

DB 44

广东省食品安全地方标准

DBS 44/013-2019

纳豆粉

2019-07-11 发布

2019-12-01 实施

广东省卫生健康委员会 发布

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。

2 定义

2.1 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。

3 技术要求

3.1 原料要求

3.1.1 大豆：应符合 GB 2715 和 GB 1352 的要求。

3.1.2 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。

3.2 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	

3.3 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 \geq	2000	附录 A 紫外分光光度法
	IU/g \geq	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。			

3.4 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

3.5 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 B ₁ , μg/kg	≤	5.0	GB 5009.22

3.6 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。					

3.7 食品添加剂要求

3.7.1 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

A.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。

A.2 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。

A.3 试剂配置

A.3.1 实验用水为一级水。

A.3.2 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)：分析纯；

A.3.3 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)：分析纯；

A.3.4 氯化钠 (NaCl)：分析纯；

A.3.5 盐酸 (HCl)：分析纯；

A.3.6 三氯乙酸 (TCA)：分析纯；

A.3.7 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%；

A.3.8 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；

A.3.9 醋酸 (CH_3COOH)：分析纯；

A.3.10 醋酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)：分析纯；

A.3.11 Triton X-100：分析纯；

A.3.12 硫酸钙 ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)：分析纯；

A.3.13 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)，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 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，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。

A. 3. 14 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。

A. 3. 15 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。

A. 3. 16 凝血酶溶液: 临用前用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释 50 倍。

A. 3. 17 1 mol/L 醋酸溶液: 精密称取 60.1 g CH_3COOH , 用适量去离子水溶解并稀释至 1000 mL 即得。

A. 3. 18 1 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 6.0): 精密称取 129.6 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 用约 500 mL 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。

A. 3. 19 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。

A. 3. 20 稀释剂: 精密称取 0.334 g (终浓度 2 mmol/L) $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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。

A. 4 仪器和设备

A. 4. 1 水浴锅: (37±0.5) °C;

A. 4. 2 分析天平, 感量为 0.1 mg

A. 4. 3 超纯水仪

A. 4. 4 pH 计

A. 4. 5 涡旋混合器

A. 4. 6 离心机, 转速 ≥ 12000 转/min

A. 4. 7 10 mL 离心管

A. 4. 8 紫外可见分光光度计, 配 1cm 石英比色皿

A. 5 测试

A. 5. 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。

A. 5. 2 测定

A. 5. 2. 1 样品管

A. 5. 2. 1. 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。

A. 5. 2. 1. 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。

A. 5. 2. 1. 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。

A. 5. 2. 1. 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。

A. 5. 2. 1. 5 取出样品液进高速离心机, 在 12000 rpm 条件下离心 10 min。

A. 5. 2. 1. 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)。

A. 5. 2. 2 样品空白管

A. 5. 2. 2. 1 与样品管 A. 5. 2. 1. 1 和 A. 5. 2. 1. 2 同样操作。

A. 5. 2. 2. 2 取出加入 2 mL 0.2 mol/L TCA 终止反应液, 均匀混合 5s。

A. 5. 2. 2. 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。

A. 5. 2. 2. 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)。

A. 6 结果计算

样品中纳豆激酶 X (FU/g) 按以下公式计算:

$$X = (A - A_0) / (0.01 \times 60 \times 0.1) \times D$$

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。

A. 7 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%。

A. 8 分析步骤的关键控制点及说明

A. 8. 1 稀释剂可在室温下保存 15 天。过期重配。

A. 8. 2 样品溶液浑浊时需过滤, 取滤液测试。

A. 8. 3 混合均匀操作需配合使用搅拌器。

A. 8. 4 要严格控制酶解反应时间。

A. 8. 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

B.1 范围

本方法适用于纳豆粉中纳豆激酶的测定。

B.2 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。

B.3 试剂与试液

实验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

B.3.1 试剂

B.3.1.1 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)：分析纯；

B.3.1.2 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)：分析纯；

B.3.1.3 氯化钠 (NaCl)：分析纯；

B.3.1.4 琼脂糖

B.3.1.5 纤维蛋白原（来源牛血）：CAS：9001-32-5；

B.3.1.6 凝血酶（来源牛血）：CAS：9002-04-4；

B.3.1.7 尿激酶：中国食品药品检定研究院

B.3.2 试液配制

B.3.2.1 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 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 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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。

B.3.2.2 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。

B.3.2.3 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。

B. 3. 2. 4 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）。

B. 3. 2. 5 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 μ L	PBS 缓冲液取样量 μ L
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。

B. 4 仪器和设备

B. 4. 1 游标卡尺

B. 4. 2 恒温水浴锅

B. 4. 3 超纯水仪

B. 4. 4 恒温培养箱

B. 4. 5 涡旋混合器

B. 4. 6 电子分析天平

B. 4. 7 可控电炉

B. 4. 8 超声仪

B. 4. 9 培养皿（内径 14cm）

B. 4. 10 打孔器（直径 3mm）

B. 5 分析步骤

B. 5. 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。

B. 5. 2 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。

B. 5. 3 测定：

B. 5. 3. 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 10 μ L，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。

B. 5. 3. 2 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 10 μ L 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。

B. 5. 3. 3 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 $=\pi R^2$ 。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。

B. 6 计算

样品中纳豆激酶的活性 $X=C \times V/M$

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。

B. 7 分析步骤的关键控制点及说明

- B. 7. 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。
- B. 7. 2 PBS 缓冲液及 0.9%氯化钠溶液均需进行灭菌。
- B. 7. 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。
- B. 7. 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。
- B. 7. 5 在样品制备时, 可参照样品种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。
- B. 7. 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。
- B. 7. 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。
-