
ICS

CCS

团 体 标 准

T/CHC XXXX-202X

纳豆激酶制品

Nattokinase products

(征求意见稿)

202X-xx-xx 发布

202X-xx-xx 实施

中国保健协会 发布

前言

本标准按照《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》（GB/T 1.1-2020）和《团体标准化 第1部分：良好行为指南》（GB/T 20004.1-2016）给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由中国保健协会食物营养与安全专业委员会提出。

本标准由中国保健协会归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

纳豆激酶制品

1 范围

本标准规定了纳豆激酶制品的术语和定义、技术要求、净含量、生产过程要求、检测规则、包装、标签、运输和贮存等要求。

本标准适用于以大豆等为原料，经过蒸煮或灭菌后，接种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*（纳豆菌）发酵制得的纳豆，或经干燥、粉碎后所得的纳豆粉，或纳豆/纳豆粉经进一步纯化所得的纳豆激酶为主要原料制得的含有一定量纳豆激酶的食品。

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 191 包装储运图示标志

GB 1352 中华人民共和国国家标准 大豆

GB 2712 食品安全国家标准 豆制品

GB 2715 食品安全国家标准 粮食

GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准

GB 2761 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量

GB 2762 食品安全国家标准 食品中污染物限量（含第1号修改单）

GB 2763 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母检验

GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定

GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定

GB 5009.11 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定

GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定

GB 5009.22 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定

GB 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 6543 运输包装用单瓦楞纸箱和双瓦楞纸箱

GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则

GB/T 8622 饲料用大豆制品中尿素酶活性的测定

GB 14880 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准

GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范

GB 16740 食品安全国家标准 保健食品

GB 17405 保健食品良好操作规范

GB 23350 限制商品过度包装要求 食品和化妆品

GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则

GB/T 28118 食品包装用塑料与铝箔复合膜、袋

DBS 44/013-2019 广东省食品安全地方标准 纳豆粉

SB/T 10528 中华人民共和国国内贸易行业标准 纳豆

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

纳豆激酶制品 nattokinase products

以纳豆/纳豆粉，或以纳豆/纳豆粉为原料经纯化制得的纳豆激酶为主要原料，添加或不添加辅料制得的、纳豆激酶含量达到一定量的食品。

3.2

FU Fibrinolytic Units

称为芬森氏单位，指在一定时间内一定量的纳豆激酶溶解纤维蛋白的量。

4. 技术要求

4.1 原辅料要求

4.1.1 纳豆及纳豆粉

纳豆应符合 SB/T 10528 要求；纳豆粉应符合 DBS 44/013 要求。

4.1.2 枯草芽孢杆菌（纳豆菌）

生产纳豆的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*（纳豆菌）应是安全、无毒、无害和无其他杂菌的一种枯草芽孢杆菌的纯培养物。

4.1.3 水

应符合 GB 5749 的规定

4.1.4 其他辅料

应符合 GB 2761、GB 2762、GB 2763，以及相应的产品标准及要求的規定。

4.1.5 食品添加剂

食品添加剂的质量还应符合相应的产品标准，食品添加剂的品种和使用限量应符合 GB2760 对发酵豆制品的规定。

4.1.6 食品营养强化剂

食品营养强化剂的质量还应符合相应的产品标准食品营养强化剂的使用应符合 GB14880 的规定。

4.2 感官要求

应符合表 1 的规定。

表 1 感官指标

项目	要求	检验方法
色泽	符合相应产品的特有要求	固体样品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。
外观	符合相应产品的要求	
气味、滋味	具有纳豆应有的滋味和香味，无异味	
杂质	无正常视力可见外来杂质	

4.3 理化要求

应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项目	指标	检测方法
纳豆激酶, FU/g	≥ 2000	附录 A
水分, g/100g	≤ 7.0	GB 5009.3
灰分, g/100g	≤ 7.0	GB 5009.4
尿酶活性	阴性	GB/T 8622

