

赵 静,陶宁萍,卢 瑛,等. 河豚毒素的快速检测技术[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):234-237.

河豚毒素的快速检测技术

赵 静¹,陶宁萍¹,卢 瑛¹,丛 健^{1,2}

(1. 上海海洋大学食品学院,上海 201306; 2. 上海市食品研究所,上海 200235)

摘要:为建立快速、简便、适用于河豚毒素免疫分析检测技术的前处理方法,通过采用不同体积分数的三氯乙酸对河豚鱼样品进行前处理,采用市售的酶联免疫(ELISA)试剂盒及由笔者所在实验室制备的以磁性纳米探针为标记物的免疫层析(LFIA)试纸条的检测结果作为前处理方法优劣的判断依据。试验结果表明,经 2% 乙酸对样品进行 2 次加热提取后,采用体积分数为 10% 的三氯乙酸对样品中的蛋白进行沉淀,待测样品适用于 ELISA 试剂盒及 LFIA 试纸条检测。

关键词:三氯乙酸;河豚毒素;酶联免疫;免疫层析;检测技术

中图分类号: TS254.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0234-04

河豚毒素(tetrodotoxide, TTX)是一种毒性强、分子量低的非蛋白类神经毒素,为典型的 Na^+ 通道抑制剂,分子结构为氨基全氢唑啉化合物,分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$,相对分子量为 319,该分子中含有原酸酯结构,几乎所有的碳原子均具不对称取代。它微溶于水 and 浓酸,极易溶于醋酸溶液,不溶于有机溶剂,纯品为无色无臭针状固体结晶,易被碱还原。TTX 非常稳定,在日光下曝晒 20 d 或在盐水中腌 30 d 后,其毒性仍不能被全部破坏,只有在高温下加热 30 min 以上或在碱性条件下才能被分解^[1]。河豚因其肉质鲜美、营养丰富,深受人们的喜爱,但河豚体内所含有的河豚毒素化学性质稳定,一般烹调手段难以破坏,导致因食用河豚而中毒的事件屡有发生,又因中毒后缺乏有效的解救措施,使得“拼死吃河豚”成为了现实,严重威胁人们的生命安全。随着食品安全问题逐渐被人们关注,快速、高效的河豚毒素检测方法也得以发展^[2]。近年来,河豚毒素的免疫分析检测技术(immunoassay, IA)^[3]因其灵敏度高和操作简便等受到科研人员的青睐,例如,酶联免疫(ELISA)试剂盒法、基于磁性纳米探针免疫层析检测技术^[4-5]等。虽然这些检测技术具有快速、简便等优点,但是对样品前处理要求较高,样品前处理的效果直接影响检测结果的准确性,可以说是整个检测过程中的关键。目前常用的前处理方法存在着一些问题:首先,河豚毒素极易与杂蛋白吸附,同时样品中的杂蛋白、脂肪在检测时会干扰河豚毒素与抗体的结合,可能还会与参与免疫检测的抗原或抗体发生非特异性结合,从而影响试验结果的准确性。因此,在前处理过程中,如何去除样本中的杂蛋白、脂肪等杂质值得深入研究。其次,常规前处理方法如国标高效液相色谱的前处理方法虽能很好地去杂质,但是其过程相对较繁琐且费时费力。IA 检

测河豚毒素的最大优势在于检测时间短,具备潜在的快速检测、现场检测的特点;但当与之相配套的前处理过程步骤相对繁琐、耗时长时,整个检测的快捷性就无法显现出来,更无法实现现场快速检测。因此,本研究对常规的 IA 前处理方法进行了全面调整,提高了去除杂蛋白、脂肪的能力,简化了前处理步骤,节省了前处理时间,提高了 IA 的效率和准确性,提升了方法的稳定性并提出了适用于河豚肌肉的前处理方法,结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

纯度为 95.0% 的 TTX 标准品,购自河北省水产研究所;乙酸、三氯乙酸(TCA)、氢氧化钠等试剂均为分析纯,购自国药集团;ELISA 试剂盒购自北京中卫食品卫生科技有限公司;卡槽(MICT test cassette)、磁性纳米微球(200 nm magnetic particles),购自 Quantum 量子科学仪器贸易有限公司;试验样本为由上海市水产研究所提供的人工养殖暗纹东方鲀(雌、雄)及菊黄东方鲀(雌、雄)。

