

团体标准

《淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分梯型溶解温度等温扩增检测方法》

标准编制说明

标准起草工作组

2024 年 09 月

一、制定标准的意义

民以食为天，食以安为先，随着人们生活水平的日渐提高，消费者对食品的质量安全问题越来越关注。淀粉是现代食品工业中一种重要的生产原料，也可作为一种重要的工业原料用于胶黏、填充等途径中。目前常见的淀粉种类有马铃薯淀粉、红薯淀粉、木薯淀粉、玉米淀粉、麦类淀粉等。其超微形态、糊化温度等理化性质存在一定的差异，原材料成本及加工工艺的不同也造成了价格大有差别。

随着淀粉加工、深加工产品的丰富，淀粉伪造或掺假问题日益突出。目前市场上发现的掺假淀粉总体分为两类，第一类是在淀粉及淀粉制品中掺入滑石粉、白陶土、非食用色素等杂质以次充好；第二类是掺入价格较低廉的植物淀粉投机销售，如在马铃薯淀粉中掺入玉米、苕蓿、荞麦等；标签显示为红薯粉丝和山药粉丝的制品存在着玉米、木薯掺假现象。虽然第二类的掺假现象等不会对人体健康造成严重影响，但理化性质的差异会影响食品的成色、品质，并且冒充高价格的淀粉销往市场谋取非法利润，严重扰乱市场秩序，对合法生产者和消费者来说都是一种损害。

因此，加强对淀粉及其制品的鉴别检验极为重要，准确判定淀粉掺假，确保食品标签制度的有效实施，需要灵敏、可靠的检测方法鉴定植物源食品的物种来源。淀粉的检测主要由感官指标、理化指标和卫生指标 3 项综合指标组成。感官检测方法简单但检测结果仅能作为辅助参考。理化检测耗时费力，并且对于第 2 类掺假问题难以准确鉴别。

针对玉米、木薯掺假现象，目前还尚未建立国家标准，缺少该方面的监管。我国现有的玉米、木薯淀粉国家标准与食品安全的要求存在较大的差距，目前玉米淀粉的 GB 1353-2018《玉米》、GB/T 10463-2008《玉米粉》、GB/T 8885-2017《食用玉米淀粉》和 GB/T 25219-2010《粮油检验 玉米淀粉含量测定 近红外法》；木薯淀粉的 GB2713-2015《淀粉制品》和国家标准 GBT29343-2012bz《木薯淀粉》中无食用淀粉及其制品中掺杂玉米、木薯淀粉质量监控的规定，对玉米、木薯淀粉掺杂要求模糊，无法检测。企业标准也参差不齐，没有统一的规范性文件，这都制约了淀粉产业的健康、稳定、快速发展，上述问题的存在已不能满足

河南省内红薯粉条、山药片、藕粉等的生产、流通和市场管理的要求，阻碍食用淀粉产业的进一步发展。

标准化是为了建立最佳秩序、促进共同效益而开展的制定并应用标准的活动。为了保证标准化活动有序开展，促进标准化目标和效益的实现，就需要建立完善的技术规则，起草高质量的标准化文件。通过确定文件的规范性要素，编制标准化文件，从而对各类标准化对象进行标准化。一个完善的标准能够起到规范整个行业生产行为，提升行业产品质量，发挥促进技术提升的重要作用。团体标准作为国标、行标、地标的有效补充，以坚持市场主导和服务行业为原则，为促进行业的持续高效发展发挥着积极和引导作用。

因此，建立完善的淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分检测标准，对进一步规范生产企业工艺、提升产品质量、维护人民群众的食品安全，完善标准体系，推动河南特色农业产品发展具有重要的意义。

