

Study on the detection method of starch in silage corn

Yanjie Liu Haihe Xu Wenlong Zhu Yuxuan Liu Jiawei Tong

Beijing Sanyuan Seed Industry Technology Co., Ltd. Feed Division, Beijing, 100151, China

Abstract

The experiment aims to establish a simple, accurate, and reproducible method for rapid determination of starch content in silage corn. The study added gelatinized samples to the test under the catalysis of starch glucosidase (AGS), and finally hydrolyzed them into glucose. Glucose oxidase (GOD) catalyzes the oxidation of β -D-glucose (glucose aqueous solution) under aerobic conditions, producing hydrogen peroxide. Under the catalysis of peroxidase (POD), hydrogen peroxide reacts with 4-aminoantipyrine (4-AAP) and phenol to form a red quinone imine. Measure the absorbance of quinone imine at a wavelength of 505 nm. The results showed that there was a linear relationship between the amount of starch standard solution and the absorbance of the reaction solution, with a correlation coefficient of 0.9998 and a relative standard deviation of less than 1.3%. The detection results were not significantly different from those determined by GB 5009.9-2023 enzymatic hydrolysis method. Research has shown that the method used in the experiment to determine the starch content in silage corn has the advantages of simplicity, speed, high accuracy, and good repeatability, and can be used as a rapid detection method for starch content in silage corn.

Keywords

silage corn; Starch; Glucose oxidase; Peroxidase

青贮玉米中淀粉检测方法的研究

刘艳杰 徐海贺 朱文龙 刘宇璇 仝家玮

北京三元种业科技有限公司饲料分公司, 中国·北京 100151

摘要

试验旨在建立青贮玉米快速测定淀粉含量的方法, 操作简便, 准确度高, 结果稳定。研究将糊化过的青贮玉米样品中加入在淀粉葡萄糖苷酶(AGS), 经过在一系列反应后, 得到最终产物为葡萄糖。该原理是在氧气条件下催化 β -D-葡萄糖氧化, 在氧气下形成过氧化氢及其葡萄糖水解产物, 首先由葡萄糖氧化酶(GOD)构成。其次经过氧化物酶(POD)催化作用, 经4-氨基安替比林(4-AAP)和苯酚生成醌亚胺, 经过氧化氢与4-氨基安替比林反应而成。该物质呈红色, 在505nm波长下用可见分光光度计测定测出醌亚胺的吸光度。^[1]测试结果显示: 淀粉标准液的量与反应液的吸光度呈线性关系, R^2 为0.9998, 相对标准偏差小于1.3%, 测试结果与GB 5009.9—2023^[2]酶水解法测定结果无太大差异。研究表明, 试验所采用的方法对青贮玉米中淀粉含量的测定具有操作简便、准确度高等优点, 因此可作为青贮玉米中淀粉含量的测定方法进行试验。

关键词

青贮玉米; 淀粉; 葡萄糖氧化酶; 过氧化物酶

1 引言

淀粉作为畜禽获取能量的核心物质, 是评估饲料营养价值的关键指标之一, 在科学评价其营养价值的同时, 准确测定粗饲料中淀粉的含量, 不仅可以提供数据支持, 还有助于深入研究反刍动物碳水化合物的代谢调节机制。随着畜牧业的发展, 青贮玉米因具有原材料易获取、营养物质较多、工艺简单等优点, 通常作为重要的饲料来源, 广泛应用于反刍类动物, 不仅能够满足反刍类动物的自身营养需要, 还可以提升农产品的质量。淀粉在青贮玉米的营养构成中所占比重较大, 且主要供给反刍动物能量, 是衡量青贮玉米饲用价

值的重要指标。

当前国内具有的检测标准 GB/T 20194-2018《动物饲料中淀粉含量的测定 旋光法》(MOD ISO 6439:2000)^[3], 不适用于含有在分析过程中具有光学活性, 不溶于淀粉以外的干扰物质 40% 乙醇的样品, 检测范围存在一定的局限性, 如马铃薯, 甜菜的叶、根、冠, 以及含量丰富葡萄糖的产品; 另一项检测标准 GB/T 42491-2023《饲料中淀粉总含量的测定 酶法》(MOD ISO 15914:2004)^[4]其适用范围仅为配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料, 在定量检测部分需采购试剂盒, 会增加对耗材技术性能验收的工作。

