

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 6 月 4 日 (04.06.2020)

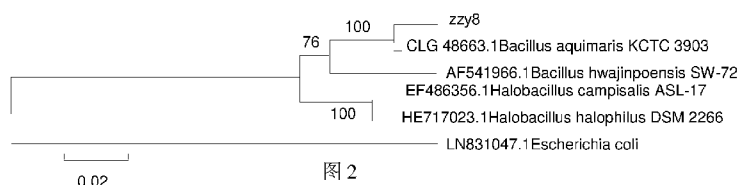


(10) 国际公布号
WO 2020/107760 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)
A23L 17/00 (2016.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/080282
- (22) 国际申请日: 2019 年 3 月 29 日 (29.03.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811452967.8 2018 年 11 月 30 日 (30.11.2018) CN
201811451711.5 2018 年 11 月 30 日 (30.11.2018) CN
201811452816.2 2018 年 11 月 30 日 (30.11.2018) CN
201811453568.3 2018 年 11 月 30 日 (30.11.2018) CN
- (71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。
- (72) 发明人: 高瑞昌 (GAO, Ruichang); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 郑志颖 (ZHENG, Zhiying); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 袁丽 (YUAN, Li); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 伍晓云 (WU, Xiaoyun); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 周巧珍 (ZHOU, Qiaozhen); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。 储倩 (CHU, Qian); 中国江苏省镇江学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。
- (74) 代理人: 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 (JW IP LAW FIRM); 中国北京市朝阳区酒仙桥路 14 号 A5 楼 7 层 701, Beijing 100015 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) **Title:** MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA AND METHOD FOR FERMENTING FISH MEAT SAUCE BY USING SAME

(54) 发明名称: 中度嗜盐菌及利用其发酵鱼肉酱的方法



(57) **Abstract:** The present invention relates to the technical field of solid-state fermentation for fermenting aquatic products by using bacterial strains, and disclosed thereby are a moderately halophilic bacteria and a method for fermenting fish meat sauce by using same. A moderately halophilic bacteria starter is used as a production starter to produce fish meat sauce, and by means of physicochemical index evaluation and sensory evaluation of fermented fish meat sauce, the effects of the ratio of a mixed starter, inoculation amount, fermentation temperature, fermentation time and salinity on fish meat sauce have been studied such that the fish meat sauce has the characteristics of short fermentation time, low salinity, high safety, good flavor and high nutritional value. By using the described mixed starter, a fish meat sauce fermentation product with good flavor may be obtained.

(57) **摘要:** 本发明公开了中度嗜盐菌及利用其发酵鱼肉酱的方法, 属于利用菌株发酵水产品固态发酵技术领域。利用中度嗜盐菌发酵剂作为生产发酵剂生产鱼肉酱, 通过发酵鱼肉酱的理化指标评价和感官评价, 研究混合发酵剂比例、接种量、发酵温度, 发酵时间和盐度对鱼肉酱的影响, 使得鱼肉酱具有发酵时间短、盐度较低、安全性高和风味与营养价值较高的特性。利用此混合发酵剂能够得到风味较好的鱼肉酱发酵制品。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

中度嗜盐菌及其利用其发酵鱼肉酱的方法

技术领域

本发明涉及中度嗜盐菌及其利用其发酵鱼肉酱的方法，属于利用菌株发酵水产品固态发酵技术领域。

背景技术

我国淡水养殖业发展迅速，但加工业发展中相对滞后。因此开发适合国内消费市场需求淡水鱼产品，对推动淡水鱼产业健康发展具有重要的现实意义。目前，发酵水产品中氨基酸含量丰富，营养价值高，深受消费者喜爱，但对于发酵产品又存在着发酵时间长、含盐量高和发酵不稳定等问题。中度嗜盐菌是一种在 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 到 2.5 mol/L 之间生长最佳的极端微生物。与轻度嗜盐菌相比，中度嗜盐菌能够在高盐环境中生长，从而减少发酵过程中杂菌污染。与极端嗜盐古菌相比，中度嗜盐菌比嗜盐古菌的嗜盐范围宽，分布及来源更广泛、对营养物质要求也更低、更容易适应生存环境，在实际生产中更容易被应用。有些中度嗜盐菌又有较强的胞外蛋白酶特性。本发明将利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱，得到发酵时间短，盐度较低和风味和营养价值较高的鱼肉酱产品。为水产品发酵品质的提升提供了理论基础和方法。