二、任务来源及编制原则和依据

（一）任务来源

随着淀粉加工、深加工产品的丰富，淀粉伪造或掺假问题日益突出。目前市场上发现的掺假淀粉总体分为两类，第一类是在淀粉及淀粉制品中掺入滑石粉、白陶土、非食用色素等杂质以次充好；第二类是掺入价格较低廉的植物淀粉投机销售，如在马铃薯淀粉中掺入玉米、苕蓿、荞麦等；标签显示为红薯粉丝和山药粉丝的制品存在着玉米、木薯掺假现象。虽然第二类的掺假现象等不会对人体健康造成严重影响，但理化性质的差异会影响食品的成色、品质，并且冒充高价格的淀粉销往市场谋取非法利润，严重扰乱市场秩序，对合法生产者和消费者来说都是一种损害。因此，加强对淀粉及其制品的鉴别检验极为重要，准确判定淀粉掺假，确保食品标签制度的有效实施，需要灵敏、可靠的检测方法鉴定植物源食品的物种来源。

根据食用淀粉及其制品市场的需求，有必要制定食用淀粉及其制品有关玉米、木薯成分鉴定的团体标准，为食用淀粉及其制品提供标准保护和标准依据。为此，许昌市胖东来超市有限公司及相关生产企业、高校和政府机构于2024年9月3日向河南省食品科学技术学会提出立项《淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分

梯型溶解温度等温扩增检测方法》团体标准项目建议书，根据《河南省食品科学技术学会团体标准管理办法》《河南省食品科学技术学会团体标准制定程序》的规定，同意许昌市胖东来超市有限公司就淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分的检测向河南省食品科学技术学会提出申请，由河南省食品科学技术学会负责《淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分梯型溶解温度等温扩增检测方法》团体标准的审定工作。

（二）编制原则和依据

1. 编制原则

本标准的制定主要遵循以下原则：一是科学实用原则。在尊重科学、紧密结合实践、广泛征求意见及调查研究的基础上，紧贴食用淀粉及其制品中玉米、木薯成分的鉴定的快速检测方法，具有可操作性和实用性。二是协调性原则。以质量和安全为核心，符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。三是因地制宜原则。标准的制定坚持从我省食品行业的实际出发，充分考虑相关食品企业的现状和技术条件，确保食用淀粉及其制品中的真实性和技术条件的可行性。

2. 编制依据

本标准的制定参考了 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》及其他国家相关法律、法规，严格按照 GB-T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分 标准化文件的结构和起草规则》的要求组织实施编写，规定了范围、规范性引用文件、术语和定义、方法提要、原理、试剂或材料、仪器设备、检测步骤、结果判定、检测过程中防止交叉污染的措施等。本标准依据相关最新的标准和法规进行编写，以适应食品企业健康发展的需要。

三、编制过程

（一）编制大纲和标准文本初稿

时间：2024年07月8日-2024年9月2日

根据河南省食品科学技术学会提出的团体标准规定要求，报请河南省食品科学技术学会同意立项，确定了总体工作方案，成立了项目起草小组。期间以许昌市胖东来超市有限公司，许昌学院、、、、等十余家企业、高校和政府机构共同收集和查阅相关技术标准和文献资料，采集样品进行检测，并经多次讨论，试验验证，形成了团体标准及编制说明初稿。

四、主要技术内容的说明

1 范围

本文件规定了淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分的梯型熔解温度等温扩增检测方法。

本文件适用于淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分的定性检测。

本文件所规定方法的检出限（LOD）为1 %（质量比）。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 12104 淀粉术语

GB/T 27403-2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

GB/T 12104 界定的术语和定义适用于本文件。

4 方法提要

提取样品DNA，用已知含玉米、木薯成分的样品DNA作阳性对照，用已知不含玉米、木薯成分的样品DNA作阴性对照，灭菌双蒸水作为空白对照，使用特异性引物和探针，采用梯型熔解温度等温扩增技术，根据荧光信号和扩增现象，判定是否存在玉米、木薯源性成分。

5 原理

选择 T_m 值曲线为梯型（包括人字梯型、半人字梯型和直梯型）的特异性核酸片段为靶序列设计巢式引物，将巢式引物的外引物与内引物分别连接成一对引物作为等温扩增用引物，借助外引物与核酸靶序列上对应片段的熔解温度差异提供单链模板，在DNA聚合酶（大片

段）催化下通过合成反应与链替代反应对梯型Tm值曲线的靶标核酸片段进行等温扩增，进行不同淀粉成分的定性分析。

6 试剂或材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合GB/T 6682中一级水的规格。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