目前国内标准中尚无适用青贮饲料淀粉含量测定的方法, 在团体标准 T/JLSLGY 0001-2020《全株青贮饲料质量评定》^[5]中, 淀粉检测执行 GB/T 20194, 但其适用范围并没有涉及青贮玉米等粗饲料样品类型。

【作者简介】刘艳杰(1996-), 中国河北承德人, 本科, 助理畜牧师, 从事动物食品检测研究。

测定饲料中淀粉含量的方法有多种,常用的有酸水解法、酶水解法和近红外法等。酸水解法容易造成空白值偏高,并且有一定的危害性。近红外法对样品的均匀性很高,在颜色上容易干扰。其中,酶水解法因其操作简便、精确度高而被广泛应用。酶水解法测定淀粉含量的基本原理是利用淀粉酶将淀粉水解成葡萄糖,然后通过比色法或滴定法测定葡萄糖的含量,从而间接得出淀粉的含量。该方法的关键在于选择合适的淀粉酶和严格控制水解条件,以确保淀粉完全水解成葡萄糖。^[6]

本研究在NY/T 802-2004《乳与乳制品中淀粉的测定 酶-比色法》的原有酶解法基础上开展优化改进,核心改动为为每份待测样品同步设置样品空白,以此消除可溶性糖等样品本底干扰物质对检测结果的影响,进一步提升检测数据的准确性。日常检测实践中发现,基于该方法研发的商品化检测试剂盒已实现试剂标准化,且实际应用效果良好。本研究将该优化后的方法拓展应用于青贮玉米样品的淀粉检测,同时提出两项关键注意事项:其一,饲料样品需充分混匀,防止因样品不均导致检测结果出现偏差;其二,应结合不同饲料的种类与特性,针对性选择适配的检测方法。^[7]

总之,淀粉含量的测定是饲料质量控制和动物饲养管理的重要环节。通过选择合适的测定方法和严格控制测定条件,可以准确、快速地测定饲料中的淀粉含量,为饲料配方设计和动物饲养效果提供有力支持。

2 试验方法

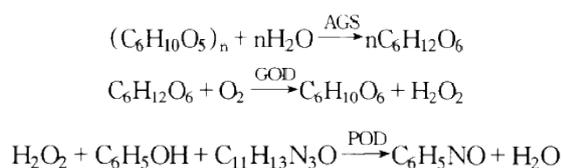
2.1 适用范围

用于玉米青贮饲料样品中淀粉含量的快速检测。

2.2 原理

“Trinder 反应”,方法起源于第一次由科学家 Trinder 提出,后来称为偶联终点比色法,该反应的原理是:被测物质在酶的催化作用下生成过氧化氢(H₂O₂),过氧化氢与4-氨基安替比林(4-AAP)中进一步发生反应,最终生成红色的醌亚胺化合物。^[8]

将此原理应用于淀粉检测中,加入淀粉葡萄糖苷酶(AGS),在酶的催化下,最终水解生成葡萄糖。有氧条件下,β-D-葡萄糖(即葡萄糖水溶液)在葡萄糖氧化酶(GOD)的催化下发生氧化反应,生成D-葡萄糖酸-8-内酯和过氧化氢。通过氧化物酶(POD)催化过氧化氢,与4-氨基安替比林(4-AAP)和苯酚反应,生成红色醌亚胺化合物。在505nm波长下测定该醌亚胺的吸光度值,并与标准系列进行比较以完成定量分析。^[9]



2.3 材料与方法

淀粉葡萄糖苷酶(amyloglucosidase)溶液:取100mL容量瓶,依次加入1.920g一水柠檬酸(C₆H₈O₇·H₂O)、7.415g二水柠檬酸三钠(C₆H₅O₇Na₃·2H₂O)试剂,同时加入相当于100u(活力单位)质量的淀粉葡萄糖苷酶,加水溶解,定容至刻度并摇匀,调节pH至4.6。该溶液于4℃左右保存,有效期为1个月。

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)一过氧化物酶(辣根,peroxidase)溶液:取100mL容量瓶,依次加入1.300g无水磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、4.739g十二水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)试剂,同时加入相当于400u(活力单位)质量的葡萄糖氧化酶和1000u(活力单位)质量的过氧化物酶,加水溶解后定容至刻度并充分摇匀,调节pH至7.0。该溶液需在约4℃的条件下保存,有效期为1个月。