发明内容

本发明利用中度嗜盐菌，结合菌株的优良发酵特性，采用菌株发酵法生产鱼肉风味酱。该方法可有效提高的风味和营养价值。

本发明提供的中度嗜盐菌 JD (*Bacillus aquimaris* JD)，已经于 2018 年 9 月 27 日保藏在位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，编号为 CGMCC NO.16541，建议的分类命名：海水芽孢杆菌 *Bacillus aquimaris*。

一种利用中度嗜盐菌菌株海水芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5~20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4 °C 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 按最终添加量 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30 d；将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 1~5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min，搅拌结束后静置透气 10~120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120°C 下二次灭菌 15~20 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

本发明提供的中度嗜盐菌 JD (*Bacillus hwajinpoensis* JD)，已经于 2018 年 9 月 27 日保藏在位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，编号为 CGMCC NO.16542，建议的分类命名：花津滩芽孢杆菌 *Bacillus hwajinpoensis*。

一种利用中度嗜盐菌菌株花津滩芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5~20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4°C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4°C 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 按最终添加量 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30 d；将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 1~5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min，搅拌结束后静置透气 10~120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃ 下二次灭菌 15~20 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

本发明提供的中度嗜盐菌 JD (*Halobacillus faecis* JD)，该中度嗜盐菌菌株已经于 2018 年 9 月 27 日保藏在位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，编号为 CGMCC NO.16543，建议的分类命名：污泥喜盐芽孢杆菌 *Halobacillus faecis*。

一种利用中度嗜盐菌菌株污泥喜盐芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5~20% (w/w)，在发酵前放置在 4℃ 冰箱内 5~24 h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃ 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 按最终添加量 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 28~40℃ 下保温发酵 5~30 d；将发酵好鱼肉酱置于 -20℃ 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 1~5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min，搅拌结束后静置透气 10~120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120 °C 下二次灭菌 15~20 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

本发明提供如下技术方案：一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法。本发明包括原料的处理、混合菌株的制备与添加、鱼肉酱的发酵、氨基酸态氮的测定、感官评定等程序，具体生产工艺如下：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5~20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4 °C 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 (1~3) : (1~3) : (1~3) 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/g) 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 (1~3) : (1~3) : (1~3) 和最终添加量 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/g) 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30 d；将发酵好的置于 -20 °C 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 2~30 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min，搅拌结束后静置透气 10~120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120 °C 下二次灭菌 15~20 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价: 氨基酸态氮含量评价, 方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价, 方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定, 方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定: 由 10 人组成感官评定小组, 评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数, 对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

本发明的优点: (1) 利用该中度嗜盐菌菌株发酵的鱼肉酱的发酵时间短, 盐度较低, 氨基酸态氮含量较高, 滋味鲜美, 营养价值丰富, 挥发性盐基氮的含量低于欧盟标准, 组胺的含量远低于国家标准, 是一种品质和安全性高的的发酵鱼肉酱产品。

(2) 将上述混合发酵剂在发酵中的接种比例、接种量、发酵时间、发酵温度、加盐量等发酵工艺进行了优化, 综合发酵鱼酱的理化指标评价和感官评价对最终鱼肉酱品质进行了综合评价。此方法获得的鱼肉酱发酵时间短, 盐度较低, 氨基酸态氮含量较高, 滋味鲜美, 营养价值丰富, 挥发性盐基氮的含量低于欧盟标准, 组胺的含量远低于国家标准, 是一种品质和安全性高的的发酵鱼肉酱产品。

附图说明

图 1 为中度嗜盐菌 *Bacillus aquimaris* JD 菌落形态;

图 2 为中度嗜盐菌 *Bacillus aquimaris* JD 的 16SrRNA 序列构建的系统发育树。注: zzy8 为本发明中度嗜盐菌 *Bacillus aquimaris* JD。

图 3 为中度嗜盐菌 *Bacillus hwajinpoensis* JD 菌落形态;

图 4 为中度嗜盐菌 *Bacillus hwajinpoensis* JD 的 16SrRNA 序列构建的系统发育树。注: zzy9 为本发明中度嗜盐菌 *Bacillus hwajinpoensis* JD。