1.2 试验仪器与设备

TDL-50B 台式离心机购自 Anke 公司;Biotek Synergy 2 多功能酶标仪购自芯起点基因科技(北京)有限公司;MAR 磁信号分析系统购自美国 Magna Bio Sciences 公司。

1.3 样品前处理方法

1.3.1 ELISA 试剂盒前处理方法 ELISA 试剂盒采用固相酶联免疫吸附原理,利用间接竞争 ELISA 法进行测定。将待测河豚组织用剪刀剪碎后磨成糜状,加入 5 倍体积 0.1% 乙酸溶液(即 5 g 组织中加入 0.1% 乙酸溶液 25 mL,下同),于离心管中水浴煮沸 10 min;上清用快速定性滤纸过滤于 50 mL 离心管中,沉淀部分再加入 0.1% 乙酸溶液 20 mL,水浴煮沸 3 min,冷却至室温后,所有的液体及煮沸的样品都加到离心管中,3 000 r/min 离心 10 min;取上清,量体积,置分液漏斗中,加入等体积乙醚,振摇 1 min,静置分层;打开分液漏斗活塞,收集下层液体,量体积后置另一分液漏斗中,再加入等体积的乙醚,振摇 1 min,静置分层;将水层放入 50 mL 容量瓶中,用 1 mol/L 氢氧化钠调节提取液的 pH 值至 6.5 ~

收稿日期:2013-09-30

基金项目:上海市科学技术委员会工程中心建设项目(编号:11DZ2280300);上海市科技兴农重点攻关[编号:沪农科攻字(2010)第2-6号]。

作者简介:赵 静(1988—),女,硕士研究生,研究方向为水产品毒素检测。E-mail: janessazhao@gmail.com。

通信作者:丛 建。Tel: (021)61900381; E-mail: jcong@shou.edu.cn。

7.4, 然后加入 PBS 至 50 mL, 提取液 4 ℃ 保存备用。

1.3.2 TCA 样品前处理条件以及优化 称取 1.0 g 河豚组织样本, 剪碎, 加入 5 倍体积 2% 乙酸溶液, 水浴煮沸 10 min, 冷却到室温后取上清; 将沉淀溶于 3 mL 2% 乙酸溶液, 水浴煮沸 3 min; 冷却到室温后取上清, 与第 1 次离心取得的上清液合并, 上清液中加入 TCA 溶液, 混匀, 于 3 000 r/min 下离心 10 min, 取上清, 调节上清液 pH 值至 6.5 ~ 7.4, 用蒸馏水定容至 10 mL。本试验根据 2 次煮沸后得到的上清液体积, 按比例加入不同体积 100% TCA, 通过调整样品溶液中 TCA 体积分数, 优化得到最佳的河豚肌肉样本前处理 TCA 体积分数。

1.4 样本中河豚毒素含量的测定

1.4.1 ELISA 试剂盒检测方法 先将标准品或样品加入酶标板 50 μL/孔, 再将抗河豚毒素单克隆抗体溶液加入酶标板 50 μL/孔, 37 ℃ 孵育 90 min, 加入洗涤液洗板振荡 3 min, 甩掉孔内液体, 拍干, 重复 3 次; 加入酶标物 100 μL/孔, 37 ℃ 孵育 60 min, 加入洗涤液洗板振荡 3 min, 甩掉孔内液体, 拍干, 重复 3 次; 加入显色液 100 μL/孔, 37 ℃ 孵育 12 min, 最后于各孔中加入 2 mol/L 硫酸 100 μL/孔终止反应, 立即用酶标仪在波长为 450 nm 处测定吸光度 *D*。以标准溶液的 *D* 与阴性标准品的 *D* 的比值为纵坐标, 所对应标准溶液浓度 (ng/mL) 的对数值为横坐标, 制作标准曲线。根据样品 *D* 与阴性标准品的 *D* 的比值从曲线上得到对应点的横坐标, 即为 TTX 浓度的对数值, 求得反对数即为测定液中 TTX 质量浓度 *C* (ng/mL)。

