广 东 省 卫 生 健 康 委 员 会 发布

2019-12-01实施

2019-07-11发布

纳豆粉

DBS 44/013-2019

DB 44

广东省食品安全地方标准

前 言

本标准为首次发布。

纳豆粉

* 1. 范围

本标准适用于纳豆粉。

* 1. 定义
     1. 纳豆粉

以大豆为原料，添加或不添加其他辅料，经枯草芽孢杆菌发酵、干燥、粉碎等工艺加工而成的粉末状发酵豆制品。

* 1. 技术要求
     1. 原料要求
        1. 大豆：应符合GB 2715和GB 1352的要求。
        2. 所有原辅料：应符合GB 2761、GB 2762、GB 2763、GB 2763.1以及相应食品标准的有关规定。
     2. 感官要求

应符合表1的规定。

表1 感官要求

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 要求 | 检验方法 |
| 色泽 | 浅黄色至黄褐色 | 取适量试样置于白色洁净瓷盘中，在自然光下观察色泽、性状和杂质，闻其气味，品其滋味。 |
| 气味、滋味 | 具有纳豆粉特有的气味、滋味，无异味 |
| 性状 | 粉末状，无结块 |
| 杂质 | 无正常视力可见外来杂质 |

* + 1. 理化指标

应符合表2规定。

表2 理化指标

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 项目 | | 要求 | 检验方法 |
| 纳豆激酶a | FU/g ≥ | 2000 | 附录A 紫外分光光度法 |
| IU/g ≥ | 13000 | 附录B 琼脂糖纤维蛋白平板法 |
| 蛋白质b，g/100g ≥ | | 20 | GB 5009.5 |
| 水分，g/100g ≤ | | 7.0 | GB 5009.3 |
| 灰分，g/100g ≤ | | 6.0 | GB 5009.4 |
| a纳豆激酶用附录A或附录B其中一个方法检测符合相应要求即视为合格。  b氮折算成蛋白质的系数，以6.25计。 | | | |

* + 1. 污染物限量

应符合表3的规定。

表3 污染物限量

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 要求 | 检验方法 |
| 铅（以Pb计），mg/kg ≤ | 0.5 | GB 5009.12 |

* + 1. 真菌毒素限量

应符合表4的规定。

表4 真菌毒素限量

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目 | 要求 | 检验方法 |
| 黄曲霉毒素B1，μg/kg ≤ | 5.0 | GB 5009.22 |

* + 1. 微生物限量

应符合表5的规定。

表5 微生物限量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目 | 采样方案a及限量 | | | | 检验方法 |
| n | c | m | M |
| 大肠菌群，CFU/g | 5 | 2 | 100 | 1000 | GB 4789.3 平板计数法 |
| 沙门氏菌，/25g | 5 | 0 | 0 | -- | GB 4789.4 |
| 金黄色葡萄球菌，CFU/g | 5 | 1 | 100 | 1000 | GB 4789.10第二法 |
| a样品的采样及处理按GB 4789.1和GB/T 4789.21执行。  n为同一批次产品应采集的样品件数；c为最大可允许超出m值的样品数；m为致病菌指标可接受水平的限量值；M为致病菌指标的最高安全限量值。 | | | | | |

* + 1. 食品添加剂要求
       1. 食品添加剂的使用应符合GB 2760对发酵豆制品的规定。

附录A

纳豆激酶测定方法--紫外分光光度法

1. 范围

本方法适用于纳豆粉中纳豆激酶的测定。

本方法的检测浓度范围为0.67~1.33 FU/mL。

1. 原理

纳豆粉中的纳豆激酶与纤维蛋白发生反应，使纤维蛋白肽键水解。水解反应使溶液在紫外光275 nm处吸光度发生变化。用紫外分光光度计测定水解反应前后吸光度的变化，通过换算间接得出纳豆激酶的活力，单位用FU表示。一个活力单位（1 FU）是指在275 nm下，使吸光度值每增加0.01时消耗的酶量。

