中华人民共和国国家标准

《饲料中淀粉总含量的测定酶法》

编制说明

（公开征求意见稿）

广州汇标检测技术中心

广东省农科院农业质量标准与监测技术研究所

广东农科监测科技有限公司

《饲料中淀粉总含量的测定酶法》标准编制组

2022年4月

目 录

一、工作简况.....4
1. 任务来源.....4
2. 标准制定背景.....4
3. 主要工作过程.....6
1. 成立标准编制小组.....6
2. 国内外相关标准和文献资料查询.....7
3. 技术路线和项目方案的制定.....7
4. 开展方法学研究、样品检测.....8
5. 编写标准文本和编制说明征求意见稿、征求意见...8
6. 征求意见和方法验证.....9
7. 标准的预审、终审和报批.....9
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....10
1. 标准编制原则.....10
2. 调整内容的说明.....11
2.1 结构调整.....11
3. 主要技术内容确定的依据.....12
3.1 国内外相关标准文献.....12
3.2 样品来源.....14
3.3 术语和定义.....14
3.4 原理.....15
3.5 方法研究.....15
3.5.1 淀粉分解与溶解.....15
3.5.2 水解酶酶活对淀粉检测结果的影响.....17
3.5.3 酶解时间的研究.....19
3.5.4 不同酶检测淀粉含量的研究.....21
3.5.5 糖提取次数的研究.....24
3.5.6 样品粉碎度粒度的确定.....26

3.5.7 振荡速度对淀粉含量的影响.....28
3.5.8 葡萄糖浓度检测.....29
3.5.8.1 线性范围.....29
3.5.8.2 两种检测葡萄糖浓度方法的比较.....30
3.5.9 酶法与旋光法检测结果比较.....31
3.6 定量限.....32
3.7 精密度实验.....33
3.8 准确度实验.....34
三、试验验证的分析综述报告.....36
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况.....36
五、采标情况.....36
六、与有关法律、法规的关系.....36
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....36
八、涉及专利的有关说明.....37
九、贯彻标准的要求和措施建议.....37
十、其他应予说明的事项.....37
附录.....38
参考文献.....40

一、工作简况

1. 任务来源

根据2020年国家标准化管理委员会下达的2020年第三批推荐性国家标准计划文件（国标委发【2020】48号），由广州汇标检测技术中心、广东省农科院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司共同承担《饲料中淀粉总含量的测定酶法》国家标准制定工作（项目编号20203786-T-469），本标准主管部门为国家标准化管理委员会，全国饲料工业标准化技术委员会归口。

2. 标准制定背景

淀粉多存在于绿色植物的果实、种子、块茎和块根中，是自然界中含量很丰富的一类碳水化合物，是饲料中不可或缺的原料，也是畜禽所需能量的重要来源，是反映饲料营养价值的一个重要指标。在《中国饲料成分及营养价值表》中，淀粉是常规成分指标之一。饲料中淀粉含量的准确测定，对准确评定饲料营养价值，研究动物对碳水化合物营养代谢与调节有重要的意义。

根据淀粉在体外消化速率的不同，可将淀粉分为三类：快速消化淀粉（rapidly digestible starch, RDS）、缓慢消化淀粉（slowly digestible starch, SDS）和抗性淀粉（resistant starch, RS）。其中抗性淀粉也称抗酶解淀粉，它不能在动物小肠中消化吸收，却可在大肠内发酵产生短链脂肪酸（short-chain fatty acids，SCFA）。SCFA可促进结肠细胞生长增殖，参与肠道发育的基因表达，并使肠道环境呈酸性，因此抗

性淀粉具有益生元特性。国内外学者探究不同类型抗性淀粉对动肠道健康和生长性能的影响，发现抗性淀粉能够维持动物肠道菌群平衡，提高动物生长性能。抗性淀粉的物理化学性质，与其他淀粉相比有较大区别，抗性淀粉在水中的溶解性更低，耐热性高，一般需要二甲基亚砜（DMSO）溶液或氢氧化钾溶液才能充分溶解。

测定淀粉含量的方法包括有酶解法、酸解法、酶电极法、双波长法、近红外光谱分析法、旋光法和差热分析法等方法。目前较常用的是酶水解法、酸水解法和旋光法。

目前，饲料中淀粉含量测定的国家标准有《动物饲料中淀粉含量的测定旋光法》（GB/T 20194-2018），其适用范围有一定的局限性，不适用于含有和淀粉一样具有光学活性，且不溶于40％乙醇的干扰物质的试样，如马铃薯浆，甜菜的丝、叶、根、冠，酵母，大豆产品，羽扇豆以及富含葡萄糖的产品（如菊苣根和菊芋）。另外对于直链淀粉含量超过40%的样品，如高直链玉米淀粉（HylonVII）等旋光法也不适用。酸水解法常使用盐酸水解淀粉，操作较简单，适用于非淀粉多糖含量较低的样品，对于含非淀粉多糖如纤维素等较多的样品，由于酸水解不具有专一性，因此往往得到偏高的检测结果。酶水解法由于酶水解的专一性，准确性较高，而目前国内尚无关于饲料中淀粉含量测定酶法的国家标准、行业标准等官方标准。

在国外标准方面，饲料中淀粉测定标准有 ISO 6493:2000, Animal feeding stuffs-Determination of starch content-Polarimetric method，和 ISO 15914:2004 Animal feeding stuffs — Enzymatic determination of

total starch content。ISO 6493:2000 方法基于旋光法测定饲料中淀粉含量，国家标准 GB/T 20194-2018 修改采用该标准。ISO 15914:2004 以酶法为基础测定饲料淀粉含量。本标准制定项目拟修改采用国际标准 ISO 15914:2004，制定饲料中淀粉含量检测的酶法标准，对饲料中淀粉含量的检测方法进行补充，达到准确测定饲料中淀粉含量，加强饲料原料评估、提高饲料利用率的目的，使饲料中淀粉含量检测标准进一步与国际标准接轨，促进我国饲料生产业和养殖业的高质量发展。

3. 主要工作过程

1. 成立标准编制小组

2020 年 11 月，广州汇标检测技术中心、广东省农科院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司接到《饲料中淀粉总含量的测定酶法》国家标准制定项目任务后，组织了相关人员对该标准的具体工作进行了认真细致的研究，确定了总体工作方案，成立了标准编制小组，制定工作计划，落实了参与标准制定的人员及分工，详见表 1。

表 1　标准主要起草人员及任务分工

人员	承担任务
何绮霞	项目主持人。方案设计、标准文本和编制说明编制和完善、征求意见、报批
王智民	项目统筹、协调实施
潘浣钰	项目实施、标准文本和编制说明编写和完善、征求意见收

	集及汇总
郝燕娟	样品收集、检测方法研究
王威利	检测方法研究
陈诗欣	检测方法研究
刘海燕	提供样品及检测方法研究
何媛怡	检测方法研究
付强	检测方法研究
闵曼	检测方法研究
冯敬宾	标准文本和编制说明修改完善
刘芳芳	检测方法研究

2. 国内外相关标准和文献资料查询

2020 年 11 月～2021 年 4 月，标准编制小组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定指导思想。