4.4 污染物限量

应符合表 3 规定。

表 3 污染物限量

项目	指标	检测方法
铅（以 Pb 计）， mg/kg ≤	0.5	GB 5009.12
砷（以 As 计）， mg/kg ≤	0.5	GB 5009.11

4.5 真菌毒素限量

应符合表 4 的规定。

表 4 真菌毒素限量

项目	指标	检测方法
黄曲霉毒素 B1， μg/kg ≤	5.0	GB 5009.22

4.6 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（若非指定，均以/25g 表示）				检测方法
	n	c	m	M	
大肠菌群， CFU/g	5	2	10	100	GB 4789.3
霉菌和酵母， CFU/g	50				GB 4789.15
致病菌	采样方案 ^a 及限量（若非指定，均以/25g 表示）				检验方法
	n	c	m	M	
沙门氏菌	5	0	0	——	GB 4789.4
金黄色葡萄球菌，	5	2	10	100	GB/T 4789.10
^a 样品的采样及处理按 GB4789.1 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。 m=0时，表示不得检出。					

5 净含量

应符合定量包装商品净含量计量检测规则，检验方法按 JJF-1070 规定执行。

6 生产加工过程要求

食品生产应符合 GB 14881 的规定；保健食品生产应符合 GB 17405 的规定。

7 检验规则

7.1 组批

由同一批投料，同一生产线生产，包装完好的同一品种产品为一批。

7.2 抽样

样品按批随机抽取，每批抽取样品数量不少于 5 个最小包装单位样品，且抽样量不低于检验量的 3 倍，作为检验、留样。

7.3 出厂检验

产品出厂前进行出厂检验，同一品种不同包装的产品，不受包装规格和包装形式影响的检验项目可以一并检验。出厂检验的项目包括：感官检验、水分、霉菌和酵母菌、大肠菌群、净含量等。

7.4 型式检验

7.4.1 型式检验项目包括本标准中规定的全部项目。

7.4.2 正常生产时应每年至少进行一次型式检验，此外，发生下列情况之一时也应进行型式检验：

- a) 新产品试制鉴定时；
- b) 原辅料或配方、生产工艺、设备有较大变化时，可能影响产品质量时；
- c) 更换设备或长期停产后，恢复生产时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
- e) 国家有关行政管理部门提出进行型式检验要求时；

7.5 判定原则

7.5.1 检验项目全部符合本标准判为合格。

7.5.2 检验项目（微生物项目除外）若有一项及以上不符合本标准，可以在同批次产品中加倍抽样复检，以复检结果为准。

7.5.3 微生物指标检验不符合本标准，判为不合格，不得复检。

8 标志、包装、运输和贮存

8.1 包装

8.1.1 产品内包装材料应清洁、卫生，无毒、无害、无异味，符合国家食品安全标准和相关规定的要求。内包装选用食品包装用塑料与铝箔复合膜、袋，应符合 GB/T 28118 的规定。

8.1.2 销售包装应符合 GB 23350 的规定。

8.1.3 外包装采用瓦楞纸箱，应符合 GB/T 6543 的规定。

8.2 标志

8.2.1 食品应符合 GB 7718 和 GB 28050 的有关规定,保健食品的销售包装还应符合 GB 16740 及有关规定。

8.2.2 包装储运图示标志应符合 GB/T 191 规定。

8.3 运输

8.3.1 产品运输工具应清洁、卫生、干燥、无污染物。

8.3.2 严禁与有毒、有害、有腐蚀性、有异味的、或影响产品质量的物品混装运输。

8.3.3 搬运过程中应轻拿轻放, 严禁摔撞、挤压。

8.3.4 产品运输过程中, 应遮盖, 防雨防晒。

8.4 贮存

8.4.1 产品应贮存在清洁、干燥、通风、无鼠虫害、无污染的环境内, 不得与有毒、有害、有腐蚀性的物品一同存放, 尤其要避开有异常气味的物品。

8.4.2 仓库内宜有防尘、防蝇、防鼠等设施, 堆放应有垫板, 离地 10cm 以上, 离墙 30cm 以上。

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：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；

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1000mL 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。

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 ）℃；

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10mL 离心管中, $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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2mL 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 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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, $D = \text{定容体积 (mL)} / \text{称样量 (g)}$;

注: 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或旋涡混合器等。

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。