1. 试剂配置
   1. 实验用水为一级水。
   2. 磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）：分析纯；
   3. 磷酸二氢钠（NaH2PO4·2H2O）：分析纯；
   4. 氯化钠（NaCl）：分析纯；
   5. 盐酸（HCl）：分析纯；
   6. 三氯乙酸（TCA）：分析纯；
   7. 纤维蛋白原：CAS：9001-32-5，SIGMA，提取自牛血浆，产品编号F8630，规格：5 g/瓶，含量：65-85%；
   8. 凝血酶：CAS：9002-04-4，SIGMA，提取自牛血浆，产品编号T4648，规格：21.6 mg/瓶，含量：1 KU；
   9. 醋酸（CH3COOH）：分析纯；
   10. 醋酸钠（CH3COONa·3H2O）：分析纯；
   11. Triton X-100：分析纯；
   12. 硫酸钙（CaSO4·2H2O）：分析纯；
   13. 0.01mol/L 磷酸盐缓冲溶液（pH6.8，含NaCl）

精密称取 3.58 g磷酸氢二钠（Na2 HPO4·12H2O），加水溶解并稀释定容至1.0 L，配成溶液A，精密称取0.78 g磷酸二氢钠(NaH2PO4·2H2O)，加水溶解并稀释定容至500 mL，配成溶液B，将溶液A和B混合，配成pH值为7.5的磷酸缓冲溶液（约取A液84 mL，16 mL B液）；

取上述pH值为7.5的磷酸缓冲溶液与0.9%的氯化钠溶液混合，混合比例约为1:17，配成pH值为6.8的磷酸盐缓冲溶液。

* 1. 0.2 mol/L三氯乙酸（TCA）溶液：精密称取32.68 g TCA，用适量去离子水溶解并稀释至1000 mL即得。
  2. 0.96％纤维蛋白原溶液：移取10 mL磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L）至锥形瓶中，加入96 mg纤维蛋白原。超声使其完全溶解，防止起泡。
  3. 凝血酶溶液：临用前用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液稀释50倍。
  4. 1 mol/L醋酸溶液：精密称取60.1 g CH3COOH，用适量去离子水溶解并稀释至1000 mL即得。
  5. 1 mol/L醋酸盐缓冲液（pH 6.0）：精密称取129.6 gCH3COONa·3H2O，用约500mL去离子水溶解，向其中加入1 mol/L醋酸溶液至pH=6.0后，用去离子水稀释至1000 mL即得。
  6. 10％Triton X-100溶液：称取10 g Triton X-100，在加热条件下用适量去离子水溶解，再补加去离子水至100 mL即得。
  7. 稀释剂：精密称取0.334 g（终浓度2 mmol/L）CaSO4·2H2O和0.585 g（终浓度10 mmol/L）NaCl，用适量去离子水溶解，向其中加入1 mol/L醋酸盐缓冲液2.0 mL（pH 6.0）以及10％Triton X-100溶液0.5 mL（最终浓度为0.005％）后，用去离子水稀释至1000 mL即得。

1. 仪器和设备
   1. 水浴锅：（37±0.5）℃；
   2. 分析天平，感量为 0.1 mg
   3. 超纯水仪
   4. pH计
   5. 涡旋混合器
   6. 离心机，转速≥12000转/min
   7. 10 mL离心管
   8. 紫外可见分光光度计，配1cm石英比色皿
2. 测试
   1. 样品溶液制备

准确称取适量样品（称样量根据不同样品中纳豆激酶的含量而定，大约保证样品溶液中纳豆激酶浓度在0.67~1.33 FU/mL之间），用稀释剂溶解，使最终反应液的校正吸光度（ΔA）在0.04~0.08之间。

* 1. 测定
     1. 样品管
        1. 将1.4 mL 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液和0.4 mL 0.96％纤维蛋白原溶液加至10 mL离心管中，37±0.5℃水浴中孵育5 min。
        2. 取出加入0.1 mL凝血酶溶液并均匀混合。至37±0.5℃水浴中孵育10 min。
        3. 取出加入0.1 mL样品溶液，涡旋混合5 s，至37±0.5℃水浴中孵育60 min。在分别达到孵育20 min和40 min时间点时，分别取出在涡旋混合器上再均匀混合5 s后，继续孵育。
        4. 至反应60 min时，加入2 mL 0.2 mol/L TCA终止反应液。将加过终止反应液的样品管继续混合均匀5 s后，于37℃±0.5℃继续孵育20 min，使终止反应完全。
        5. 取出样品液进高速离心机，在12000 rpm条件下离心10 min。
        6. 用移液管小心移取2 mL上清液至比色皿中，并于275 nm处测定吸光度（A）。
     2. 样品空白管
        1. 与样品管 A.5.2.1.1 和 A.5.2.1.2 同样操作。
        2. 取出加入2mL 0.2 mol/L TCA 终止反应液，均匀混合5s。
        3. 加0.1 mL样品溶液，均匀混合5 s后，放入37℃±0.5℃水浴中孵育20 min。
        4. 接 A.5.2.1.5 和 A.5.2.1.6 操作，得样品空白管吸光度（A0）。