- 6.1 植物基因组DNA提取试剂盒。
- 6.2 梯型熔解温度等温扩增检测LMTIA试剂盒。Proofman探针法
- 6.3 梯型熔解温度等温扩增检测LMTIA的引物和探针。玉米、木薯引物和探针详见表1。玉米和木薯引物扩增的靶标序列参见附录A。
- 6.4 梯型熔解温度等温扩增检测反应混合液（5 μL（2X）通用型LMTIA预混液，0.4 μL（100 U/μL）（U，Unit，酶学单位）Bst酶）。

表1 玉米、木薯成分鉴定用引物和探针序列

名称	序列(5'→3')	靶基因
玉米	正向引物F: ACCTGGGGTCGCGGTTTTTATTCGGCCCTAAGGACCCAT	ITS
	反向引物B: CCCCAGGTCAGTCGGGTTTATATGCTTAAACTCAGCGGG	
	环引物LF: GGCAAGCTCGGTCGCT	
	探针: BHQ1-GGCAAGCTCGGTCGCC-FAM	
木薯	正向引物F: GCCCACGGCCGTTTTCACGGCTATCGGTGGTTG	ITS
	反向引物B: CGGCCGTGGGCTTTTCCCGTTCGGCAGACGTTC	
	环引物LF: TGTCCGAGGGTCTTC	
	探针: BHQ1-TGTCCGAGGGTCTTT-ROX	

7 仪器设备

- 7.1 等温荧光扩增仪。
- 7.2 恒温水浴锅。
- 7.3 离心机：离心力≥12 000 g。

- 7.4 微量移液器：0.5 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 200 μL~1 000 μL。
- 7.5 恒温混匀仪。
- 7.6 涡旋震荡器。
- 7.7 pH计，精度为0.01。
- 7.8 天平：感量0.01 g。
- 7.9 微量紫外-可见分光光度计。

8 检测步骤

8.1 DNA提取

采用市售的植物基因组DNA提取试剂盒提取。

将样品研磨至粉末（淀粉样品直接称取），取100 mg~200 mg于2 mL 离心管中，详见试剂盒说明书进行后续DNA的提取。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于50 μL，体积过小影响回收效率。洗脱液的pH值对于洗脱效率有很大影响。若用双蒸水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5范围内，pH值低于7.0会降低洗脱效率；且DNA产物应保存在-20℃，以防DNA降解。

8.2 DNA浓度与纯度的检测

使用核酸蛋白仪或微量紫外-可见分光光度计检测提取DNA的浓度与纯度。分别检测260 nm和280 nm处的吸光值，每个样品重复测三次，取平均值。当A260/A280比值在1.6~2.0时，可用于LMTIA扩增。

8.3 梯型熔解温度等温扩增

8.3.1 梯型熔解温度等温扩增反应体系

梯型熔解温度等温扩增反应体系见表2。PCR八联管中按表1依次加入反应试剂，混匀。放入等温荧光扩增仪。

表2 梯型熔解温度等温扩增反应体系（10 μL）

试剂	体积（μL）
梯型熔解温度等温扩增反应混合液	5.4
正向引物 F（100 μmol/L）	0.16

反向引物 B（100 μmol/L）	0.16
环引物 LF（100 μmol/L）	0.04
探针（10 μmol/L）	0.1
灭菌双蒸水	2.14
DNA 模板	2.0

8.3.2 梯型熔解温度等温扩增反应程序

按照表2配制玉米、木薯基因的反应体系。反应程序为：等温荧光扩增仪，玉米和木薯的检测温度分别设置为61 ℃和62 ℃，设置40个循环，每个循环30s。在样品等温扩增的同时，检测过程中应分别设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