3. 技术路线和项目方案的制定

2021 年 4 月，标准编制小组根据前期的查询的标准和文献资料，经讨论制定了标准制定技术路线和试验方案，技术路线图如图 1 所示。

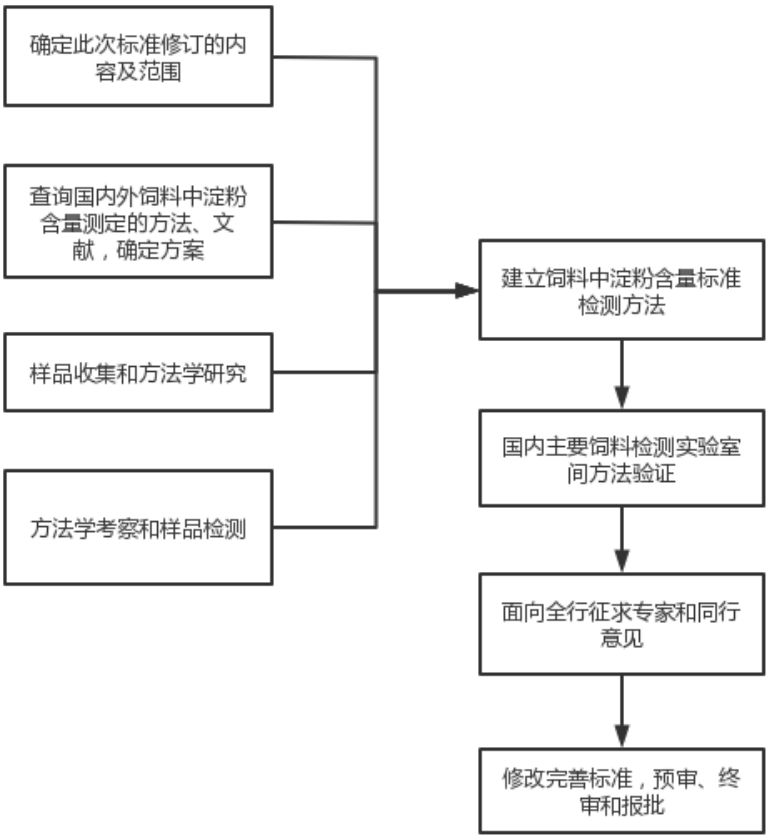

图 1 标准制定技术路线图

4. 开展方法学研究、样品检测

2021 年 4 月~2021 年 10 月，标准编制小组确定了标准修订工作思路，收集了饲料原料、配合饲料、精料补充料和浓缩饲料样品开展淀粉含量检测方法学研究和实际样品测定。

5. 编写标准文本和编制说明征求意见稿、征求意见

2021 年 12 月，标准编制小组完成了标准文本、编制说明初稿征求意见稿的编制工作。

6. 征求意见和方法验证

2021 年 12 月标准编制小组将起草完成的国家标准《饲料中淀粉总含量的测定酶法》标准文本和编制说明征求意见稿发送给国家饲料质检中心、省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的质检机构、科研院所、高校、企业等单位的专家征求意见。

本次发函征求意见 1 个月，共发函单位 25 个，回函单位 20 个、未回函单位 5 个，提出意见单位 20 个，无意见单位 0 个；共提出意见 170 条，采纳 105 条，部分采纳或不采纳 65 条。标准编制小组根据征求得到意见和建议，对标准草案和编制说明进行认真的修改、完善，并补充相关数据。

2022 年 2 月~3 月，标准编制小组分别委托国家饲料质量监督检验中心（武汉）、广东省农产品质量安全中心、四川威尔检测技术股份有限公司 3 家检测机构开展国家标准《饲料中淀粉总含量的测定酶法》方法验证工作。

7. 标准的预审、终审和报批

2022 年 04 月 21 日，标准编制小组组织专家进行了预审，预审意见见附件。标准编制小组根据预审会专家组的意见和建议，进一步补充、修改完善标准文本和编制说明，形成国家标准《饲料中淀粉总含量的测定酶法》公开征求意见稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

2022 年×月×日至 2022 年×月×日，全国饲料工业标准化技术委员会秘书处按照《全国饲料工业标准化技术委员会标准终审管理办法（试行）》的有关要求，将公开征求意见稿通过官方网站中国畜牧兽医信息网向社会公开征求意见。网上公开征求意见期间 。公开征求意见结束后，标准编制小组形成了国家标准《饲料中淀粉总含量的测定酶法》送审稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

2022 年×月×日，全国饲料工业标准化技术委员会组织开展了本标准的终审，终审意见见附件。标准编制小组最后根据终审会的审查意见，补充了等相关试验并对该标准的适用范围再次征求了相关专家和企业的意见，进一步修改完善标准文本和编制说明，再次形成送审稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

2022 年×月×日，全国饲料工业标准化技术委员会组织完成了本标准的审核，标准编制小组最后根据审查意见，进一步修改完善标准文本和编制说明，于 2022 年×月×日向全国饲料工业标准化技术委员会秘书处提交国家标准《饲料中淀粉总含量的测定酶法》报批稿。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

1. 标准编制原则

本文件的结构、技术要素和表达方法按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》、GB/T 1.2-2020《标准化工作导则第 2 部分：以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化

文件起草规则》和 GB/T 20001.4-2015 《标准编制规则第 4 部分：试验方法标准》的规定和要求进行编写。

2. 调整内容的说明

本文件除按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》、GB/T 1.2-2020《标准化工作导则第 2 部分：以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化文件起草规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编制规则第 4 部分：试验方法标准》对标准进行编辑性修改外，根据技术内容对我国的适用性，对结构进行了调整，对技术内容作出了补充。

2.1 结构调整

本文件与 ISO15914:2004 相比在结构上有所调整，章条编号差异对照情况见表 2。

表 2　本文件与 ISO15914:2004 的章条编号差异对照表

本文件章条编号	ISO15914:2004 章条编号
—	6.9
—	6.10
—	6.11
6.9	6.12
6.10	6.13
6.11	6.14
6.12	6.15
6.13	6.16
8.1	8.1
	8.2
	8.3
8.2.1	8.4.1
8.2.2	8.4.2
8.2.2	8.4.3
8.2.3	8.4.4

8.3	8.5
8.4	8.6
10.4	—
附录 A	—
附录 C	附录 A
附录 D	附录 B

3. 主要技术内容确定的依据

3.1 国内外相关标准文献

酶法检测淀粉含量方法一般可分为四个步骤：1、可溶性糖提取；2、淀粉分解与溶解；3、淀粉转化成葡萄糖；4、葡萄糖浓度检测。

经过查阅研究国内外饲料、谷物、食品等相关领域的淀粉含量检测标准和检测方法，其中以酶法测定淀粉含量的方法要点归集如表 3 所示：

表 3 国内外淀粉含量的检测标准

适用范围	方法名称	可溶性糖提取溶剂	淀粉分解与溶解	淀粉转化成葡萄糖	葡萄糖量测定
饲料	ISO 15914:2004 Animal feeding stuffs — Enzymatic determination of total starch content	40%乙醇溶液	二甲亚砜（100℃，30min）盐酸（60℃，30min）	淀粉葡萄糖苷酶（60℃，16h）	己糖激酶法，分光光度法
谷物产品	AOAC 996.11 Starch (total) in cereal products amyloglucosidase-α-amylase method	80%乙醇溶液	沸水浴（5min）	耐高温α-淀粉酶（沸水浴，5min）淀粉葡萄糖苷酶（50℃，30min）	葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，分光光度法
除肉制品	GB 5009.9-2016 食品中淀粉的测定（第	85%乙醇溶	沸水浴（15min）	高峰氏淀粉酶（55~60℃，1h）	直接定法