0.00154mol/L 4-氨基安替吡啉溶液:取100mL水,溶解0.0313g 4-氨基安替吡啉(C₁₁H₁₃N₃O)。

0.022mol/L 苯酚溶液:取100mL水,溶解0.0207g 苯酚(C₆H₅OH)。

二甲基亚砷[(CH₃)₂SO]。

6mol/L 盐酸溶液:将等体积的水与12 mol/L 盐酸(HCl)混合,摇匀。

6mol/L 氢氧化钠溶液:取100mL水,溶解24g 氢氧化钠(NaOH)试剂,摇匀。

淀粉标准溶液:在100mL容量瓶中,加入0.200g的100℃±2℃干燥2h的可溶性淀粉[(C₆H₁₀O₅)_x],精确至0.0001g,加入少量60℃水进行溶解,冷却至室温后,用水定容至刻度并摇匀。移取该溶液10mL,加水稀释并定容至100mL,即得到浓度为200ug/mL的淀粉标准溶液。

2.4 试验仪器

万分之一电子天平;分光光度计(505nm);酸度计;水浴箱;涡旋混合器;台式离心机;10mL具塞比色管;100mL玻璃锥形瓶;250mL玻璃容量瓶;微量移液器20~200μL;移液管。

2.5 试验过程

2.5.1 样品的准备

青贮玉米样品:经过植物专用粉碎机粉碎,过100目标准分析筛后,再取样进行分析检测。

2.5.2 样品处理

取10mL具塞比色管,准确加入0.1g样品(精确至0.0001g),加入前处理液(1.3.5和1.3.6溶液按4:1混合)5mL,充分涡旋混合后,于59℃恒温水浴中水浴处理60min,期间每隔10min涡旋混合2min。水浴结束后,冷却至室温,转移到100ml锥形瓶中,利用浓度为1mol/L氢氧化钠溶液,调节pH值至4.6左右。取250mL容量瓶,将调节pH后的溶液进行转移,定容至刻度并摇匀,离心10min,上清液即为试样溶液。当试样中淀粉含量高于600μg/mL时,

则继续稀释。

2.5.3 绘制标准曲线

取 10mL 容量瓶，用微量移液器吸取 0.20mL 待测试样和试样空白（待测试样中淀粉的含量而定可做稀释），按 1.3.2 中操作进行。从“各加入 0.5mL 淀粉葡萄糖苷酶溶液”开始，操作步骤见表 1。

采用 1cm 比色皿测定各管样液在 505nm 波长处的吸光度。先用蒸馏水调分光光度计零点，再以等量试剂调整仪器至零点，作为空白校准。测出试样吸光度后，在标准曲线上即可查出对应的淀粉含量。

取 6 个 10mL 容量瓶中，分别用微量移液器移取 0.00mL、0.20mL、0.40mL、0.60mL、0.80mL、1.00mL 淀粉标准溶液，分别加入淀粉葡萄糖苷酶溶液 0.5mL，摇匀，放入 60℃ ± 1℃ 恒温水浴锅中加热 20min，取出后冷却至室温，依次加入葡萄糖氧化酶 - 过氧化物酶溶液 0.5ml、4- 氨基安替吡啉溶液 0.5mL 和苯酚溶液 0.5mL，摇匀，于 36℃ ± 1℃ 恒温水浴锅中加热 40min，取出后冷却至室温，用水定容到刻度并摇匀。以 0.00mL 的淀粉标准溶液对应的试剂作为空白对照，在 505nm 波长下，采用 1cm 比色皿于可见分光光度计中测定各样品的吸光度值。以淀粉含量为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制其标准曲线。也可以采用单点法，如选用 200ug/mL 标准浓度进行定量分析。

2.5.4 样液的测定

取 10mL 容量瓶，用微量移液器吸取 0.20mL 待测试样和试样空白（待测试样中淀粉的含量而定可做稀释），按 1.3.2 中操作进行。从“各加入 0.5mL 淀粉葡萄糖苷酶溶液”开始，操作步骤见表 1。

采用 1cm 比色皿，于 505nm 波长处测定各管的吸光度。先用蒸馏水调仪器零点，再以等量试剂作为空白校准分光光度计至零点。测出试样吸光度后，在标准曲线上查出对应的淀粉含量。

表 1 试验操作步骤

| 容量瓶加入物 | 标准 | 标准对照 | 测定 | 测定对照 |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 淀粉标准溶液 200ug/mL(mL) | 0.200 | 0.200 | / | / |
| 待测试样 (mL) | / | / | 0.200 | 0.200 |
| 蒸馏水 (mL) | / | 0.500 | / | 0.500 |
| 试剂 3.1(mL) | 0.500 | / | 0.500 | / |
| 混匀，59℃保温 20 分钟，冷却至室温 | | | | |
| 试剂 3.2、3.3、3.4(mL) | 各 0.500 | 各 0.500 | 各 0.500 | 各 0.500 |
| 混匀，37℃保温 40 分钟，冷却至室温 | | | | |

