



412355S-2022



河南中大恒源生物科技股份有限公司企业标准

Q/HZD 0078S-2022

纳豆提取物

2022-08-29 发布

2022-08-29 实施

河南中大恒源生物科技股份有限公司 发布

前 言

本标准中附录 A 为规范性文件。

本标准由河南中大恒源生物科技股份有限公司提出。

本标准起草单位：河南中大恒源生物科技股份有限公司。

本标准主要起草人：杨盼盼、章文晋、潘天义、宋亚旭、焦军伟。

H N

Q B

纳豆提取物

1 范围

本标准规定了纳豆提取物的要求、检验方法、检验规则等。

本标准适用于以纳豆为原料，经粉碎、水浸提、过滤、浓缩、喷雾干燥、包装等主要工艺生产而成的纳豆提取物。用于食品加工用配料，不直接食用。

2 要求

2.1 原辅料要求

2.1.1 纳豆应清洁卫生、无污染，并符合 GB 2762 和 GB 2763 的规定。

2.1.2 生产用水应符合 GB 5749 的规定。

2.2 感官要求

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
性状	粉末	取适量试样，在自然光下观察其色泽、性状、杂质，嗅其气味，品其滋味。
滋味、气味	具有该品特有的滋味、气味、无异味	
色泽	具有该产品固有的色泽	
杂质	无正常视力可见外来杂质	

2.3 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
纳豆激酶, FU/g	\geq 5000	附录A
水分, %	\leq 10.0	GB 5009.3
灰分, %	\leq 10.0	GB 5009.4
总砷(以As计), mg/kg	\leq 0.5	GB 5009.11
铅*(以Pb计), mg/kg	\leq 0.8	GB 5009.12
六六六, mg/kg	\leq 0.05	GB/T 5009.19
滴滴涕, mg/kg	\leq 0.05	GB/T 5009.19
狄氏剂, mg/kg	\leq 0.05	GB/T 5009.19
艾氏剂, mg/kg	\leq 0.05	GB/T 5009.19

黄曲霉毒素B ₁ , μg/kg	≤	5.0	GB 5009.22
*铅指标严于食品安全国家标准GB 2762的规定。			

2.4 微生物限量

微生物限量应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项 目	采样方案 ^a 及限量				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数, CFU/g	5	2	1000	30000	GB 4789.2
大肠菌群, CFU/g	5	2	10	100	GB 4789.3
沙门氏菌, /25g	5	0	0	—	GB 4789.4
霉菌和酵母, CFU/g	≤	50			GB 4789.15
注 1: a 样品的采样及处理按 GB 4789.1 执行;					
注 2: 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 为微生物指标可接受水平的限量值; M 为微生物指标的最高安全限量值。					

2.5 净含量及允许短缺量

净含量及允许短缺量应符合 JJF 1070 的规定。

2.6 生产加工过程的卫生要求

生产加工过程的卫生要求应符合 GB 14881 的规定。

2.7 其它要求

真菌毒素限量应符合 GB 2761 的规定; 污染物限量应符合 GB 2762 的规定; 农药残留限量应符合 GB 2763 的规定。

3 检验

出厂检验项目为感官要求、纳豆激酶、水分、灰分、菌落总数、大肠菌群、霉菌和酵母、净含量及允许短缺量。

型式检验按国家相关规定执行。

附录 A

(规范性附录)

纳豆激酶的测定方法

A.1 范围

本方法的检测浓度范围为 0.67~1.33FU/mL。

A.2 原理

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 275nm 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 (1FU) 是指在 275nm 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: 5g/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: 21.6mg/瓶, 含量: 1KU;

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 TritonX-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 3.58g 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 1.0L，配成溶液 A，精密称取 0.78g 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 500mL，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 84mL, 16mL 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 0.2mol/L 三氯乙酸 (TCA) 溶液：精密称取 32.68g TCA，用适量去离子水溶解并稀释至 1000mL 即得。

A.3.15 0.96% 纤维蛋白原溶液：移取 10mL 磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L) 至锥形瓶中，加入 96mg 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 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液稀释 50 倍。

A.3.17 1mol/L 醋酸溶液：精密称取 60.1g CH_3COOH ，用适量去离子水溶解并稀释至 1000mL 即得。

A.3.18 1mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH6.0)：精密称取 129.6g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，用约 500mL 去离子水溶解，向其中加入 1mol/L 醋酸溶液至 pH=6.0 后，用去离子水稀释至 1000mL 即得。

A. 3.19 10%TritonX-100 溶液：称取 10gTritonX-100，在加热条件下用适量去离子水溶解，再补加去离子水至 100mL 即得。

A. 3.20 稀释剂：精密称取 0.334g（终浓度 2mmol/L） $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.585g（终浓度 10mmol/L）NaCl，用适量去离子水溶解，向其中加入 1mol/L 醋酸盐缓冲液 2.0mL（pH6.0）以及 10%TritonX-100 溶液 0.5mL（最终浓度为 0.005%）后，用去离子水稀释至 1000mL 即得。

A. 4 仪器和设备

A. 4.1 水浴锅：（ 37 ± 0.5 ）℃；

A. 4.2 分析天平，感量为 0.1mg

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 10mL 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 0.67-1.33FU/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 1.4mL 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液和 0.4mL 0.96% 纤维蛋白原溶液加至 10mL 离心管中， 37 ± 0.5 ℃ 水浴中孵育 5min。

A. 5.2.1.2 取出加入 0.1mL 凝血酶溶液并均匀混合。至 37 ± 0.5 ℃ 水浴中孵育 10min。

A. 5.2.1.3 取出加入 0.1mL 样品溶液，涡旋混合 5s，至 37 ± 0.5 ℃ 水浴中孵育 60min。在分别达到孵育 20min 和 40min 时间点时，分别取出在涡旋混合器上再均匀混合 5s 后，继续孵育。

A. 5.2.1.4 至反应 60min 时，加入 2mL 0.2mol/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 5s 后，于 $37^\circ \text{C} \pm 0.5^\circ \text{C}$ 继续孵育 20min，使终止反应完全。

A. 5.2.1.5 取出样品液进高速离心机，在 12000rpm 条件下离心 10min。

A. 5.2.1.6 用移液管小心移取 2mL 上清液至比色皿中，并于 275nm 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 2mL 0.2mol/L TCA 终止反应液，均匀混合 5s。

A. 5.2.2.3 加 0.1mL 样品溶液，均匀混合 5s 后，放入 $37^\circ \text{C} \pm 0.5^\circ \text{C}$ 水浴中孵育 20min。

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（ A_0 ）。

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。

方法来源：该方法来源于广东省食品安全地方标准《DBS 44/013-2019 纳豆粉》中纳豆激酶的测定方法—紫外分光光度法。

编制说明

本标准适用于以纳豆为原料，经粉碎、水浸提、过滤、浓缩、喷雾干燥、包装等主要工艺生产而成的纳豆提取物。用于食品加工用配料，不直接食用。

根据《中华人民共和国食品安全法》和《中华人民共和国标准化法》的有关规定，参照 GB 7101《食品安全国家标准 饮料》制订本企业标准，作为组织生产、质量控制和监督检查依据。

本标准中铅指标严于食品安全国家标准 GB 2762 的规定。

H N

河南中大恒源生物科技股份有限公司

Q B