод, быстрый и эффективный способ количественного определения степени резистентности крахмала в продуктах питания и пищевых ингредиентах, изготовленных из зерновых культур (мука натуральная, мука натуральная текстурированная, панировочные сухари, крупа, с содержанием жира не более 10%).

Степень резистентности (СР) - это массовая доля крахмала, который не подвергается гидролизу в тонком кишечнике человека и животных.

Изобретение используется в биотехнологии и пищевой химии для проведения анализа продуктов питания и пищевых ингредиентов на СР, с помощью определения массовой доли глюкозы в гидролизате продукта методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Известен аналогичный способ определения резистентности продуктов ирландского ученого МакКлиари, который заключается в ферментативном гидролизе панкреатической α-амилазой (ПАА) и амилоглюкозидазой (АМГ), при pH=6 и температуре 37°С в течение 4 часов, с последующей обработкой щелочью и 30-минутным гидролизом АМГ, при pH=4,5 и температуре 50°С. Определяют массовую долю глюкозы спектрофотометрическим методом. [1]

Недостатками аналогичной методики являются низкая чувствительность метода обнаружения массовой доли глюкозы, общее время проведения исследования, количество операций, нестабильность окрашенных растворов, высокая стоимость реагентов.

Известен ферментативно-гравиметрический способ определения СР - ГОСТ Р 54014-2010. Метод заключается в определении массовых долей растворимых и нерастворимых пищевых волокон, с помощью ферментативного гидролиза (амилазой, протеазой и амилоглюкозидазой) крахмальных и некрахмальных соединений. Оставшиеся пищевые волокна осаждают этиловым спиртом, высушивают и определяют гравиметрически, по разнице масс образца до и после гидролиза. [2]

Недостатком известного способа является высокая сложность операций, продолжительность подготовки пробы и ошибка опыта.

Известен способ АО АС 2002.02 - прототип, предусматривающий определение СР в продуктах питания на основе растительного сырья. При этом образец гидролизуется панкреатином и АМГ, после этого из массовой доли общего крахмала, вычитается содержание глюкозы в растворенном щелочью осадке, которое определяется спектрофотометрическим методом. Общее время гидролиза составляет 16 часов, его проводят при температуре 37°С. После этого в гидролизаты добавляют раствор щелочи, нейтрализуют их и проводят вторую стадию гидролиза с АМГ в течение 30 мин, далее добавляют окрашивающий реактив GOPOD и проводят определение содержания глюкозы на спектрофотометре, при длине волны 540 нм. [3]

Недостатком прототипа является высокая продолжительность подготовки пробы, энергозатратность, высокая стоимость реагентов и нестабильность окрашенных растворов.

Таким образом, задачей, на решение которой направлено данное изобретение, является разработка аналитически точного, менее продолжительного и энергозатратного простого способа количественного определения степени резистентности крахмала в пищевых продуктах и ингредиентах изготовленных из зерновых культур (мука

натуральная, мука натуральная текстурированная, панировочные сухари, крупа, с содержанием жира не более 10%).

Это достигается тем, что способ определения степени резистентности, предусматривает подготовку пробы, определение массовой доли влаги, расчет навески, определение массовой доли крахмала, температурную обработку, ферментативный гидролиз, центрифугирование, фильтрование, проведение определения углеводного состава на ВЭЖХ. По сравнению с другими существующими методами является менее продолжительным и энергозатратным, более простым и точным (предел обнаружения - 0,028 г / 100 г, у аналога - 0,036 г / 100 г).

Способ реализуется следующим образом. Определяют массовую долю влаги по ГОСТ Р 55802-2013 и крахмала по ГОСТ 10845-98. Рассчитывают массу навески с учетом массовой доли сухих веществ. Готовят 1% раствор, варят его при 100°С в течение 15 мин, проводят ферментативный гидролиз панкреатической α-амилазой (ПАА) и амилоглюкозидазой (АМГ) при 37°С в течение 4 часов, приливают 50% этиловый спирт для окончания процесса гидролиза, затем приливают 4% фосфорномолибденовой кислоты для осаждения белков (при массовой доле белка более 10%), центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин и фильтруют. Далее проводят определение углеводного состава, полученного гидролизата на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ). Расчет степени резистентности проводится по количественному содержанию глюкозы, которая образуется в результате ферментативного процесса, и пересчитывается на массовую долю крахмала, определяемого по ГОСТ 10845-98. За окончательный результат принимается среднее арифметическое результатов 2-х определений. Вычисления проводят с точностью до первого десятичного знака, по формулам:

$$СР = \frac{М_{св} - М_{г}}{М_{св}} \times К, (1)$$

где СР - степень резистентности образца продукта питания, %;