1.4.2 免疫层析检测方法 将磁性纳米微球与 TTX 单克隆抗体 (笔者所在实验室制备)^[6] 用化学试剂偶联作为磁性纳米探针; TTX-BSA 蛋白复合物固定在聚酯纤维膜上, 作为捕获抗体的检测线 T 线; 山羊抗小鼠 Ig(G) 固定在膜上, 作为 C 线。配制试纸条体系: 取 10% Tween-20/BS 溶液、2 g/mL BSA-BS 溶液及 0.35 g/mL 蔗糖-BS 溶液, 三者混合体积比为 5:1:1。检测时, 精确吸取配制好的体系混合液 15 μL、待测样品 105 μL 以及 5H10 抗体偶联的磁珠 6 μL, 混匀。将混合好的样本匀速缓慢加在试纸条样品垫处, 待层析完成后 (约 30 min), 将试纸条装入卡槽, 采用磁信号仪检测磁性号值^[7]。以河豚毒素标准溶液的磁性号值与阴性标准溶液的磁信号值的比值为纵坐标, 所对应的河豚毒素标准溶液浓度 (ng/mL) 的对数值为横坐标, 建立标准曲线。

2 结果与分析

2.1 TCA 样品前处理条件的优化

TCA 是常用的蛋白变性剂, 一般用于蛋白的浓缩、提取, 而应用在样品前处理过程中则具有除蛋白率高的优点^[8-9]。本试验样本分别采用 ELISA 试剂盒前处理方法及不同浓度的 TCA 对样本进行前处理, 处理后的待测样本采用 ELISA 试剂盒进行检测, 结果见表 1。

由表 1 可知, 当样品中的 TCA 体积分数为 10%、15% 时, 检测得到的 TTX 浓度与 ELISA 检测得到的参考定量值最接近; 当 TCA 添加的体积分数高于 15% 时, ELISA 试剂盒检测结果明显高于真实值, 出现假阳性的情况; 当 TCA 添加的体积分数过低时, 就不能很好地去除样品中的蛋白, 也会影响试验结果的准确性^[10]。因此, 用这 2 个浓度对试验可行性进行

表 1 不同 TCA 体积分数对检测结果的影响

TCA 体积分数 (%)	TTX 质量浓度 (ng/mL)
1	0.18
5	0.40
8	0.25
10	1.71
15	2.42
20	87.25

注: ELISA 试剂盒前处理法中的 TTX 质量浓度为 4.6 ng/mL。TCA 含量为去 2 次上清液后, 计算上清液体积, 按比例加入 100% TCA 后 TCA 在样品中的体积分数; TTX 质量浓度由 ELISA 试剂盒测得。

进一步确证。

对样品添加不同浓度的 TTX 标准品, 并采用体积分数为 10%、15% 的 TCA 进行样品前处理, 待测样品采用 ELISA 试剂盒进行检测, 结果如表 2 所示。

表 2 不同加标质量浓度对试验结果的影响

TCA 体积分数 (%)	TTX 加标质量浓度 (ng/mL)	吸光度			TTX 实测质量浓度 (ng/mL)
		平均值	标准差	CV (%)	
10	0	0.903	0.048	5.286	17.59
	2	0.953	0.045	4.706	14.37
	10	0.930	0.039	4.213	15.78
	20	0.842	0.016	1.887	22.48
	100	0.409	0.011	2.778	127.84
	200	0.362	0.007	1.811	154.64
	2 000	0.072	0.004	5.639	496.94
15	0	0.800	0.031	3.851	26.58
	2	0.761	0.016	2.086	31.09
	10	0.817	0.008	0.935	24.85
	20	0.809	0.055	6.758	25.63
	100	0.367	0.008	2.287	151.77
	200	0.193	0.008	3.882	304.68
	2 000	0.070	0.006	7.831	499.61

注: 采用 ELISA 试剂盒测得豚样本中 TTX 质量浓度为 7.4 ng/mL; TTX 加标量由样品中的 TTX 加标质量终浓度计算所得。

由表 2 可知, 当样品前处理采用的 TCA 体积分数为 15% 时, 检测所得结果远远高于 TTX 加标质量浓度, 这可能是由样品中的 TCA 分子干扰了抗原抗体的特异性结合^[11] 而造成的; 而 TCA 添加的体积分数为 10% 时, 检测结果较接近实际 TTX 加标质量浓度。在加标质量浓度达到 2 000 ng/mL 以及加标质量浓度不及 10 ng/mL 时, 检测结果与加标质量浓度差距较大, 这可能是由于本研究所使用的河豚毒素 ELISA 试剂盒的检测范围为 10 ~ 200 ng/mL, 而加标浓度超过了检测范围, 导致检测结果不准确。