1. 结果计算

样品中纳豆激酶 *X*（FU/g）按以下公式计算：

*X*=（A-A0）/(0.01×60×0.1)×D

式中：

A——样品液吸光度；

A0——空白管吸光度；

D——样品的稀释率，D=定容体积（mL）/称样量（g）；

计算结果表示到小数点后两位。

1. 检测质量控制标准

在重复性条件下获得的独立测定结果的相对标准偏差不得超过20%。

1. 分析步骤的关键控制点及说明
   1. 稀释剂可在室温下保存 15 天。过期重配。
   2. 样品溶液浑浊时需过滤，取滤液测试。
   3. 混合均匀操作需配合使用搅拌器。
   4. 要严格控制酶解反应时间。
   5. 酶对样品反应的影响较大。当实验更换了一批纤维蛋白原和凝血酶后，对同一批样品而言，结果有所不同。

附录B

纳豆激酶测定方法--琼脂糖纤维蛋白平板法

1. 范围

本方法适用于纳豆粉中纳豆激酶的测定。

1. 原理

纳豆激酶同尿激酶一样，是具有纤溶活性的物质。在含有凝血酶和纤维蛋白原琼脂糖平板的固体支架上，样品中的纳豆激酶和尿激酶标准系列同时发生溶纤反应，形成透明溶圈。以溶圈面积大小的对数为横坐标，浓度对数为纵坐标作回归曲线，得出相应的回归方程。根据回归方程计算样品中尿激酶活性大小。样品中的纳豆激酶以尿激酶活性大小IU计。

1. 试剂与试液

实验用水为符合GB/T 6682规定的一级水。

* 1. 试剂
     1. 磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）：分析纯；
     2. 磷酸二氢钠（NaH2PO4·2H2O）：分析纯；
     3. 氯化钠（NaCl）：分析纯；
     4. 琼脂糖
     5. 纤维蛋白原（来源牛血）：CAS：9001-32-5；
     6. 凝血酶（来源牛血）：CAS：9002-04-4；
     7. 尿激酶：中国食品药品检定研究院
  2. 试液配制
     1. PBS缓冲液的制备：

0.01mol/L磷酸盐缓冲液（pH 7.5）：称取磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）3.58 g，加双蒸水使溶解并稀释至1000 mL为Ⅰ液；取磷酸二氢钠(NaH2PO4·2H2O) 0.78 g加双蒸水使溶解并稀释至500 mL为Ⅱ液；将两液混合，调节至pH值为7.5（Ⅰ液取约84 mL，Ⅱ液取约16 mL）；

0.9%氯化钠溶液：称取氯化钠9 g，定容至1 L，得到0.9%氯化钠溶液。

将0.01 mol/L磷酸盐缓冲液（pH 7.5）与0.9%氯化钠溶液（1:17）混合，得到PBS缓冲液。

* + 1. 1.5%琼脂糖溶液：取琼脂糖1.5 g，加PBS缓冲液100 mL，加热溶解，50℃水浴保温。现配现用。
    2. 纤维蛋白原溶液

取纤维蛋白原适量，加PBS缓冲液制成每1 mL中含1.5 mg蛋白的纤维蛋白原溶液。注意：缓慢加入PBS缓冲液，防止产生气泡，加冰超声溶解。

* + 1. 凝血酶溶液

取凝血酶适量，加入0.9%氯化钠溶液制成每1 mL中含1-2U或1-2BP单位的溶液（根据不同试剂标签标识单位而定）。

* + 1. 尿激酶标准系列溶液的制备：

取尿激酶标准品，按标示效价加入所需PBS缓冲液溶解，配制的尿激酶标准溶液为1000 IU/mL，按表B.1继续配制尿激酶标准系列溶液。

表B.1尿激酶标准系列溶液配制

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 尿激酶对照系列溶液浓度IU/mL | 尿激酶对照溶液取样量μL | PBS缓冲液取样量μL |
| 1000 | 100 | 0 |
| 800 | 80 | 20 |
| 600 | 60 | 40 |
| 500 | 50 | 50 |
| 400 | 40 | 60 |
| 200 | 20 | 80 |
| 100 | 10 | 90 |
| 50 | 10 | 190 |
| 25 | 10 | 390 |