$М_{св}$ - масса испытуемого образца продукта по сухому веществу, отобранная для проведения исследования, г ($М_{св}$ = 1 г);

$М_{г}$ - масса глюкозы в надосадочной жидкости в пересчете на 1 г испытуемого образца, г;

К - массовая доля крахмала, для пересчета СР, %.

$$М_{г} = \frac{М_{св} \times Г}{100} \times 0{,}9\ , (2)$$

где Г - ассовая доля глюкозы по показаниям ВЭЖХ, %;

$М_{Св}$ - масса навески испытуемого крахмала по сухому веществу, отобранная для проведения исследования, г ($М_{св}$ = 1 г);

100 - коэффициент пересчета массовой доли глюкозы, %;

0,9 - коэффициент перевода количества глюкозы, в количество крахмала (по соотношению молекулярных масс ангидроглюкозного звена крахмала и глюкозы 162/180=0,9).

Схема с необходимыми для осуществления метода определения операциями находится на Фиг.

Далее приведены примеры конкретного выполнения изобретения.

Пример 1. Определение степени резистентности натуральной пшеничной муки 1 сорта (11,6% белка):

1. Определяют массовую долю влаги по ГОСТ Р 55802-2013 и крахмала по ГОСТ

10845-98.

2. Навеску пшеничной муки массой 1,00 г по сухому веществу, помещают в мерную колбу 100 см$^3$, добавляют приблизительно 50 см$^3$ дистиллированной воды, нагревают 100°С и варят в течение 15 мин, перемешивая вращательными движениями содержимое колбы.

3. Полученный раствор сваренного образца охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 см$^3$ фосфатного буферного раствора с pH=6,86 и доводят объем дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

4. К раствору образца добавляют ферментные препараты: 4 см$^3$ ПАА активностью 100 ед./см$^3$ и 0,4 см$^3$ АМГ активностью 300 ед./см$^3$.

5. Тщательно перемешивают смесь, закрывают полимерной пробкой и инкубируют при температуре 37°С в течение 4 ч в водяном термостате.

6. Добавляют 4 см$^3$ 50%-го раствора этилового ректификованного спирта, для остановки гидролиза, и перемешивают.

7. Приливают 0,4 см$^3$ 4% фосфорномолибденовую кислоту для осаждения белка.

8. Гидролизат центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин в полимерных пробирках для центрифугирования объемом 100 см$^3$.

9. После расслоения супернатант фильтруют через бумажный обеззоленный фильтр «Синяя лента», фильтрат используют для определения углеводного состава на жидкостном хроматографе.

10. Проводят определение углеводного состава на жидкостном хроматографе, состоящем из бинарного насоса со смесителем, колонки хроматографической обращенно-фазной углеводной (не менее 125 мм в длину, с диаметром частиц сорбента 4,6 мкм, но не более 5,0 мкм); термостата для хроматографической колонки, обеспечивающей температуру нагрева до (75,0±0,1)°С.

11. Производят расчет СР по приведенной формуле.

Пример 2. Определение степени резистентности натуральной текстурированной кукурузной муки тонкого помола - 0,05 см (6,4% белка):

1. Определяют массовую долю влаги по ГОСТ Р 55802-2013 и крахмала по ГОСТ 10845-98.

2. Навеску натуральной текстурированной кукурузной муки массой 1,00 г по сухому веществу, помещают в мерную колбу на 100 см$^3$, добавляют приблизительно 50 см$^3$ дистиллированной воды, нагревают 100°С и варят в течение 15 мин, перемешивая вращательными движениями содержимое колбы.

3. Полученный раствор сваренного образца охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 см$^3$ фосфатного буферного раствора с pH=6,86 и доводят объем дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

4. К раствору образца добавляют ферментные препараты: 4 см$^3$ ПАА активностью 100 ед./см$^3$ и 0,4 см$^3$ АМГ активностью 300 ед./см$^3$.

5. Тщательно перемешивают смесь, закрывают полимерной пробкой и инкубируют при температуре 37°С в течение 4 ч в водяном термостате.

6. Добавляют 4 см$^3$ 50%-го раствора этилового ректификованного спирта, для остановки гидролиза, и перемешивают.

7-10. Перечисленные в пунктах операции, аналогичны пунктам 8-11 примера 1.

Пример 3. Определение степени резистентности пшеничных панировочных сухарей (11,5% белка):

1. Подготавливают образец путем измельчения до прохождения частиц через сито 0,2 х 0,2 см.

2. Определяют массовую долю влаги по ГОСТ Р 55802-2013 и крахмала по ГОСТ 10845-98.

3. Навеску измельченных пшеничных панировочных сухарей массой 1,00 г по сухому веществу, помещают в мерную колбу 100 $см^3$, добавляют приблизительно 50 $см^3$ дистиллированной воды, нагревают 100°С и варят в течение 15 мин, перемешивая вращательными движениями содержимое колбы.