综上所述, 笔者认为采用 10% TCA 对河豚样本进行蛋白沉淀后的样本较适用于 ELISA 试剂盒的检测, 并采用这一浓度进一步进行重复性及回收率试验。

2.2 样品前处理重现性及回收率试验

在河豚肌肉中添加不同质量浓度的 TTX 标准品, 每个样品平行 3 次 (加标质量浓度分别为 10、100 ng/mL, 每个浓度分别称取 3 份肌肉样品), 采用 TCA 对样品进行前处理 (选取的 TCA 体积分数为 10%)。采用 ELISA 试剂盒测定样品中的 TTX 含量, 结果如表 3 所示。

表 3 方法重现性及回收率试验结果

TTX 加标质量浓度 (ng/mL)	重复	TTX 实测质量浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
10	I	15.607	82
	II	17.191	97
	III	16.118	87
	平均	16.305	89
	标准差	0.81	
RSD		4.96%	
100	I	74.379	66
	II	72.526	65
	III	65.563	58
	平均	70.823	63
	标准差	4.65	
RSD		6.56%	

注:回收率 = (TTX 加标实测质量浓度 - 未加标样本质量浓度)/加标质量浓度 × 100%。

由表 3 可知,TTX 质量浓度检测结果 *RSD* 均小于 10%,表明方法重现性良好。加标质量浓度为 100 ng/mL 时,回收率只有 63%,这可能是由以下 3 个原因造成的:(1)河豚毒素极易与杂蛋白吸附^[12-13],因此在沉淀蛋白的同时,也会将吸附在蛋白上的河豚毒素一并去除,造成回收率低的问题;(2)TTX 加标质量浓度为 100 ng/mL 中的一个样品质量浓度检测值异常,从而降低了此方法的回收率,有待完善;(3)采用 ELISA 试剂盒对加标的 TTX 标准品进行检测后发现,标准品

纯度与标注不符,纯度约为 55%,这可能是由保存不当或保存时间过久造成的。

此外,经过对表 2、表 3 的分析发现,在加标质量浓度为 0、2 ng/mL 时,检测得到的河豚毒素定量结果远高于参考值,与此同时,在加标质量浓度为 10 ng/mL 时,检测所得到的回收率也出现了稍偏高的现象,这可能是由于经 TCA 进行蛋白沉淀后的待测样品中还有少量小分子物质,对免疫检测技术抗体抗原的特异性结合产生了干扰,导致假阳性的产生^[14]。

2.3 TCA 前处理法在免疫层析试纸条检测中的应用
为了更好地证明 TCA 前处理法在免疫检测技术前处理方法中的适用性,本研究采用笔者所在实验室制备的以磁性纳米探针为标记物的免疫层析试纸条对经 TCA 前处理的样品进行检测,为此前处理方法的可靠性进行进一步验证,检测定量结果与 ELISA 试剂盒检测得到的结果进行对比,结果如表 4 所示。

由表 4 可知,经 TCA 进行前处理后的样本应用于基于磁性纳米探针的免疫层析技术检测定量结果与 ELISA 试剂盒检测定量结果相近。该试验结果可以通过肉眼观察便能进行毒性判断,是一种适用于进行初筛的现场快速检测方法^[15]。

2.4 前处理方法的比较
免疫学检测技术的检测结果受前处理及前处理后样品所在体系的影响。将本研究所涉及到的 2 种前处理方法从不同方面进行了讨论,结果如表 5 所示。

表 4 试纸条法与 ELISA 试剂盒法对河豚鱼不同组织部位检测结果的对比情况

样品	ELISA 试剂盒法				试纸条法			
	<i>D</i>	<i>CV</i> (%)	TTX 质量浓度 (ng/mL)	毒性判定	T 线磁信号值	<i>CV</i> (%)	TTX 质量浓度 (ng/mL)	毒性判定
样品 1	1.679 ± 0.067	4.0	4.50	ND	2446.5 ± 105.7	4.3	6.51	ND
样品 2	1.720 ± 0.069	4.0	4.00	ND	2823.4 ± 106.8	3.8	2.26	ND
样品 3	1.398 ± 0.037	2.6	10.00	ND	2212.5 ± 167.0	7.5	12.54	ND