外的食品	一法）	液		盐酸（沸水浴，1h）	
肉及肉制品	ISO 13965:1998 Meat and meat products-Determination of starch and glucose contents-Enzymatic method	40%乙醇溶液	煮沸（15min）	α-淀粉酶（煮沸，15min）淀粉葡萄糖苷酶（60℃，15min）	己糖激酶法，分光光度法
糖果	AOAC 925.50 Starch in confectionery	50%乙醇溶液	沸水浴（15min）	麦芽提取液（55℃，1h）盐酸（沸水浴，2.5h）	重量法/间接滴定法/电极法
烘焙咖啡	AOAC 920.10 Starch in roasted coffee	50%乙醇溶液	沸水浴（15min）	麦芽提取液（55℃，1h）盐酸（沸水浴，2.5h）	重量法/间接滴定法/电极法
所有含淀粉的食品	AACC 76-11 Starch-glucoamylase method with subsequent measurement of glucose with glucose oxidase	80%乙醇溶液	煮沸（15min）高压（135℃，1h）	淀粉葡萄糖苷酶（55℃，2h）	葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，分光光度法
谷物产品	AACC 76-13.01 Total Starch Assay Procedure(Megazyme Amyloglucosidase/α-Amylase Method)	80%乙醇溶液	含抗性淀粉较少的样品：沸水浴，5min 含抗性淀粉较多的样品：DMSO，沸水浴，5min	耐热α-淀粉酶（沸水浴，5min）淀粉葡萄糖苷酶（50℃，30min）	葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，分光光度法
烟草及烟草制品	YC/T 283-2009 烟草及烟草制品淀粉的测定酶水解-离子色谱法	乙醇	沸水浴（1.5h）	α-淀粉酶（100℃，1.5h）淀粉葡萄糖苷酶（60℃，2h）	离子色谱法
乳及乳制品	NY/T 802-2004 乳与乳制品中淀粉的测定酶-比色法	/	二甲亚砜（60℃，30min）盐酸（60℃，30min）	淀粉葡萄糖苷酶（60℃，20min）	葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，分光光度

					法
含有抗性淀粉的植物和淀粉制品	AOAC 2002.02 Resistant Starch in Starch and Plant Materials Enzymatic Digestion	50%乙醇溶液	抗性淀粉：氢氧化钾溶液	非抗性淀粉：α-淀粉酶+淀粉葡萄糖苷酶（37℃，16h） 抗性淀粉：AMG（50℃，30min）	葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，分光光度法
稻米及制品抗性淀粉	NY/T 2638-2014 稻米及制品中抗性淀粉的测定分光光度法	50%乙醇溶液	抗性淀粉：氢氧化钾溶液	非抗性淀粉：α-胰腺淀粉酶+淀粉葡萄糖苷酶（37℃，16h） 抗性淀粉：AMG（50℃，30min）	葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，分光光度法

3.2 样品来源

本标准起草过程中用于检验和验证的样品主要来源于市场销售、经委托方允许使用的送检饲料原料及配合饲料、浓缩饲料、精料补充料等不同类型的饲料产品。

3.3 术语和定义

（1）淀粉　starch

淀粉的定义是根据 ISO 15914:2004 国际标准文本，参考 GB/T 20194-2018 动物饲料中淀粉含量的测定旋光法中淀粉的定义给出。

由 1,4-α-D-葡萄糖单位组成的无分支长直链（直链淀粉）和/或在α-1,6 位形成支链的α-1,4-糖苷键连接的葡萄糖单位（支链淀粉）组成的天然植物性多聚物。

（2）淀粉含量　starch content

淀粉含量的定义是根据 ISO 15914:2004 国际标准文本，参考 GB/T 20194-2018 动物饲料中淀粉含量的测定旋光法中淀粉含量的定义给出。

根据本文件测定的不溶于 40%乙醇的淀粉及其高分子降解产物的质量分数。

3.4 原理

先用 40 %乙醇除去试样中的可溶性糖，再用 90%二甲基亚砜溶液 100 ℃处理，并用浓盐酸 60 ℃溶解和部分分解试样中的淀粉，再用淀粉葡萄糖苷酶进一步酶解为葡萄糖，葡萄糖量经己糖激酶法测定后，换算成淀粉含量。

3.5 方法研究

3.5.1 淀粉分解与溶解

从表 3 中可知，淀粉分解与溶解方面，有沸水浴/煮沸，高压 135℃处理等。近年的一些研究表明，仅水煮不足以使试样中的淀粉充分糊化，如 Liu 等（2020）的研究表明，试样经 100℃煮沸 60min 处理，测得的淀粉含量仍然明显低于高压处理或碱溶液处理。特别在涉及到抗性淀粉（resistant starch）时，因为抗性淀粉不溶于水，耐热性高，一般需要 DMSO 或氢氧化钾溶液进行溶解。Brunt 等（1998）测试了 5 种淀粉分解与溶解的方式，分别是：1、加水煮沸 30 min；2、0.08M 盐酸溶液中 100℃反应 30 min；3、DMSO/8M HCl 60℃反应 60 min；4、0.5M NaOH 溶液中 60℃反应 30 min；5、DMSO/H_2O（9/1）100℃反应 30 min，再在 DMSO/8M HCl（3.3/1）中 60℃反应 30 min。检测

试样包括 4 类样品：蜡质玉米淀粉、饲料类、高直链淀粉类、抗性淀粉类共 9 个样品，其结果如表 4 所示：

表 4：4 类样品用不同淀粉分解与溶解的方式处理后测得的淀粉含量

样品	淀粉含量（%） 样品处理方式				
	1	2	3	4	5
	加水煮沸 30 min	0.08M 盐酸溶液中 100 ℃反应 30 min	DMSO/8M HCl 60℃反应 60 min	0.5M NaOH 溶液中 60 ℃反应 30 min	DMSO/H_2O（9/1）100 ℃反应 30 min，再在 DMSO/8M HCl（3.3/1）中 60 ℃反应 30 min
蜡质玉米淀粉	97.8	99.8	97.5	97.6	98.7
饲料					
玉米	55.3	71.7	34.2	71.9	71.5
木薯淀粉	68.2	70.0	69.8	70.1	70.5
牛饲料	3.4	4.7	3.8	4.6	4.5
豌豆	38.7	48.4	47.9	46.2	48.3
高直链淀粉					
Cerestar	82.1	87.7	96.2	96.2	97.9
Latenstein	84.0	58.9	94.3	95.7	98.0
Gelose	94.1	92.7	94.3	97.7	98.1
抗性淀粉					
Cerestar	53.2	79.7	52.4	94.5	95.6

从表 4 中可看出，各种样品测得淀粉含量数据都最高的是 NaOH 溶液处理和 DMSO 两步法处理；加水煮沸 30 min（处理 1），在检测各种常见饲料如玉米、木薯淀粉、牛饲料及高直链淀粉和抗性淀粉

时，结果均偏低，说明仅沸水浴并不足以充分糊化试样中的淀粉；0.08M 盐酸溶液处理常见饲料样品时和 NaOH 溶液处理和 DMSO 两步法处理结果相近，但在检测高直链淀粉及抗性淀粉时，所测得淀粉含量值明显偏低；处理 4 碱处理和处理 5 DMSO 两步法处理各种试样所测得的淀粉含量比较接近，但由于在进一步实验中发现处理 4 加碱 60℃处理易形成凝胶；故最优处理方法是 DMSO 两步法。

3.5.2 水解酶酶活对淀粉检测结果的影响

ISO 15914:2004 所使用的酶是淀粉葡萄糖苷酶（Amyloglucosidase），国际酶分类学编号为 EC 3.2.1.3。该酶有多个别名，如糖化淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、1,4-α-D-葡聚糖葡萄糖水解酶、糖化酶等。该酶可从淀粉分子的非还原性末端依次水解 α-1,4 糖苷键切下葡萄糖，也可水解支链淀粉分支点的 α-1,6 糖苷键，既可分解直链淀粉，又可分解支链淀粉，可将淀粉 100%水解成葡萄糖。

从表 3 中可知，国内外淀粉含量测定的标准中主要采取的方法有淀粉葡萄糖苷酶直接水解的方法、α-淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶的双酶法，还有使用 α-淀粉酶和盐酸处理的酶酸法，麦芽提取液水解等。Brunt 等（1998）测试了多种不同酶混合处理的方案，酶的种类包括淀粉葡萄糖苷酶、脱支酶、α-淀粉酶，发现由于各酶之间最适的温度和 pH 条件差异太大，混合酶处理的效果并不理想。单独使用淀粉葡萄糖苷酶，转化效果良好。因此本方法采用淀粉葡萄糖苷酶单一酶进行水解。