图 5 为中度嗜盐菌 *Halobacillus faecis* JD 菌落形态;

图 6 为中度嗜盐菌 *Halobacillus faecis* JD 的 16SrRNA 序列构建的系统发育树。注: zzy5 为本发明中度嗜盐菌 *Halobacillus faecis*。

具体实施方式

(一) 菌株海水芽孢杆菌 *Bacillus aquimaris*。

1、菌株的分离筛选:

以传统发酵的新鲜虾酱为原材料, 虾酱来源于河北省唐山市丰南区黑沿子镇渔民自制虾酱, 从虾酱中分离筛选中度嗜盐菌。中度嗜盐菌的分离和纯化使用添加 1% 脱脂乳粉的 Gibbons

培养基,将无菌水按一定倍数稀释后的虾酱涂布于固体 Gibbons 培养基上,30℃培养 48h,挑取具有典型特征的菌落,继续在添加 1%脱脂乳粉的固体 Gibbons 培养基上进行多次分离纯化,获得纯培养产蛋白酶的嗜盐菌菌株。将分离并纯化后的菌株接种到 Gibbons 斜面上,30℃培养 48 h,置于 4℃冰箱短期保藏备用。

2、菌株的鉴定

2.1 菌株的形态特征

菌落淡黄色、表面光滑、边缘整齐、不透明、菌落致密,革兰氏染色为阴性,菌体呈杆状。在液体 Gibbons 培养基中培养 24 h 后,菌液浑浊。

2.2 菌株的生理特征

该菌株在 NaCl 浓度为 0~15%时均可进行生长;在 pH 为 7~9 时,生长较快;在温度范围为 25℃~43℃都能进行良好生长;

2.3 分子生物学鉴定

对分离筛选出的中度嗜盐菌经 16SrRNA 测序,基因序列经操作整理后,在 Ezbiocloud 中检索,确定为(*Bacillus aquimaris*)。根据检索到的同源菌株,应用 DNASTar 软件的 Mege5.1 程序,构建生物进化关系树如图 2。

该中度嗜盐菌菌株已经于 2018 年 9 月 27 日保藏在位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),编号为 CGMCC NO.16541,建议的分类命名:海水芽孢杆菌 *Bacillus aquimaris*。

(二) 菌株花津滩芽孢杆菌 *Bacillus hwajinpoensis*。

1、菌株的分离筛选:

以传统发酵的新鲜虾酱为原材料,虾酱来源于河北省唐山市丰南区黑沿子镇渔民自制虾酱,从虾酱中分离筛选中度嗜盐菌。中度嗜盐菌的分离和纯化使用添加 1%脱脂乳粉的 Gibbons 培养基,将无菌水按一定倍数稀释后的虾酱涂布于固体 Gibbons 培养基上,30℃培养 48h,挑取具有典型特征的菌落,继续在添加 1%脱脂乳粉的固体 Gibbons 培养基上进行多次分离纯化,获得纯培养产蛋白酶的嗜盐菌菌株。将分离并纯化后的菌株接种到 Gibbons 斜面上,30℃培养 48 h,置于 4℃冰箱短期保藏备用。

2、菌株的鉴定

2.1 菌株的形态特征

菌落呈橘黄色、表面光滑、边缘整齐、不透明、菌落致密,革兰氏染色为阳性,菌体呈杆状。在液体 Gibbons 培养基中培养 24 h 后,菌液浑浊。

2.2 菌株的生理特征

该菌株在 NaCl 浓度为 0~20%时均可进行生长；在 pH 为 7~9 时，生长较快；在温度范围为 25℃~43℃都能进行良好生长；

2.3 分子生物学鉴定

对分离筛选出的中度嗜盐菌经 16SrRNA 测序，基因序列经操作整理后，在 Ezbiocloud 中检索，确定为(*Bacillus hwajinpoensis*)。根据检索到的同源菌株，应用 DNASTar 软件的 Mege5.1 程序，构建生物进化关系树如图 2。

该中度嗜盐菌菌株已经于 2018 年 9 月 27 日保藏在位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)，编号为 CGMCC NO.16542，建议的分类命名：花津滩芽孢杆菌 *Bacillus hwajinpoensis*。