用已知含玉米、木薯成分的样品DNA作阳性对照，用已知不含玉米、木薯成分的样品DNA作阴性对照，和空白对照（灭菌双蒸水），实验重复三次。

9 结果判定

若有 FAM 荧光检出，等温荧光扩增仪中出现 S 型或 S 型趋势的曲线，则判定样品含有玉米源性成分，表述为“检出玉米成分”；S 曲线参考附录 B；

若有 ROX 荧光检出，等温荧光扩增仪中出现 S 型或 S 型趋势的曲线，则判定样品含有木薯源性成分，表述为“检出木薯成分”；S 曲线参考附录 B；

如无 FAM 荧光检出，无 S 典型扩增曲线，则判定为不含玉米源性成分，表述为“未检出玉米成分”；

如无 ROX 荧光检出，无 S 典型扩增曲线，则判定为不含木薯源性成分，表述为“未检出木薯成分”；

在样品梯型熔解温度等温扩增的同时，应设置梯型熔解温度等温扩增阴性对照、梯型熔解温度等温扩增阳性对照和梯型熔解温度等温扩增空白对照，实验重复三次。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施应按照 GB/T 27403-2008 中附录 D 的规定执行。

五、标准与其他标准的对比分析及采用情况

目前国内还没有食用淀粉以及制品中植物源成分鉴别方法的国家标准。国内

标准有关玉米淀粉和木薯淀粉的包括由国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会颁发的玉米淀粉的 GB 1353-2018《玉米》、GB/T 10463-2008《玉米粉》、GB/T 8885-2017《食用玉米淀粉》和 GB/T 25219-2010《粮油检验 玉米淀粉含量测定 近红外法》,以及木薯淀粉 GB 2713-2015《淀粉制品》和国家标准 GB/T 29343-2012bz《木薯淀粉》,均未涉及淀粉以及制品中玉米、木薯源性成分的快速准确鉴定。国家标准 GB/T 23815-2009《猪肉制品中植物成分定性 PCR 检测方法》,选择植物叶绿体基因作为通用植物源性成分的鉴定基因,没有特异性的靶向玉米、木薯源性成分的检测基因序列。

国家市场监督管理总局发布的 BJS 202304《果汁中植物源性成分的测定》,采用植物源性成分鉴定的实时荧光 PCR 和 DNA 条形码定性检测方法,但均未特异性的靶向玉米、木薯源性成分的检测基因序列。

国家食品药品监督管理总局发布的 BJS 201707《植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定》,采用植物源性成分鉴定的实时荧光 PCR 检测方法,但均未特异性的靶向玉米、木薯源性成分的检测基因序列。

国家质量监督检验检疫总局发布的进出口行业标准 SN/T 3767-2014《出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法》,仅适用于进出口的玉米及初加工产品中转基因玉米品系特异性的定性检测,不能适用于常见淀粉及淀粉制品种玉米源性成分的检测。

海关总署发布的进出口行业标准 SN/T 5522《食用淀粉植物源成分鉴别方法 实时荧光 PCR 法》的第 2 部分:木薯淀粉 SNT5522.2-2023 和第 7 部分:玉米淀粉 SN/T 5522.7-2023。与本标准类似,但是本标准在靶标序列的选择、引物设计和探针的使用与其不同,具体操作更加简单、快捷、特异和精确。

国外标准中有关玉米、木薯淀粉的检测标准包括 CAC 谷物和豆类法典委员会(CCCPL)颁布的 CXS 153-1985 玉米标准(谷物)(2019 版)和 CXS 154-1985 全玉米粉标准(2019 版)、CXS 176-1989 食用木薯粉标准(2019 版)和 CXS151-1989 木薯标准(2019 版)。均未涉及玉米、木薯成分的快速准确鉴定。

本标准编写参考了上述标准的部分内容,并进行了补充后完成。

六、标准中涉及到任何专利情况

无

七、预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议

本标准的制定，将会进一步规范市场，维护食品行业、消费者的利益，保证淀粉制品的质量安全，为监管部门提供参考依据，同时也能提高食用淀粉及其制品抽检合格率，保障广大消费者的身体健康。

本标准经批准、发布实施后，拟请标准牵头管理部门进行宣贯，参与本标准的企业应按照要求实施，食品经营服务企业应按照本标准进行淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分的鉴定。政府监管部门参照该标准对食用淀粉及其制品中玉米、木薯源性成分的检测等操作过程进行监管。

八、其他应说明的事项

无