ISO 15914:2004 中对酶活进行了规定，规定标准中 AMG 的活性单位定义如下：在 25℃，pH4.75 条件下 1 min 从肝糖中释放 1μmol 葡萄糖的 AMG 的量即为 1 单位 AMG。而许多市售酶的酶活定义与该定义不同。以 Sigma 的淀粉葡萄糖苷酶（Amyloglucosidase，No 10115）为例，其酶活单位一单位指在 pH 4.8 和 60℃下，每分钟释放 1 μmol 葡萄糖的酶量（淀粉符合 Zulkowsky，货号 85642，作为底物）。

（https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh/product/sigma/10115?context=product）编制组参考《酶学实验手册》（第二版）记录的淀粉葡萄糖苷酶酶活测定方法 Sigma No. 10115 的 AMG 进行检测，发现在该条件下酶活仅为 6 U/mg，与在 60℃测定时的值差异很大。

编制组分别按照酶的标示活性和按本标准酶活条件检测的酶活性进行酶添加检测玉米、猪配合饲料和淀粉三种样品的淀粉含量，其结果如表 5 所示，可以看到按本标准酶活条件检测的酶活性添加所测得的结果要高于按照酶的标示活性进行添加的结果。提示酶添加量不足会导致淀粉酶解不充分。由于酶在存放的过程中酶活可能会发生变化，因此在进行酶添加之前应对酶活进行检测，按照测出的酶活进行添加。

表 5 按不同条件下酶活性进行酶添加对淀粉含量检测结果的影响

样品名称	淀粉含量（%）	
	按本标准酶活条件检测的酶活添加	按酶的标示酶活 80U/mg 添加
玉米	63.4	59.4

猪配合饲料	45.5	41.9
淀粉	91.7	84.2

3.5.3 酶解时间的研究

Brunt 等测试了不同的酶解时间对淀粉含量检测的影响，如图 2 所示，发现在淀粉葡萄糖苷酶最优反应条件下（60℃，pH4.8），酶解 1 小时，约有 96%的淀粉转化成葡萄糖；酶解 4 小时后，有 99%的淀粉转化成葡萄糖；酶解 16 小时以上，试样淀粉的转化率达到 99.5%以上，可认为转化完全。

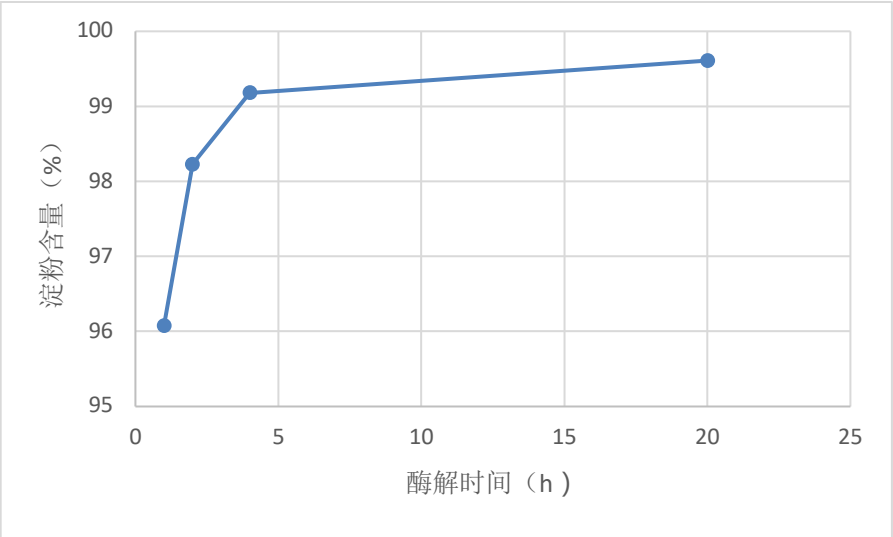

图 2 不同 AMG 酶解时间对蜡质淀粉的淀粉含量测定结果的影响

为了进一步研究酶解时间是否会对淀粉检测结果造成影响，编制组设计实验，对玉米和木薯淀粉两种试样分别酶解 1 小时、4 小时、6 小时、12 小时、16 小时、18 小时、20 小时，结果如图 3，图 4 所示。

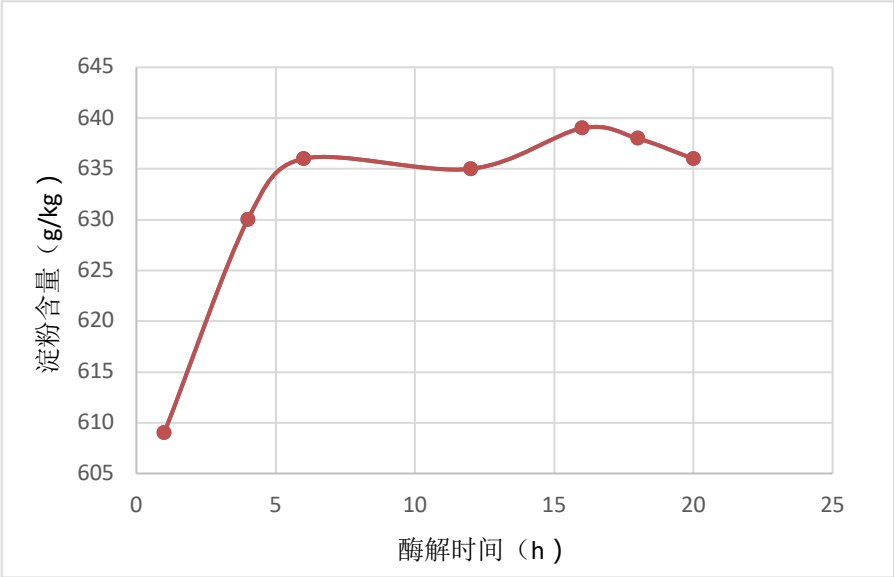

图 3 不同 AMG 酶解时间对玉米的淀粉含量测定结果的影响

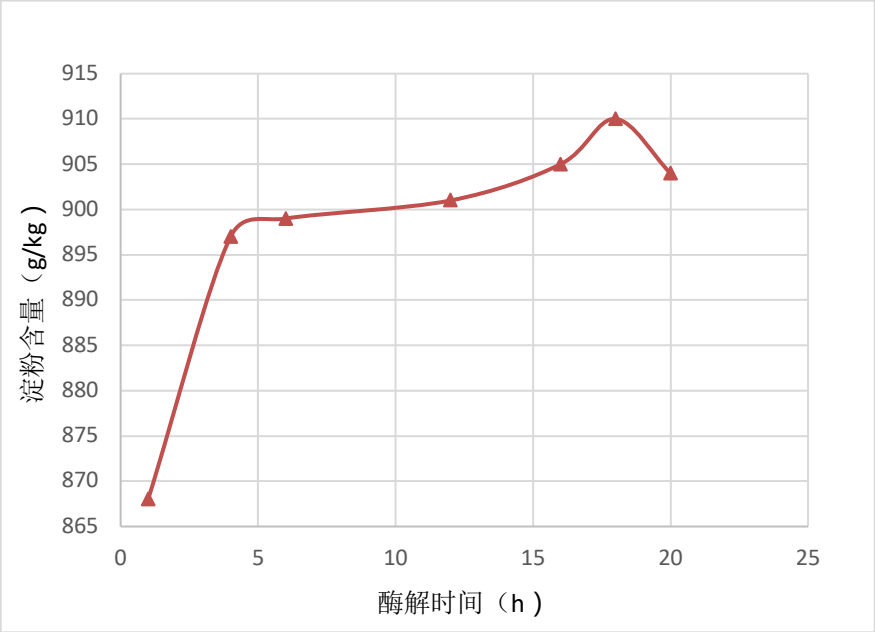

图 4 不同 AMG 酶解时间对木薯淀粉的淀粉含量测定结果的影响

从图中可知，测得的玉米和木薯淀粉两种样品的淀粉含量测定结果随酶解时间延长而增加，当酶解时间达到 16 小时到 20 小时之间时，淀粉含量检测结果趋于稳定，检测结果之间差值小于 0.5 %，说明 16 小时是较合适的酶解时间；延长酶解时间在 4 小时以内，淀粉检测结果无明显差异。