(三) 菌株沉泥喜盐芽孢杆菌 *Halobacillus faecis*。

1、菌株的分离筛选：

以传统发酵的新鲜虾酱为菌株采样源，虾酱来源于河北省唐山市丰南区黑沿子镇渔民传统法自制虾酱，从虾酱中分离筛选中度嗜盐菌。中度嗜盐菌的分离和纯化使用添加 1%脱脂乳粉的 Gibbons 培养基，将无菌水按一定倍数稀释后的虾酱涂布于固体 Gibbons 培养基上，30℃ 培养 48h，挑取具有典型特征的菌落，继续在添加 1%脱脂乳粉的固体 Gibbons 培养基上进行多次分离纯化，获得纯培养产蛋白酶的嗜盐菌菌株。将分离并纯化后的菌株接种到 Gibbons 斜面上，30℃ 培养 48 h，置于 4℃ 冰箱短期保藏备用。

2、菌株的鉴定

2.1 菌株的形态特征

菌落呈浅黄色、表面光滑、边缘整齐、不透明、菌落致密，革兰氏染色为阳性，菌体呈杆状。在液体 Gibbons 培养基中培养 24 h 后，菌液浑浊。

2.2 菌株的生理特征

该菌株在 NaCl 浓度为 0~15%时均可进行生长；在 pH 为 7~9 时，生长较快；在温度范围为 25℃~43℃都能进行良好生长；

2.3 分子生物学鉴定

对分离筛选出的中度嗜盐菌经 16SrRNA 测序，基因序列经操作整理后，在 Ezbiocloud 中检索，确定为(*Halobacillus faecis*)。根据检索到的同源菌株，应用 DNASTar 软件的 Mege5.1 程序，构建生物进化关系树如图 2。

该中度嗜盐菌菌株已经于 2018 年 9 月 27 日保藏在位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)，编号为 CGMCC NO.16543，建议的分类命名：沉泥喜盐芽孢杆菌 *Halobacillus faecis*。

实施例 1:

一种利用中度嗜盐菌菌株海水芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法, 按照下述步骤进行:

(1) 原料的处理: 碎鱼肉利用斩拌机斩断, 加入腌制海盐 5% (w/w), 在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 24 h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备: 将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 接种在培养基上活化培养, 重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4°C、10000 r/min 离心 10 min, 然后用无菌生理盐水洗涤两次, 再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL, 将菌液于 4°C 保存, 并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加: 将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 按最终添加量 10^4 CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中, 使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵: 把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 28 °C 下保温发酵 30 d; 将发酵好鱼肉酱置于 -20 °C 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气: 在鱼酱发酵的 30 d 内, 每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1 min, 搅拌结束后静置透气 10 s。

(6) 鱼肉酱熟制: 将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌: 将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封, 在 120°C 下二次灭菌 15 min, 即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价: 氨基酸态氮含量评价, 方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价, 方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定, 方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定: 由 10 人组成感官评定小组, 评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数, 对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

利用该株中度嗜盐菌菌株发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.643 g/100 g; 挥发性盐基氮含量为 25.32 mg/100 g, 低于欧盟标准 35 mg/100 g; 组胺含量为 3.77 mg/100 g, 远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g; 感官评价的综合得分为 6.27。未添加菌株鱼酱的感官评分为 5.69。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少, 鲜味明显, 与未添加菌株鱼酱相比, 风味有显著提升。

实施例 2:

一种利用中度嗜盐菌菌株海水芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法, 按照下述步骤进行:

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 24h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4°C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4°C 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 按最终添加量 10^7 CFU/g 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 40 °C 下保温发酵 5 d；将发酵好鱼肉酱置于 -20 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5 d 内，每隔 1 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 5 min，搅拌结束后静置透气 120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120°C 下二次灭菌 25 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

利用该株中度嗜盐菌菌株发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.307 g/100 g；挥发性盐基氮含量为 7.57 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 2.01 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 5.88。未添加菌株鱼酱的感官评分为 5.49。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少，鲜味明显，与未添加菌株鱼酱相比，风味有显著提升。