4. Полученный раствор сваренного образца охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 $см^3$ фосфатного буферного раствора с pH=6,86 и доводят объем дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

5. К раствору образца добавляют ферментные препараты: 4 $см^3$ ПАА активностью 100 ед./$см^3$ и 0,4 $см^3$ АМГ активностью 300 ед./$см^3$.

6-11. Перечисленные в пунктах операции, аналогичны пунктам 6-11 примера 1.

Пример 4. Определение степени резистентности риса (5,8% белка):

1. Подготавливают образец риса путем измельчения до прохождения частиц через сито 0,1 х 0,1 см.

2. Определяют массовую долю влаги по ГОСТ Р 55802-2013 и крахмала по ГОСТ 10845-98.

3. Навеску измельченных зерен риса массой 1,00 г по сухому веществу, помещают в мерную колбу на 100 $см^3$, добавляют приблизительно 50 $см^3$ дистиллированной воды, нагревают 100°С и варят в течение 15 мин, перемешивая вращательными движениями содержимое колбы.

4. Полученный раствор сваренного образца охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 см фосфатного буферного раствора с pH=6,86 и доводят объем дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

5. К раствору образца добавляют ферментные препараты: 4 $см^3$ ПАА активностью 100 ед./$см^3$ и 0,5 $см^3$ АМГ активностью 300 ед./$см^3$.

6. Тщательно перемешивают смесь, закрывают полимерной пробкой и инкубируют при температуре 37°С в течение 4 ч в водяном термостате.

7. Добавляют 4 $см^3$ 50%-го раствора этилового ректификованного спирта, для остановки гидролиза, и перемешивают.

8-11. Перечисленные в пунктах операции, аналогичны пунктам 8-11 примера 1.

Источники информации

1. Megazyme Resistant Starch Assay Kit (Rapid) 11/19. Pdf-file from https://www.megazvme.com/documents/Assay_Protocol/K-RAPRS_DATA.pdf - 2019. - P.16.

2. ГОСТ Р 54014-2010 «Продукты пищевые функциональные. Определение растворимых и нерастворимых пищевых волокон ферментативно-гравиметрическим методом».

3. McCleary B.V., McNally M., Rossister P. et al. Measurement of Resistant Starch by Enzymatic Digestion in Starch and Selected Plant Materials: Collaborative Study // Journal of AOAC International. - 2002. - 85 (5) - 1103-1111

(57) Формула изобретения

Способ определения степени резистентности крахмала в продуктах питания и пищевых ингредиентах из зернового растительного сырья, предусматривающий определение массовой доли влаги и крахмала, расчет навески с учетом массовой доли сухих веществ, температурную обработку, ферментативный гидролиз панкреатической α-амилазой и амилоглюкозидазой при 37°С в течение 4 часов, причем поддержание pH среды осуществляют фосфатным буферным раствором, окончание процесса гидролиза путем добавления 50% этилового спирта, осаждение белков добавлением фосфорномолибденовой кислоты, центрифугирование, фильтрование, далее определяют углеводный состав гидролизата на высокоэффективном жидкостном хроматографе и рассчитывают степень резистентности крахмала по количественному содержанию глюкозы, которая образуется в результате ферментативного процесса, по формулам

$$СР = \frac{М_{св} - М_{г}}{М_{св}} \times К, (1)$$

где СР - степень резистентности образца продукта питания, %;

$М_{св}$ - масса испытуемого образца продукта по сухому веществу, отобранная для проведения исследования, г;

$М_{г}$ - масса глюкозы в надосадочной жидкости в пересчете на 1 г испытуемого образца, г;

К - массовая доля крахмала, для пересчета СР, %;

$$М_{г} = \frac{М_{св} \times Г}{100} \times 0{,}9\ , (2)$$

где Г - массовая доля глюкозы по показаниям ВЭЖХ, %;

$М_{св}$ - масса навески испытуемого крахмала по сухому веществу, отобранная для проведения исследования, г;

100 - коэффициент пересчета массовой доли глюкозы, %;

0,9 - коэффициент перевода количества глюкозы в количество крахмала по соотношению молекулярных масс ангидроглюкозного звена крахмала и глюкозы 162/180=0,9.

1

Образец
продукта питания
1 г по сухому веществу
Приготовление суспензии
Температурная обработка 15 мин
Охлаждение + буферный р-р pH 6,86
АМГ + ПАА
Инкубация t = 37⁰C 240 мин
C2H5OH, 50%
Остановка гидролиза
Фосфорномолибденовая кислота, 4%
Осаждение белков,
при массовой доли белка
более 10 %
Центрифугирование 10 мин
Определение
углеводного состава
на ВЭЖХ