3.5.4 不同酶检测淀粉含量的研究

为了研究不同酶对淀粉含量检测结果的影响，标准编制组收集了国内外共 8 种酶，其酶活规格，酶活定义如表所示。从表中可以看出，不同供应商提供的酶活定义差异很大，除了 ROAMYGLL Roche 11202367001 之外，其他产品的酶活均不是在标准所指定的 25℃条件下测得。因此编制组参考《酶学实验手册》（第二版）记录的淀粉葡萄糖苷酶酶活测定方法对几种酶的酶活进行了检测，数据见表 6，可以看出，当条件变化时，所测得的酶活与标示酶活相差很大。

表 6 不同来源酶的比较

物料名称	品牌	型号	酶活	形态	酶活定义	检测酶活（U/mg、U/mL）
淀粉葡萄糖苷酶	ROAMYGLL Roche	11202367001	8 U/mg	固体（晶体）	1 单位指在 25℃，pH4.75 条件下 1 min 从肝糖中释放 1μmol 葡萄糖的 AMG 的量。	7.9
淀粉葡萄糖苷酶	Sigma	10115	70 U/mg	固体	一单位指在 60℃、pH=4.8 的条件下，每分钟释放 1μmol 葡萄糖的酶量。	6.0
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 1	/	/	10 万 U/ml，液体	液体	1 毫升酶液在 40℃、pH4.6 的条件下，1 小时水解可溶性淀粉产生 1 毫克葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位。	/
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 2	/	/	100kU/ml	液体	在 40℃，PH4.6 条件，1ml 的酶液 1 小时水解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖的酶量。	3948
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 3	/	/	液化型，10 万 U/ml	液体	1g 固体酶粉（或 1mL 液体酶），于 40℃、pH=4.6 的条件下，1h 分解可溶性淀粉产生	3818

					1mg 葡萄糖，即为一个酶活力单位，以 u/g（mL)表示。	
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 4	/	/	液化型,10 万 U/ml	液体	于 40℃、pH=4.6 的条件下，1h 分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖的酶量即为一个酶活力单位。	12514
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 5	/	/	BR,10 万 U/G	固体	在 40℃,PH4.6 条件，1g 的酶粉 1 小时水解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖的酶量。	1.6
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 6	/	/	液化型,10 万 U/ml	液体	在 60-62℃，PH4.0-4.5 条件，1mim 内转换 1umol 底物所需要的酶为 1 个酶活单位 U。	2392

按照各品牌淀粉葡萄糖苷酶测得的酶活添加进行淀粉含量检测，其结果如表 7 所示。

表 7 不同来源酶检测淀粉含量数据比较

品牌型号	淀粉含量（%）	
	玉米	淀粉
ROAMYGLL Roche 11202367001	64.5	89.3
Sigma 10115	63.9	91.8
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 2	74.9	99.7
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 3	71.9	101.2
淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 4	69.5	99.2

从表 7 中可以看出，ROAMYGLL Roche 11202367001 和 Sigma 10115 所测得淀粉含量的结果比较相近，而淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 2、

淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 3、淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 4 几种酶酶解后测得的淀粉含量结果均明显较高，其中淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 3 测淀粉含量结果超过 100%，不符合实际。

实验过程中发现不同供应商所提供的酶，其性状有很大差异。ROAMYGLL Roche 的淀粉葡萄糖苷酶其形态是晶体状，易溶解于缓冲液中，检测时空白值较低，与水空白吸光值非常接近。Sigma10115 的淀粉葡萄糖苷酶是淡黄色粉末，会有结块，但经超声后即迅速溶解，检测时空白值也与水空白吸光值接近。淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 5 的固体酶也是淡黄色粉末，但溶解的时候无法完全溶解在缓冲溶液中，并且在对酶溶液进行碘检测时，出现蓝色，显示酶产品中本身就含有淀粉，这就有可能导致在进行 8.4 酶解后加碘液检测反应是否完全的步骤中，空白和样品均出现蓝色，无法正确判断酶解是否完全，影响检测结果准确性。淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 6，淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 2，淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 3，淀粉葡萄糖苷酶酶制剂 4 几种淀粉葡萄糖苷酶是棕色液体，检测时空白值较高，用 Molisch 反应检测可知酶液中含有糖类物质。Rose 等使用未纯化的市售酶和经纯化后的市售酶酶解检测植物组织中的淀粉含量，发现未纯化的市售酶检测结果高于经纯化后的市售酶。这可能是因为酶液中的糖类杂质可被酶分解为葡萄糖，与样品中淀粉分解产生的葡萄糖同样可被显色检测出来，从而影响检测结果。使用酶法检测谷物产品中总淀粉含量的标准 AOAC 996.11 中就明确规定所使用的淀粉葡萄糖苷酶溶液应不可检出游离

糖。因此在使用本标准时，推荐使用经过纯化的不可检出游离糖的淀粉葡萄糖苷酶，如 Sigma10115 和 ROAMYGLL Roche 11202367001。

为了进一步考察 Sigma10115 和 ROAMYGLL Roche 11202367001 检测淀粉含量结果的异同，编制组以鲟鱼配合饲料、豌豆、木薯粉、玉米、牛精料补充料、猪配合饲料、木薯淀粉作为样品，按照测定的酶活分别添加 Sigma10115 和 ROAMYGLL Roche 11202367001 进行酶解，测定样品的淀粉含量，实验结果见表 8。

表 8 Sigma10115 和 ROAMYGLL Roche 11202367001 测定淀粉含量结果比较

	Sigma10115（%）	ROAMYGLL Roche 11202367001（%）	平均值（%）	极差/均值（%）
鲟鱼配合饲料	7.5	7.4	7.5	1.46
豌豆	36.6	37.5	37.0	2.68
木薯粉	37.2	37.5	37.3	0.83
玉米	64.1	63.7	63.9	0.74
木薯淀粉	90.2	90.0	90.1	0.25
牛精料补充料	34.0	34.5	34.2	1.68
猪配合饲料	44.2	43.8	44.0	1.00

从实验结果可以看出，使用 Sigma10115 和 ROAMYGLL Roche 11202367001 两种酶进行酶解，测定结果基本一致。

3.5.5 糖提取次数的研究

本标准是通过测定淀粉酶解产生的葡萄糖量来计算淀粉含量的，因此如果样品中含有其他干扰葡萄糖含量测定的物质，就会影响淀粉

测定结果的准确性。近年来，随着养殖科学、动物营养学研究的发展，许多研究表明，饲料中适量添加葡萄糖有利于促进动物的生长，降低料肉比，减少仔猪腹泻发生几率，提高保育仔猪的抗应激能力，因此，在饲料，特别是仔猪料中添加葡萄糖的情况越来越多，这些添加的葡萄糖，如果不能在测定前去除干净，必然会影响到淀粉含量测定的结果。因此，标准编制组设计实验，选取了玉米、乳猪奶粉、木薯粉、豌豆、中鸡配合饲料、中猪配合饲料、玉米青贮料、膨化大豆、麦麸、混合多元素青贮料、小猪配合饲料、米糠、膨化玉米，测定提取液中的还原糖含量，以评估提取的效率。实验结果如表 9 所示。

表 9 不同提取次数提取液中可溶性还原糖浓度

数值：提取液可溶性还原糖浓度单位：mg/mL

样品名称	玉米	乳猪奶粉	木薯粉	豌豆	中鸡配合饲料	中猪配合饲料	玉米青贮料	膨化大豆	麦麸	混合多元素青贮料	小猪配合饲料	米糠	膨化玉米
第一次提取	0.46	3.72	0.49	0.90	0.96	0.65	0.31	1.50	0.96	0.09	0.73	0.28	0.51
第二次提取	0.16	0.50	0.34	0.49	0.34	0.20	0.18	0.31	0.21	0.06	0.24	0.17	0.16
第三次提取	0.12	0.25	0.26	0.30	0.20	0.18	0.11	0.11	0.11	0.06	0.19	0.10	0.14
第四次提取	0.12	0.13	0.17	0.23	0.18	0.15	0.11	0.11	0.10	0.06	0.10	0.07	0.12
第五次提取	0.11	0.13	0.16	0.18	0.16	0.13	0.12	0.11	0.10	0.06	0.10	0.07	0.10