实施例 3：

一株中度嗜盐菌菌株花津滩芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 24 h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃ 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 按最终添加量 10^4 CFU/g 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 28℃ 下保温发酵 30 d；将发酵好鱼肉酱置于 -20℃ 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1 min，搅拌结束后静置透气 10 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃ 下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

利用该株中度嗜盐菌菌株发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.639 g/100 g；挥发性盐基氮含量为 24.87 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 3.82 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 6.33。未添加菌株鱼酱的感官评分为 5.67。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少，鲜味明显，与未添加菌株鱼酱相比，风味有显著提升。

实施例 4:

一株中度嗜盐菌菌株花津滩芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 20% (w/w)，在发酵前放置在 4℃ 冰箱内 24h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，

然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 按最终添加量 10^7 CFU/g 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 40 °C 下保温发酵 5 d；将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5 d 内，每隔 1 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 5 min，搅拌结束后静置透气 120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 25 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

利用该株中度嗜盐菌菌株发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.312 g/100 g；挥发性盐基氮含量为 7.80 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 1.98 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 5.93。未添加菌株鱼酱的感官评分为 5.48。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少，鲜味明显，与未添加菌株鱼酱相比，风味有显著提升。

实施例 5:

一种利用中度嗜盐菌菌株沉泥喜盐芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 24 h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌菌种 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 按最终添加量 10^4 CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 28 °C 下保温发酵 30 d；将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1 min，搅拌结束后静置透气 10 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120°C 下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

利用该株中度嗜盐菌菌株发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.647 g/100 g；挥发性盐基氮含量为 24.82 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 3.81 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 6.32。未添加菌株鱼酱的感官评分为 5.66。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少，鲜味明显，与未添加菌株鱼酱相比，风味有显著提升。

实施例 6:

一种利用中度嗜盐菌菌株沉泥喜盐芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 24h。

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌菌种 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 接种在培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4°C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 10^5 ~ 10^6 CFU/mL，将菌液于 4°C 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 按最终添加量 10^7 CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 40 °C 下保温发酵 5 d；将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5 d 内，每隔 1 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 5 min，搅拌结束后静置透气 120 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 40 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120°C 下二次灭菌 25 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

利用该株中度嗜盐菌菌株发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.314 g/100 g；挥发性盐基氮含量为 7.63 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 2.11 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 5.94。未添加菌株鱼酱的感官评分为 5.53。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少，鲜味明显，与未添加菌株鱼酱相比，风味有显著提升。

实施例 7：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 12% (m/m)，在发酵前放置在 4°C 冰箱内 24 h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4°C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4°C 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 2:1:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^4 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 2:1:1 和最终添加量 10^4 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 40℃下保温发酵 5d；将发酵好的置于 -20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.311 g/100 g；挥发性盐基氮含量为 7.54 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 1.69 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 5.79。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味大大减少，略有腥味，鲜味略显不足，与未发酵原料相比，风味有显著提升。

实施例 8：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 12% (m/m)，在发酵前放置在 4℃冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 1:1:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^6 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 1:1:1 和最终添加量 10^6 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 37℃下保温发酵 15d；将发酵好的置于-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.519 g/100g；挥发性盐基氮含量为 23.86 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 2.17 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 7.20。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味几乎没有，无不良气味，滋味鲜美，氨基酸态氮含量较高，营养价值较为丰富，安全性也较高。

实施例 9：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 14% (m/m)，在发酵前放置在 4℃冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 1:1:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^5 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 1:1:1 和最终添加量 10^5 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 31℃下保温发酵 15d；将发酵好的置于-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.476 g/100g；挥发性盐基氮含量为 20.11mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 1.92 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 6.62。本鱼肉酱中鱼原料中固有的土腥味几乎没有，无不良气味，滋味鲜美，氨基酸态氮含量较高，营养价值较为丰富，安全性较高。

实施例 10：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 20% (m/m)，在发酵前放置在 4℃冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 3:1:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^7 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 3:1:1 和最终添加量 10^7 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 40℃下保温发酵 30d；将发酵好的置于-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.621 g/100g；挥发性盐基氮含量为 39.81 mg/100 g，高于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 6.98 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 5.87。本鱼肉酱中几乎没有原料中固有的土腥味几乎没有，有不良气味产生，鱼酱有明显的氨味。