表 5 2 种前处理方法的比较结果

前处理方法	所需试剂	主要试验步骤	大约所需时间 (min)
TCA 蛋白沉淀法	2% 乙 酸、100% TCA、 2 mol/L 氢氧化钠	2 次加热后,采用乙酸提取 TTX;加入 TCA 进行蛋白沉淀,于 3 000 r/min 下离心 10min;调整 pH 值,定容,待测。	25
ELISA 试剂盒前 处理方法	0.1% 乙 酸、无水乙 醚、 1 mol/L 氢氧化钠	第 1 次加热后,采用乙酸提取 TTX,采用滤纸过滤得到清液;第 2 次加热后提取 TTX,于 3 000 r/min 下离心 10 min;收集上清后,经无水乙醚脱脂 2 次,调整 pH 值,定容,待测。	50

由表 5 可知,ELISA 试剂盒前处理法要采用过滤、脱脂等步骤,使得试验过程更加繁琐,所需时间也更长,且须使用大量无水乙醚,存在不利于试验人员身体健康以及对环境有害等问题,同时该方法所需样本量较大。而 TCA 前处理法具有方法简单、耗时短等优点,且可作为 ELISA 试剂盒及免疫层析试纸条的前处理方法。但从加标样品的检测结果可知,该前处理方法存在加标回收率不够理想的问题,还须进一步完善。

采用 TCA 进行蛋白沉淀的前处理方法虽然具有快速、简便的优势,但笔者认为该方法还具有优化的空间。首先,虽然煮沸和离心会除去一部分脂肪,但样品中残余的少量脂肪依

然可能会影响到试验的准确性。其次,一般在加热沉淀蛋白质和不加热加入蛋白沉淀试剂中根据样品需要选择其中的一种。本研究在样品 2 次加热变性的基础上,在上清液中再一次加入 TCA 进行蛋白变性,虽能较好地去除蛋白,但这一步骤会增加试验的繁琐程度,加大样品的提取损失,这可能也是回收率不理想的原因。因此,笔者认为需要进一步改进优化。

3 结论

河豚这一道人间美味要端上餐桌,必须在人们生命安全得到保障的基础上才能实现,如何采用科学的手段保障食品安全,不破坏河豚可食用的组织部位以及如何快速鉴定河豚

毒素都是人们所急需解决的问题。

免疫检测技术适用于河豚毒素现场快速检测,具有方便、快捷、所需样本量小,可用肉眼现场进行毒性辨别、快速定性、可进行大批量样本检测等优点。而理想的检测方法必须有高效前处理方法与之配套,本研究所讨论的 TCA 常被人们用于电泳过程中对蛋白质样品的浓缩或除盐,鲜有用于进行样品前处理除蛋白的报道,但作为常用的蛋白变性剂,我们有理由相信这也是一种适用于快速前处理方法的除蛋白的有效方法。TCA 前处理法大大缩短了所需时间,具有简便、试剂用量少、样本所需量少、节能等诸多优点,且满足快速检测前处理的要求。经该法前处理后的样本应用于河豚毒素酶联免疫试剂盒及免疫层析试纸条,所得结果较理想,但仍有进一步完善的空间。

参考文献:

- [1] 吴韶菊,崔建洲,宫庆礼. 河豚毒素的微生物起源[J]. 海洋科学,2005,29(10):81-85.
- [2] 丛 蕾,王锡昌,刘 源,等. 河豚毒素免疫检测技术研究进展[J]. 食品科学,2009,30(19):327-330.
- [3] 李德昆. 河豚毒素的快速检测方法研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [4] Xu Q F, Xu H, Gu H C, et al. Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I [J]. Materials Science and Engineering C, 2009, 29(3):702-707.
- [5] Wang Y, Xu H, Wei M, et al. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay[J]. Mate-

rials Science and Engineering C, 2009, 29(3):714-718.