从结果中可以看出，乳猪奶粉第一次提取液中可溶性还原糖浓度远远高于其他样品，达到 3.72 mg/mL。经 40%乙醇提取后，样品中还原糖含量迅速下降，但达到一定提取次数后，即使增加提取次数，

提取液中仍可测出一定量的糖，可以认为此时样品达到一个平衡的状态，不需要再增加提取次数。乳猪奶粉经两次提取后，第三次提取液中还原糖的含量仅 0.25 mg/mL，之后两次提取液中糖的浓度相等，说明此时样品与溶液中的糖达到平衡，且糖的含量是第一次提取液浓度的约 6.7%，对淀粉含量测定结果的影响约为 1%。考虑到多数样品在两次提取之后，提取液中糖的浓度可达到平衡，且提取液中还原糖对淀粉含量测定结果的影响都在 1%以下，因此标准中确定提取次数为两次，当遇到添加葡萄糖量较大的仔猪料等样品时，可酌情增加糖提取次数。

3.5.6 样品粉碎度粒度的确定

ISO 15914:2004 中没有指明样品的粉碎度，为评估样品粉碎粒度对饲料中淀粉含量测定结果的影响，选取代表性样品鸡配合饲料、玉米，分别按照全部通过 0.85mm、0.425mm、0.3mm、0.25mm 试验筛的粒度要求制备试样，测定它们的淀粉含量，实验结果见表 10。

表 10 不同粉碎粒度淀粉含量测定结果

<table>
<tr><th>样品名称</th><th>粉碎粒度</th><th>淀粉含量（%）</th><th>试验平均值（%）</th><th>试验RSD（%）</th><th>不同粒度平均值（%）</th><th>不同粒度RSD（%）</th></tr>
<tr><td rowspan="9">玉米</td><td rowspan="3">0.85mm</td><td>60.6</td><td rowspan="3">60.4</td><td rowspan="3">1.10</td><td rowspan="9">63.3</td><td rowspan="9">2.96</td></tr>
<tr><td>60.9</td></tr>
<tr><td>59.6</td></tr>
<tr><td rowspan="3">0.425mm</td><td>65.0</td><td rowspan="3">64.2</td><td rowspan="3">1.13</td></tr>
<tr><td>63.5</td></tr>
<tr><td>64.2</td></tr>
<tr><td rowspan="2">0.3mm</td><td>64.8</td><td rowspan="2">64.2</td><td rowspan="2">0.97</td></tr>
<tr><td>64.2</td></tr>
</table>

		63.5				
	0.25mm	65.2	64.4	1.47		
		64.6				
		63.3				
鸡配合饲料	0.85mm	43.0	43.9	1.89	44.4	1.73
		43.9				
		44.7				
	0.425mm	44.7	45.0	0.70		
		44.9				
		45.3				
	0.3mm	43.9	44.1	2.41		
		43.2				
		45.3				
	0.25mm	45.1	44.7	0.93		
		44.7				
		44.3				

表 10 结果表明，测定饲料中淀粉含量时，玉米样品 3 种粉碎粒度的测定结果 RSD 较三平行试验的 RSD 大，观察各粉碎度的测定结果，发现通过 0.85mm 筛的测定结果明显较通过 0.50mm，0.3mm，0.25mm 的结果小；鸡配合饲料 3 种粉碎粒度的测定结果 RSD 与三平行试验的 RSD 差异不明显；在不同样品中，粉碎通过 0.425mm，0.3mm，0.25mm 筛的测定结果均趋于稳定，考虑到实验操作的方便，选择通过 0.425mm 较为合适。

AOAC 标准 996.11 Starch (Total) in Cereal Products Amyloglucosidase-α-Amylase Method（谷物中总淀粉含量的测定淀粉葡萄糖苷酶-α-淀粉酶法）样品过 0.5mm 筛；现行国家标准《动物饲料中淀粉含量的测定旋光法》（GB/T 20194-2018）中要求样品粉碎至全部通过 0.5mm 孔筛；现行国家标准《食品中淀粉的测定》（GB

5009.9-2016）中对样品粉碎粒度的要求是0.425mm筛（相当于40目）。参考以上三个标准，发现它们对样品粉碎粒度的要求或者就是通过0.425mm筛，或者所要求的粉碎细度与0.425mm非常接近，考虑到0.425mm筛（相当于40目）在国内实验室较常用，因此选择通过0.425mm较为合适。

综上，最终确定样品粉碎至全部通过0.425mm筛（相当于40目）。

3.5.7 振荡速度对淀粉含量的影响

从实际检测中发现，在试样进行100℃糊化的过程中，振荡速度过小会造成样品在离心管底部结块，为了研究振荡速度对淀粉检测结果的影响，选取玉米、淀粉、猪配合饲料3个样品，设置振荡速度梯度为50 r/min、100 r/min、150 r/min、200 r/min研究对淀粉检测结果的影响，测定结果如图5所示。从表中可看出，振荡速度在50 r/min时，三个样品的检测结果都偏低；振荡速度在100 r/min时，检测结果略低于振荡速度在150 r/min、200 r/min时；振荡速度在150 r/min、200 r/min时，检测结果最高，且基本持平，无明显差别。因此试样进行100℃糊化的过程中，选择150 r/min的振荡速度。在实际检测中发现，糊化前加入DMSO的步骤非常关键，必须充分涡旋分散样品，边涡旋边加入DMSO溶液，盖上盖子后颠倒观察确保样品没有形成凝胶和结块。

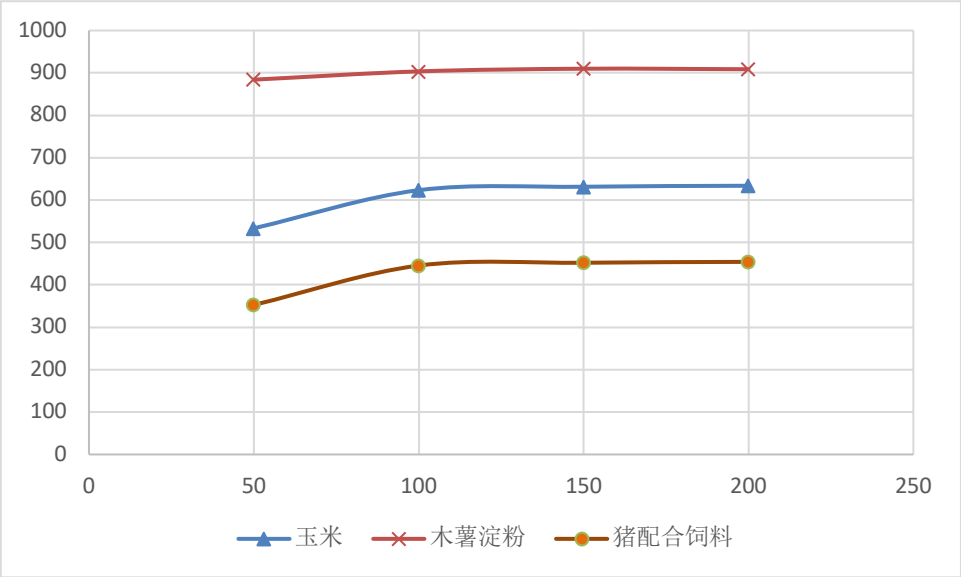

图 5 糊化时振荡速度对淀粉含量检测的影响

3.5.8 葡萄糖浓度检测

3.5.8.1 线性范围

根据仪器响应和样品中葡萄糖的浓度，制定标准曲线范围。标准曲线范围：0～0.175 g/L。标准曲线浓度点分别为：0 g/L、0.035 g/L、0.070 g/L、0.105 g/L、0.140 g/L、0.175 g/L，按照方法中的显色测定步骤进行显色测定。