实施例 11：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5% (m/m)，在发酵前放置在 4℃冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 2:2:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^6 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 2:2:1 和最终添加量 10^6 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 28℃下保温发酵 5d；将发酵好的置于

-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃ 下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.362 g/100g；挥发性盐基氮含量为 6.49mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 1.13 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 6.11。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味较少，略有不良风味。

实施例 12：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 16% (m/m)，在发酵前放置在 4℃ 冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ 菌株，将菌液于 4℃ 保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 2:1:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^6 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 2:1:1 和最终添加量 10^6 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 31℃ 下保温发酵 20d；将发酵好的置

于-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.501 g/100g；挥发性盐基氮含量为 23.17 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 2.48 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 6.94。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味几乎没有，鲜味突出，滋味鲜美，偏咸，氨基酸态氮含量高，营养价值丰富，安全性高。

实施例 13：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 20% (m/m)，在发酵前放置在 4℃冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 2:2:1 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^5 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 2:2:1 和最终添加量 10^5 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 34℃下保温发酵 10d；将发酵好的置

于-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.287 g/100g；挥发性盐基氮含量为 16.23 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 1.88 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 5.97。本鱼肉酱中原料中固有的土腥味减少，腥味相对明显但安全性较高。

实施例 14：

一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 10% (m/m)，在发酵前放置在 4℃冰箱内 24h。

(2) 混合菌株的制备：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养，重复操作三次。将培养的菌种菌液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中。最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4℃保存，并于 24 h 内使用。

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 1:1:3 进行混合制备成混合发酵剂，再按最终添加量 10^4 CFU/g 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可；或 3 株菌株分别加入到原料鱼中，最终菌数符合添加比例 1:1:3 和最终添加量 10^6 CFU/g 亦可；

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤(3)得到的混合物料在温度 34℃下保温发酵 15d；将发酵好的置

于-20℃冰箱中备用。

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 2 min，搅拌结束后静置透气 30 s。

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20 min 至鱼肉酱熟透。

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120℃下二次灭菌 15 min，即得鱼肉酱成品。

(8) 产品发酵理化指标的评价：氨基酸态氮含量评价，方法参照 GB5009.235-2016 酸度计法。挥发性盐基氮含量评价，方法参照 GB5009.228-2016 微量扩散法。组胺含量的测定，方法参照 GB5009.208-2016 分光光度法。

(9) 感官评定：由 10 人组成感官评定小组，评定前需对小组成员进行风味培训。评分包括 0~9 十个分数，对鱼肉酱的鱼味、腥味、发酵味、氨味、鲜味、咸味、甜味和苦涩味进行整体风味的综合评分。

(10) 鱼肉酱的理化指标和感官评价

本工艺发酵鱼肉酱的氨基酸态的含量为 0.549 g/100g；挥发性盐基氮含量为 21.90 mg/100 g，低于欧盟标准 35 mg/100 g；组胺含量为 1.97 mg/100 g，远低于食品安全国家标准鱼类中组胺的含量 20 mg/100 g；感官评价的综合得分为 6.34。本鱼肉酱中几乎没有原料中固有的土腥味，发酵味明显，鲜味较足，氨基酸态氮含量多，营养价值较高，安全性高。

权利要求书

1、中度嗜盐菌菌株海水芽孢杆菌，其保藏编号为 CGMCC NO.16541，建议的分类命名：海水芽孢杆菌 *Bacillus aquimaris*。

2、利用权利要求 1 所述的一种利用中度嗜盐菌菌株海水芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5~20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h；

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 接种在培养基上活化培养，重复操作三次；将培养的菌种菌液于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min，然后用无菌生理盐水洗涤两次，再悬浮于无菌生理盐水中；最后将菌液浓度调整到 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL，将菌液于 4 °C 保存，并于 24 h 内使用；

(3) 发酵剂的添加：将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus aquimaris* CGMCC 16541 按最终添加量 ($10^4 \sim 10^7$ CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中，使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵：把步骤 (3) 得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30 d；将发酵好鱼肉酱置于 -20 °C 冰箱中备用；

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气：在鱼酱发酵的 5~30 d 内，每隔 1~5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min，搅拌结束后静置透气 10~120 s；