2.6 计算

$$X = \frac{OD_{\text{测定}} - OD_{\text{测定对照}}}{OD_{\text{标准}} - OD_{\text{标准对照}}} \times C \times \frac{V \times 100}{m \times 1000} \quad (1)$$

采用单点法测定样品中淀粉的含量，以质量百分率表示，按 (1) 式计算：

式中：

X——样品中淀粉的含量，单位为百分率（%）；

OD 测定——测定管吸光度；

OD 测定对照——测定对照管吸光度；

OD 标准——标准管吸光度 -；

OD 标准对照——标准对照管吸光度；

C——淀粉标准液浓度，200μg/mL；

m——试样的质量，mg；

V——试液的定容体积，250mL；

1000——μg 与 mg 的换算单位；

采用标准曲线法测定样品中淀粉的质量百分含量，按

(2) 式计算，结果保留两位小数：

$$X(\%) = \frac{C \times V_1}{m \times V_2 \times 1000} \quad (2)$$

式中：

X——试样中淀粉的质量百分含量（%）；

C——由标准曲线上查得的待测液中淀粉含量（μg）；

m——试样的质量（g）；

V₁——试样的定容体积（mL）；

V₂——测定时分取试样的体积（mL）。

注：同一试样的两次测定之差，不得超过两次测定平均值的 5.0%

3 性能指标试验

3.1 线性情况

按照 1.3.5 中规定的浓度移取淀粉标准溶液，进行酶解反应，检测其吸光值，并绘制曲线。

3.2 精确度试验

本试验采用两个浓度水平（50mg/g、100 mg/g）进行加标回收，每个浓度梯度平行测定 5 次，通过加标回收率来验证本试验的精确度。

3.3 重复性试验

测定同一个青贮玉米 8 份样品的淀粉含量。

3.4 稳定性情况

将待测样品每经过 24h 滞留后进行一次吸光值检测，对比其含量变化情况。

3.5 不同方法间比对

本研究方法与 GB 5009.9—2023 酶水解法测定方法检测结果进行比对。

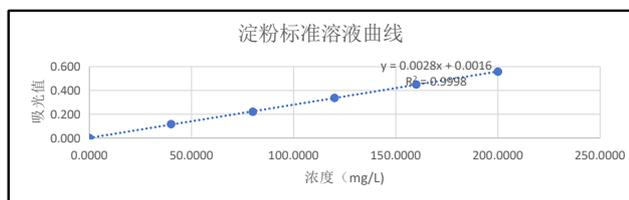
4 结果与分析

4.1 绘制标准曲线

表 2 所示为标准淀粉溶液检测结果，图 1 所示为淀粉浓度标准曲线。结果表明，采用分光光度法测定 40-200m g/L 浓度范围的淀粉时，溶液吸光度与淀粉含量呈现良好的线性关系，R²=0.9998，线性回归方程为 y=0.0028+0.0016。

表2 标准淀粉溶液浓度检测结果

| 序号 | 标准曲线浓度 (mg/L) | 吸光度值 (0.001) |
|----|---------------|--------------|
| 1 | 0.0000 | 0.000 |
| 2 | 40.0000 | 0.117 |
| 3 | 80.0000 | 0.221 |
| 4 | 120.0000 | 0.337 |
| 5 | 160.0000 | 0.450 |
| 6 | 200.0000 | 0.558 |



4.2 精确度试验 (见表3)

表3 精确度试验

| 淀粉加入浓度/(mg/g) | 理论淀粉浓度/(mg/g) | 平均回收浓度/(mg/g) | 平均回收率/% | 相对标准偏差/% |
|---------------|---------------|---------------|---------|----------|
| 100.13 | 383.5 | 378.6 | 98.33 | 1.34 |
| 50.38 | 363.6 | 367.2 | 98.73 | 0.98 |

由表3可知,淀粉的平均回收率为98.33%~98.73%,5次平行测定结果的相对标准偏差为0.98-1.34。因此,本测定方法的精确度高,满足化学分析方法确认和验证的技术要求^[10]。

4.3 重复性试验结果 (见表4)