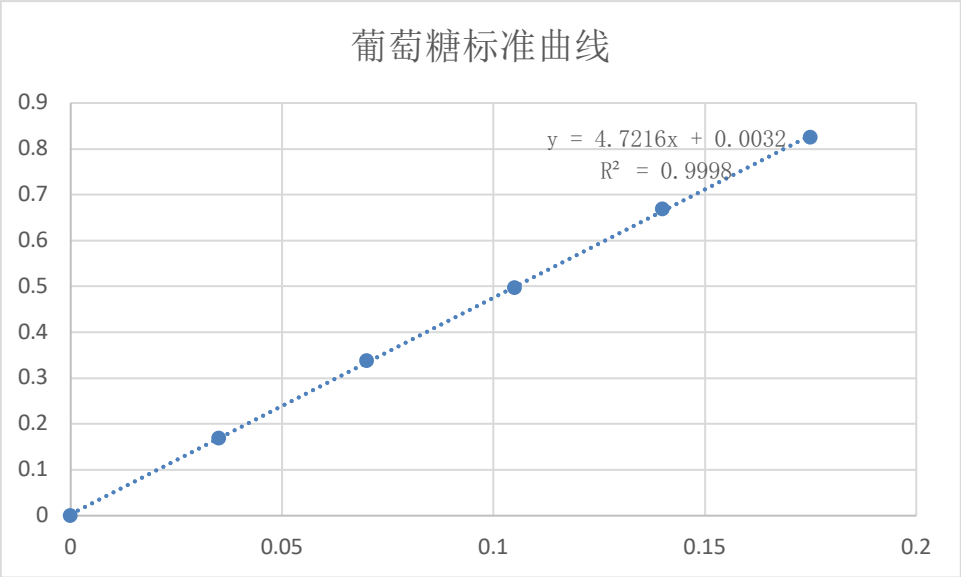

图 6 葡萄糖检测标准曲线

由图6表明，葡萄糖标准曲线在0～0.175 g/L浓度范围线性良好，相关系数0.9998，满足方法学要求。

3.5.8.2 两种检测葡萄糖浓度方法的比较

在葡萄糖的检测方法上，从表3中可看出，有分光光度法、直接滴定法、重量法/间接滴定法/电极法、离子色谱法等。其中最常用的是分光光度法和直接滴定法，直接滴定法不需要复杂的仪器，但影响因素较多，如热源强度、反应液pH值、滴定速度等均会影响测定结果，而且所测定的是还原糖的总量，专一性不强。国内外淀粉含量检测标准中常用的分光光度法一般有两种，一种是己糖激酶法，另一种是葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，两种方法都使用酶试剂进行葡萄糖的转化显色，因此都有很好的专一性。Brunt等对这两种测试葡萄糖的分光光度法方法进行，两种检测方法的重复性和再现性都能满足检测的要求，两种方法测得的结果一致性也很好。但在使用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法进行测定时，要注意试样中是否含有抗氧化物质，抗氧化物质会影响葡萄糖氧化酶的活性，导致检测结果不准。

本标准编制组参考GB/T 16285-2008食品中葡萄糖的测定酶-比色法和酶-电极法中酶-比色法使用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法（GOD-POD）对5种代表性饲料和饲料原料试样进行葡萄糖检测，其结果与己糖激酶法检测结果比较如表11所示。从表中可知，两种方法测定结果的极差与均值之比均小于8%，两种方法的测定结果基本一致。

表11 己糖激酶法试剂盒与葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法检测结果比较

样品名称	R-Biopharm,No. 716251 试剂盒		GOD-POD		极差/均值（%）
	检测值（%）	平均值（%）	检测值（%）	平均值（%）	
猪配合饲料	44.9	45.4	46.2	45.8	0.88
	45.6		45.4		
	45.8		45.8		
玉米	63.5	63.6	62.1	62.7	1.43
	63.1		63.4		
	64.2		62.6		
牛精料补充料	37.1	36.8	36.0	36.7	0.27
	36.4		37.0		
	37.0		37.0		
鲟鱼配合饲料	7.0	7.2	70	7.1	1.40
	7.4		73		
	7.2		72		
混合多元素青贮料	9.9	9.8	9.0	9.2	6.32
	9.7		9.4		
	9.7		9.0		

3.5.9 酶法与旋光法检测结果比较

分别用本标准的酶法和旋光法测定了玉米、鲟鱼配合饲料、牛精料补充料、猪配合饲料、木薯淀粉 5 种常见代表性样品的淀粉含量，所得结果如表 12 所示。

表 12 酶法与旋光法测定饲料样品中淀粉含量结果比较

样品名称	酶法（%）	旋光法（%）	平均值（%）	极差/均值（%）

玉米	63.6	63.1	63.3	0.95
鲟鱼配合饲料	7.2	7.6	7.4	5.40
牛精料补充料	36.5	38.3	37.4	4.86
猪配合饲料	45.7	47.3	46.5	3.55
木薯淀粉	90.4	91.4	90.9	1.11

结果表明，几种常见饲料原料、配合饲料及精料补充料淀粉含量测定结果的极差与均值之比均小于 8%，两种方法的测定结果基本一致。

3.6 定量限

本方法采用紫外可见分光光度计进行测定，紫外可见分光光度计测定的准确量程在吸光度值 0.1～0.7 之间，根据以上标准曲线可知，当吸光度值在 0.1 时，对应的葡萄糖浓度为 0.021 g/L，按本方法规定的称样量及最低稀释倍数推算，对应的淀粉含量为 4.1 %。

用二氧化硅与淀粉含量为 90.3 %的试样按 20:1 的比例混合，配制淀粉含量理论值接近定量限的试样，试样的淀粉含量理论值为 4.3 %。使用国家标准《饲料中淀粉总含量的测定 酶法》(GB/T ××××-202×)定向征求意见稿中的方法测定试样的淀粉含量，试样进行 6 平行试验，结果见表 13。

表 13 定量限检测结果（n=6）

试样名称	平行试验（%）						平均值（%）	RSD（%）
	1	2	3	4	5	6		

二氧化硅-淀粉 20:1 混合试样	4.2	4.4	4.2	4.2	4.3	4.5	4.3	3.1

根据实验结果可知，本方法对淀粉含量接近定量限的试样进行检测，准确度和精密度均能达到要求。因此，本方法的定量限为：4%。

3.7 精密度实验

为了考察方法的重复性，分别选取玉米、猪配合饲料、鲟鱼配合饲料、牛精补料、混合多元素青贮料，分别代表饲料原料、配合饲料、精补料、青贮料，以及淀粉含量的不同范围，分别是 60 %以上、20~60 %、20 %以下，按照标准的方法测定淀粉含量，结果见表 14。

表 14 方法的重复性试验结果

样品名称	淀粉含量（%）	平均值（%）	RSD（%）
猪配合饲料	45.3	45.5	2.1
	44.3		
	45.4		
	45.6		
	46.9		
玉米	63.7	63.4	0.7
	63.9		
	63.2		
	62.9		
	63.2		
牛精补料（泰丰）	37.0	36.3	3.3
	36.3		
	37.2		
	34.2		

	36.8		
鲟鱼配合饲料	7.3	7.2	2.3
	7.2		
	7.2		
	6.9		
	7.4		
混合多元素青贮料	9.8	9.8	0.8
	9.8		
	9.8		
	9.7		
	9.7		
4081 乳猪浓缩饲料(正大康地（澄海）)	7.4	7.8	4.8
	7.7		
	7.5		
	8.0		
	8.3		