(6) 鱼肉酱熟制：将步骤 (4) 得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透；

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤 (6) 熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120 °C 下二次灭菌 15~20 min，即得鱼肉酱成品。

3、中度嗜盐菌菌株，其保藏编号为 CGMCC NO.16542，建议的分类命名：花津滩芽孢杆菌 *Bacillus hwajinpoensis*。

4、一种利用权利要求 3 所述的一种利用中度嗜盐菌菌株花津滩芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法，其特征在于按照下述步骤进行：

(1) 原料的处理：碎鱼肉利用斩拌机斩断，加入腌制海盐 5~20% (w/w)，在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h；

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备：将中度嗜盐菌 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542

接种在培养基上活化培养,重复操作三次;将培养的菌种菌液于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min,然后用无菌生理盐水洗涤两次,再悬浮于无菌生理盐水中;最后将菌液浓度调整到 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL,将菌液于 4 °C 保存,并于 24 h 内使用;

(3) 发酵剂的添加:将中度嗜盐菌菌种 *Bacillus hwajinpoensis* CGMCC 16542 按最终添加量 ($10^4\sim 10^7$ CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中,使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵:把步骤(3)得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30 d;将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用;

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气:在鱼酱发酵的 5~30 d 内,每隔 1~5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min,搅拌结束后静置透气 10~120 s;

(6) 鱼肉酱熟制:将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透;

(7) 鱼肉酱灭菌:将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封,在 120°C 下二次灭菌 15~20 min,即得鱼肉酱成品。

5、中度嗜盐菌菌株,其保藏编号为 CGMCC NO.16543,建议的分类命名: 污泥喜盐芽孢杆菌 *Halobacillus faecis*。

6、一种利用权利要求 5 所述的中度嗜盐菌菌株污泥喜盐芽孢杆菌发酵鱼肉酱的方法,其特征在于按照下述步骤进行:

(1) 原料的处理:碎鱼肉利用斩拌机斩断,加入腌制海盐 5~20% (w/w),在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h;

(2) 中度嗜盐菌菌株的制备:将中度嗜盐菌 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 接种在培养基上活化培养,重复操作三次;将培养的菌种菌液于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min,然后用无菌生理盐水洗涤两次,再悬浮于无菌生理盐水中;最后将菌液浓度调整到 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL,将菌液于 4 °C 保存,并于 24 h 内使用;

(3) 发酵剂的添加:将中度嗜盐菌菌种 *Halobacillus faecis* CGMCC 16543 按最终添加量 ($10^4\sim 10^7$ CFU/g) 混入到预处理过的原料鱼中,使最终菌数达到添加要求即可

(4) 鱼肉酱发酵:把步骤(3)得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30

d; 将发酵好鱼肉酱置于-20 冰箱中备用;

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气: 在鱼酱发酵的 5~30 d 内, 每隔 1~5 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1~5 min, 搅拌结束后静置透气 10~120 s;

(6) 鱼肉酱熟制: 将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20~40 min 至鱼肉酱熟透;

(7) 鱼肉酱灭菌: 将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封, 在 120°C 下二次灭菌 15~20 min, 即得鱼肉酱成品。

7、一种利用中度嗜盐菌混合菌株发酵的方法, 其特征在于按照下述步骤进行:

(1) 原料的处理: 碎鱼肉利用斩拌机斩断, 加入腌制海盐 5~20% (w/w), 在发酵前放置在 4 °C 冰箱内 5~24 h;

(2) 混合菌株的制备: 将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 分别接种在不同的培养基上活化培养, 重复操作三次; 将培养的菌种菌液于 4°C、10000 r/min 离心 10 min, 然后用无菌生理盐水洗涤两次, 再悬浮于无菌生理盐水中; 最后将菌液浓度调整到 10^5 - 10^6 CFU/mL, 将菌液于 4°C 保存, 并于 24 h 内使用;

(3) 发酵剂的添加: 将中度嗜盐菌混合菌种 *Halobacillus faecis*、*Bacillus aquimaris* 和 *Bacillus hwajinpoensis* 菌株按菌数比例 (1~3): (1~3): (1~3) 进行混合制备成混合发酵剂, 再按最终添加量 (10^4 ~ 10^7 CFU/g) 将混合发酵剂混入到预处理过的原料鱼中, 使最终菌数达到添加要求即可; 或 3 株菌株分别加入到原料鱼中, 最终菌数符合添加比例 (1~3): (1~3): (1~3) 和最终添加量 (10^4 ~ 10^7 CFU/g) 亦可;