表4 青贮玉米重复性检测结果

| 样品名称 | 平均结果 % | 相对偏差 % |
|--------|--------|--------|
| 青贮玉米-1 | 31.33 | 1.21 |
| 青贮玉米-2 | 34.50 | 0.87 |

由表4可知,青贮玉米两组样品各8次平行测定结果的相对标准偏差为1.21%和0.87%,因此,本测定方法的重复性良好,满足化学分析方法确认和验证的技术要求,测量结果的准确性进一步得到保证^[10]。

4.4 稳定性情况

将待测样品糊化后溶液每经过24h滞留后进行一次酶解反应后吸光度检测,其含量变化情况检测表(5)。

表5 淀粉含量检测稳定性情况

| 时间 | 0小时 | 24小时 | 48小时 | 72小时 | 96小时 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 青贮玉米淀粉含量 % | 31.15 | 31.05 | 31.00 | 29.89 | 28.37 |

由上表数据显示,待检样品试液中淀粉糊化后的反应液较稳定,48小时内完成检测对结果影响不显著。

4.5 不同测定淀粉含量方法间检测结果比较

一份青贮玉米样品同时使用本研究方法和GB 5009.9—2023中酸水解法进行检测,酸水解法测得该样品淀粉含量为27.10%,而使用本研究方法检测该样品淀粉含量结果为27.40%。综上,两次检测结果比对满足再现性要求。

5 讨论

本试验对酶解方法进行改进优化,主要的改进在于每个待测定样品均设置一个样品空白对照,以保证在试验最终结果中排除样品本身可溶性糖及其他物质的影响。该试验通过预糊化样品、淀粉酶反应以及比色法,制定了试验步骤,其优势在于快速测定及增加检测量(可实现单次检测30份样品)。同时研发出一种新的检测青贮玉米淀粉含量的方法,通过比较方法,对精密度、重复性及稳定性参数分析,证实该方法具有可行性。

本试验结果显示,淀粉浓度在40~200mg/L范围内时,吸光度与葡萄糖含量呈良好线性关系, $R^2=0.9998$, 回归方程为 $y=0.0028x+0.0016$; 精密度试验中,淀粉平均回收率为98.33%~98.73%,5次平行测定的标准偏差为0.98~1.34; 重复性试验下,所有结果的相对标准偏差均低于3%,各项指标均符合化学分析方法确认与验证的相关技术规范。此外,本方法的测定结果与其他酶解法结果高度吻合,证实该方法兼具有效性与可行性,可客观、精准地完成淀粉含量检测,为原料采购及质量验收工作提供科学、可靠的检测依据。

6 结论

本试验研究青贮玉米中的淀粉含量测定,该方法具有操作简单、精确度高优势,可发展青贮玉米中淀粉含量检测的方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部,乳与乳制品中淀粉的测定 酶一比色法:NY/T802-2004[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [2] 国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局.食品安全国家标准食品中淀粉的测定:GB 5009.9—2023[S].北京:中国标准出版社,2023.
- [3] 国家标准化管理委员会,国家市场监督管理总局.动物饲料中淀粉总含量的测定 旋光法:GB/T 20194-2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [4] 国家标准化管理委员会,国家市场监督管理总局.饲料中淀粉总含量的测定 酶法:GB/T 42491-2023[S].北京:中国标准出版社,2023.
- [5] 吉林省饲料工业协会.全株青贮饲料质量评定:T/JLSLGY 0001-2020.吉林省:2020.
- [6] 张杏莉,蔡艳玲,张幻,张志刚,丁能水.饲料中淀粉检测方法的研究[J].饲料研究,2021(18):106-109.
- [7] 张雪,刘子放,南张杰,张秋芝.研究报告:青贮玉米淀粉测定方法的研究[J].分子植物育种,2022(17):5788-5789.
- [8] 王建伟.饲料中淀粉含量测定方法的比对研究[J].兽药饲料,2021(08):66-67.
- [9] 曹伟,武林,石琴琴,张楠,贾洪敏,李丹丹,孙春华,杨青.饲料原料中淀粉准去监测方法的研究和应用[J].饲料工业,2023(23):103-106.
- [10] 潘浣玉,郝艳娟,陈诗欣,李子珊,何绮霞.酶法测定饲料中淀粉总含量方法研究.广东饲料,2023(12):42-47.
- [11] 国家标准化管理委员会,国家质量监督检验检疫总局.合格评定化学分析方法确认和验证指南:GB/T 27417—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.