注：稀释后的各标准溶液管应采用涡旋震荡器混合均匀。

1. 仪器和设备
   1. 游标卡尺
   2. 恒温水浴锅
   3. 超纯水仪
   4. 恒温培养箱
   5. 涡旋混合器
   6. 电子分析天平
   7. 可调控电炉
   8. 超声仪
   9. 培养皿（内径14cm）
   10. 打孔器（直径3mm）
2. 分析步骤
   1. 样品溶液的制备：

取纳豆粉样品适量（正式检验前有预知大约含量），加适量PBS缓冲溶解，样液浓度稀释至200~400 IU/mL左右。超声提取15 min后定容至容量瓶刻线。

* 1. 纤维蛋白平板的制备：

取B.3.2.3纤维蛋白原溶液39 mL置100 mL烧杯中，于50℃水浴加热5 min，边搅拌边加入B.3.2.2琼脂糖溶液39 mL和B.3.2.4凝血酶3.0 mL，立即混匀，快速倒入培养皿，室温水平放置1小时。

用纸画一同培养皿底部相同、直径为14cm的圆，在圆的中心画一直径为24mm的小圆，以此小圆的圆心为中心点，放上已制备好的平板。用打孔器的不锈钢小管，在纤维蛋白平板上垂直打孔。

所需打孔的数目为标准系列数目加样品（包括平行样）数目的和，孔与孔之间保持15mm的距离，以防止溶圈交叉，影响测量的直径结果。

* 1. 测定：
     1. 尿激酶对照曲线点样：

用移液器精密量取B.3.2.5.1表中不同浓度尿激酶对照溶液各10uL，分别垂直点在B.5.2制备的纤维蛋白平板孔中，并标记各点的浓度。

* + 1. 纳豆粉样品点样：

根据预先估算样品的纳豆激酶大小（可参照以往的数据），称取样品适量于适当的容量瓶中，样品量的大小应使最终点样浓度在200~400IU/mL左右即可。用移液器精密量取样品溶液10uL点样，同时做1-2个平行样。尿激酶标准曲线系列和样品溶液同在一个纤维蛋白平板中点样，并准确标记样品号。点样完成后盖上平皿盖，置于37℃恒温箱中反应18小时。

* + 1. 溶圈测量

取出平板即刻开始测量溶圈直径（注：平板取出后溶圈反应仍在进行中，如测量时间拖延较长，将影响溶圈直径大小的判断。将平板放入5℃冰箱可协助溶圈反应暂时停止），计算溶圈面积=πR2。以溶圈面积对数为横坐标，浓度对数为纵坐标作回归曲线，得出相应的回归方程。根据回归方程计算样品中纳豆激酶大小C。

1. 计算

样品中纳豆激酶的活性X=C×V/M

其中：

X：样品纳豆激酶，IU/g；

C：通过回归方程计算的样品液中纳豆激酶，IU/mL；

V：样品稀释总体积，mL；

M：样品质量，g。

1. 分析步骤的关键控制点及说明
   1. 实验前，所使用的平皿及其他器具应先在紫外灯下消毒30min。
   2. PBS缓冲液及0.9%氯化钠溶液均需进行灭菌。
   3. 可将凝血酶先配制成20 U/mL或20 BP/mL溶液，分装于小离心管存放于-20℃冰箱中，使用前根据配制的纤维蛋白原的量进行稀释使用。
   4. 平板制备过程，平皿应水平放置在平整桌面上，倒平板时要防止产生气泡。
   5. 在样品制备时，可参照样品中纳豆激酶大致含量，来直接推测称样量的大小，目的是使最终点样浓度在200~400 IU/mL范围内即可。
   6. 纤维蛋白原溶液水浴时间及培养时间，要严格按标准进行控制。
   7. 如同时做多个平板来不及测量，可先放5℃冰箱，抑制溶圈的生长。