结果表明这四种类型及不同淀粉含量水平的样品淀粉含量五平行试验测定结果相对标准偏差在 0.7%～4.8%之间，方法重复性良好。

3.8 准确度实验

为了考察方法准确度，将 0.2 g 样品中一定比例的样品替换成淀粉，按方法测定其淀粉含量，计算所添加淀粉的回收率，所添加的试样为经多次测定，淀粉含量值为 90.3 %的淀粉，实验结果见表 15。实验结果表明，回收率在 90.7%～103.6%之间，方法具有较好的灵敏度、准确度和精密度。

表 15 方法的加标回收率试验结果

试样	本底值（%）	加标比例（%）	测得平均值（%）	回收率（%）	平均回收率（%）
鲟鱼配合饲料	7.2	20	23.3	95.5	96.3
		40	39.6	96.4	
		80	72.4	97.0	
牛精补料	36.3	10	42.5	106.2	98.9
		30	51.5	94.6	
		50	62.0	95.7	
玉米	63.4	10	65.9	97.0	96.3
		20	67.4	91.2	
		30	72.0	100.6	
猪配合饲料	45.5	10	49.0	90.7	96.8
		20	54.8	99.8	
		40	64.0	99.8	
膨化玉米	63.5	10	66.0	95.3	97.8
		20	69.5	101.6	
		30	71.0	96.5	
豌豆	41.5	10	46.7	101.5	101.5
		20	52.2	103.6	
		40	61.4	99.3	
4081 乳猪浓缩饲料(正大康地（澄海）)	7.8	20	24.0	97.6	96.6
		40	38.8	94.4	
		80	72.1	97.9	
渔王通用浓缩饲料（臻肽宝）（新复大）	2.0	20	18.5	93.2	95.7
		40	35.0	93.3	
		80	72.9	100.6	

三、试验验证的分析综述报告

方法完成定向征求意见稿后，三家省级饲料检验机构对起草单位标准进行技术验证。标准验证结果满足要求。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

见表 3。

五、采标情况

本标准修改采用 ISO 15914:2004, Animal feeding stuffs - Enzymatic determination of total starch content。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的制定符合现行法律法规和强制性国家标准的要求。在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集调研了国内外相关标准和文献资料，向国家和省部级饲料检测试验室、主要生产企业技术专家、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的科研院所、高校、检测机构、企业等单位有关专家充分征求意见，并按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善，无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

九、贯彻标准的要求和措施建议

（1）首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本。这是保证新标准贯彻实施的基础。

（2）发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。

（3）实施的过渡期宜定为 6 个月。

十、其他应予说明的事项

本标准发布后，作为推荐性标准执行。

附录

淀粉葡萄糖苷酶酶活测定方法

1.1 淀粉葡萄糖苷酶（Amyloglucosidase，AMG），EC 3.2.1.3

该酶以淀粉为底物，在一定条件下从淀粉的非还原性末端开始，连续地水解末端 1,4 键和 1,6 键连接的α-1,6-葡萄糖糖苷键产生葡萄糖。又称 1,4-α-D-葡聚糖葡萄糖水解酶、葡聚糖 1,4-α-葡糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、糖化酶。

1.2 淀粉葡萄糖苷酶活力

本方法中淀粉葡萄糖苷酶活力定义为：在 25℃，pH4.75 条件下 1 分钟从糖原中释放 1 μmol 葡萄糖的 AMG 的量为一个酶活力单位，以 U/mg（或 U/mL）表示。

1.3 实验原理：以糖原作为底物，一段时间以后（5min）停止反应，检测产生的葡萄糖的量

$$\text{糖原}+(n-1)H_2O \xrightarrow{\text{淀粉葡萄糖苷酶}} nD-\text{葡萄糖}$$

1.4 试剂：

1.4.1 乙酸溶液（2 mol/L）：量取 59 mL 冰乙酸（CH3COOH），用水稀释并定容至 500 mL。

1.4.2 乙酸钠溶液（2 mol/L）：称取无水乙酸钠（CH3COONa）82 g，加水溶解并定容至 500 mL。

1.4.3 乙酸钠缓冲液（2 mol/L，pH4.8）：取乙酸溶液(D1.3.1)41 mL，与乙酸钠溶液(D1.3.2)59 mL 混合，现配现用。。

1.4.4 乙酸钠缓冲液(0.2 mol/L）:2 mol/L pH4.75 乙酸钠缓冲液与水以 1:9 的比例混合，用乙酸或乙酸钠溶液调节 pH 至 4.75，现配现用。

1.4.5 糖原溶液：牡蛎中提取的糖原 80 mg 溶于 10 mL 水中。

1.4.6 0.3 mol/L Tris（羟甲基）氨基甲烷溶液；取 Tris（羟甲基）氨基甲烷（C4H11NO3，分子量：121.1）363 mg 溶于 10 mL 水中。

1.5 步骤：

1.5.1 样品：量取 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液（1.4.4）0.54 mL 和糖原溶液（1.4.5）0.25 mL，置具塞试管中，混合，置于 25℃水浴中预热 5 min，加试样 0.01mL，混合，25℃中精确计时反应 5 min，迅速，准确地加入 0.3 mol/L Tris（羟甲基）氨基甲烷溶液（1.4.6） 0.2 mL，于 100℃水浴 5min，停止反应。测定葡萄糖含量 M_1。。

1.5.2 空白：量取 0.2 mol/L 乙酸缓冲液（1.4.4）0.54 mL 和糖原溶液（1.4.5）0.25 mL ，置具塞试管中，混合，置于 25℃水浴中预热 5 min，随后加入 0.3 mol/L Tris（羟甲基）氨基甲烷溶液（1.4.6） 0.2 mL，混合，加试样 0.01 mL，于 100℃水浴 5 min，停止反应。测定葡萄糖含量 M_0。

1.6 酶活计算：

样品中淀粉葡萄糖苷酶酶活以 X 表示，按式（1）计算：

$$X = \frac{(M_1 - M_0) \times N}{180 \times 5 \times 0.01 \times m} \qquad (1)$$

M_1——样品中葡萄糖的含量，单位为微克（μg）

M_0——样品空白中葡萄糖的含量，单位为微克（μg）

180——葡萄糖的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）

5——反应时间，单位为分钟（min）

0.01——反应的酶液的体系，单位为毫升（mL）

N——酶的稀释倍数

m——试样的质量或体积，单位为毫克（mg）或毫升（mL）

参考文献

[1]Animal feeding stuffs - Enzymatic determination of total starch content, ISO 15914: 2004.

[2]《动物饲料中淀粉含量的测定旋光法》中华人民共和国国家标准 GB/T 20194-2018.

[3]《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》中华人民共和国国家标准 GB/T 1.1-2020.

[4]《标准化工作导则第 2 部分：以 ISO/IEC 标准化文件为基础的标准化文件起草规则》中华人民共和国国家标准 GB/T 1.2-2020.

[5]《标准编制规则第 4 部分：试验方法标准》中华人民共和国国家标准 GB/T 20001.4-2015.

[6]《食品中葡萄糖的测定酶-比色法和酶-电极法》中华人民共和国国家标准 GB/T 16285-2008.

[7] 李兵, 肖香兰, 杨永红,等. 国内外淀粉含量的检测标准现状及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9):10.

[8] BRUNT K., SANDERS P. and ROZEMA T. The enzymatic determination of starch in food, feed and raw materials of the starch industry. Starch/Stärke, 50, 1998, pp.413-419

[10] Liu K , Liu Q . Enzymatic determination of total starch and degree of starch gelatinization in various products[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103:105639.

[11] H.比斯瓦根. 《酶学实验手册》（第二版）. 化学工业出版社，2018.

[12]王迎迎, 孙晓红, 侯世松,等. 含糖肉制品中淀粉含量测定方法探讨[J]. 食品安全导刊, 2019(18):2.

[13]Rose R , Rose C L , Omi S K , et al. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1991, 39(1):2-11.