- [6] 丛 蕾. 河豚毒素特异性单克隆抗体的制备[D]. 上海:上海海洋大学,2011.
- [7] Zheng C, Wang X C, Lu Y, et al. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle - based lateral flow immunoassay[J]. Food Control, 2012, 26(2):446-452.
- [8] 段伟伟, 张兴夫, 敖长金. 沙葱多糖除蛋白方法的研究[J]. 饲料工业, 2011, 32(13):26-28.
- [9] 谢丽源, 彭卫红, 甘炳成. 桑黄多糖脱蛋白方法与条件的优化[J]. 农业科学与技术:英文版, 2011, 12(9):1249-1251.
- [10] 龚思恩. 探讨标本溶血对酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎表面抗原的影响[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(14):1821-1822.
- [11] Tanita T, Miyakoshi H, Nakano Y. Performance of ELISA for specific measurement of high - molecular - weight (HMW) adiponectin[J]. Journal of Immunological Methods, 2008, 333(1/2):139-146.
- [12] 王春仁. 生物材料表面血浆蛋白的吸附[J]. 国外医学:生物医学工程分册, 1995(6):334-339.
- [13] 马春风. 抗蛋白吸附聚合物的合成与性质[D]. 合肥:中国科学技术大学, 2011.
- [14] Kranthi K R, Davis M, Mayee C D, et al. Development of a colloidal - gold based lateral - flow immunoassay kit for 'quality - control' assessment of pyrethroid and endosulfan formulations in a novel single strip format [J]. Crop Protection, 2009, 28(5):428-434.
- [15] Zhou Y, Li Y S, Lu ShiYing, et al. Gold nanoparticle probe - based immunoassay as a new tool for tetrodotoxin detection in puffer fish tissues[J]. Sensors and Actuators B - Chemical, 2010, 146(1):368-372.

(上接第 224 页)

由图 1 可知,随着直链淀粉添加量的增加,面包 C 比容也随之增大,未添加直链淀粉时比容为 $1.24 \text{ cm}^3/\text{g}$;当直链淀粉添加量为 40% 时,比容为 $1.75 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。由此可知,用纯薏苡仁粉制作的面包的膨松度随直链淀粉添加量的增加而增加,由此可以推测出薏苡仁膨化食品膨松度不佳的原因之一是其直链淀粉含量低,加工过程中无法形成高强度的淀粉凝胶。

2.2 支链淀粉对薏苡仁面包膨松度的影响

由图 2 可知,随着支链淀粉添加量的增加,纯高筋粉面包、薏苡仁面包、纯薏苡仁粉面包的比容都呈下降趋势。由此可知,支链淀粉添加量增加会降低面包的膨松度。支链淀粉

分子分支化程度高,不能像直链淀粉分子那样延伸,也不能形成高强度的结合区,因此支链淀粉含量的增加会降低淀粉的凝胶性及凝胶强度,甚至会降低面筋强度,从而抑制发酵,导致面包不能很好的膨松。

3 结论

薏苡仁膨化食品几乎没有膨松度,研究表明,薏苡仁产品膨松度受淀粉含量的影响,适量添加直链淀粉可以增加产品的膨松度。

参考文献:

- [1] 张栋霞,张 涛. GD/MSD 分析薏仁油组份[J]. 粮食与油脂, 2001(1):42-43.
- [2] 胡 军,金国梁. 薏苡仁的营养与药用价值[J]. 中国食物与营养, 2007(6):57-58.
- [3] 张 娟,唐文凭,王正武,等. 芭蕉芋淀粉和直链淀粉提取、分离、鉴定及含量测定[J]. 食品科学, 2008, 29(9):303-306.
- [4] 李德海,马 莺. 玉米直链淀粉的制备及其特性[J]. 食品科学, 2011, 32(6):89-94.
- [5] Mejía - Agüero L E, Galeno F, Hernández - Hernández O, et al. Starch determination, amylose content and susceptibility to *in vitro* amylolysis in flours from the roots of 25 cassava varieties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(3):673-678.

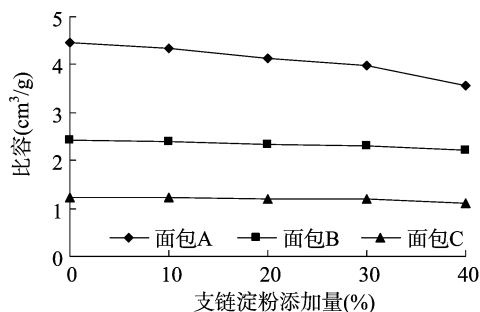


图2 支链淀粉对面包比容的影响