(4) 鱼肉酱发酵: 把步骤(3)得到的混合物料在温度 28~40 °C 下保温发酵 5~30 d; 将发酵好的置于-20 冰箱中备用;

(5) 鱼肉酱发酵过程中的搅拌与透气: 在鱼酱发酵的 5~30 d 内, 每隔 2~30 d 在无菌条件下对发酵鱼酱进行顺时针的搅拌 1-5 min, 搅拌结束后静置透气 10-120 s;

(6) 鱼肉酱熟制: 将步骤(4)得到的鱼肉酱利用水蒸气在蒸屉中蒸 20-40 min

至鱼肉酱熟透；

(7) 鱼肉酱灭菌：将步骤(6)熟制的鱼肉酱灌装密封，在 120°C 下二次灭菌 15-20 min，即得鱼肉酱成品。

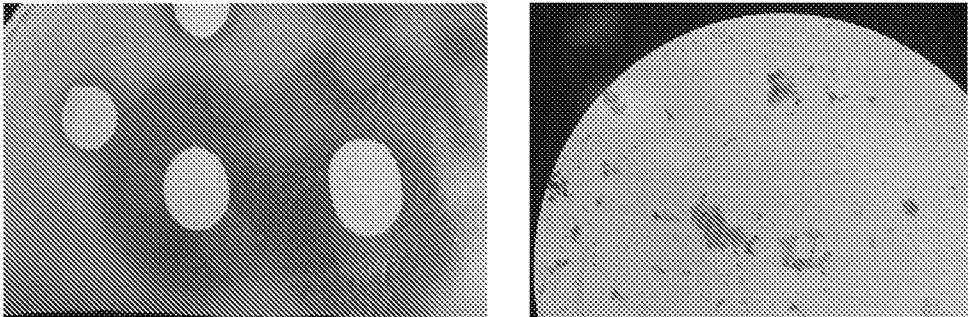


图 1

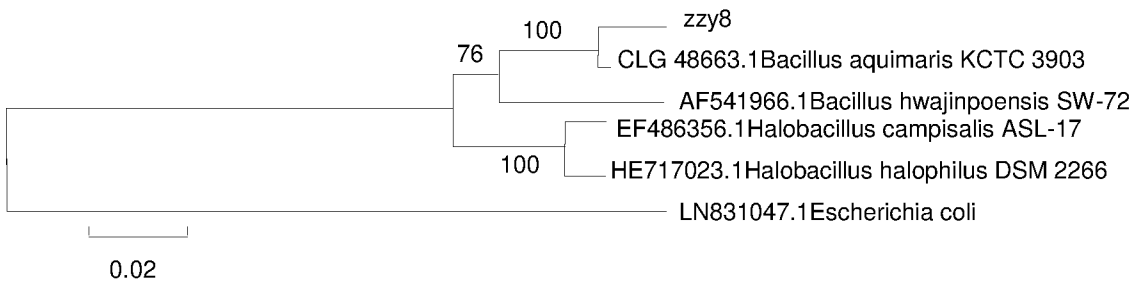


图 2

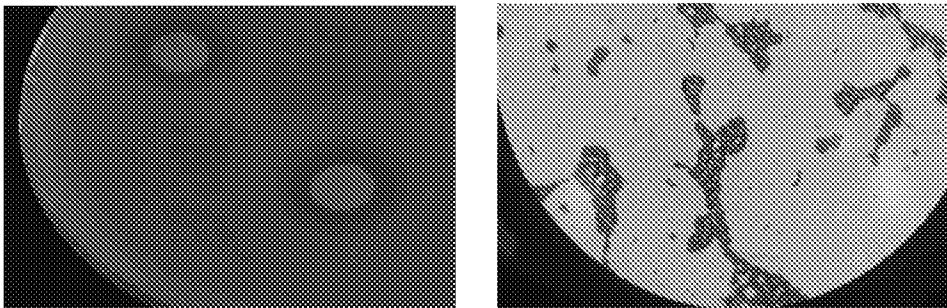


图 3

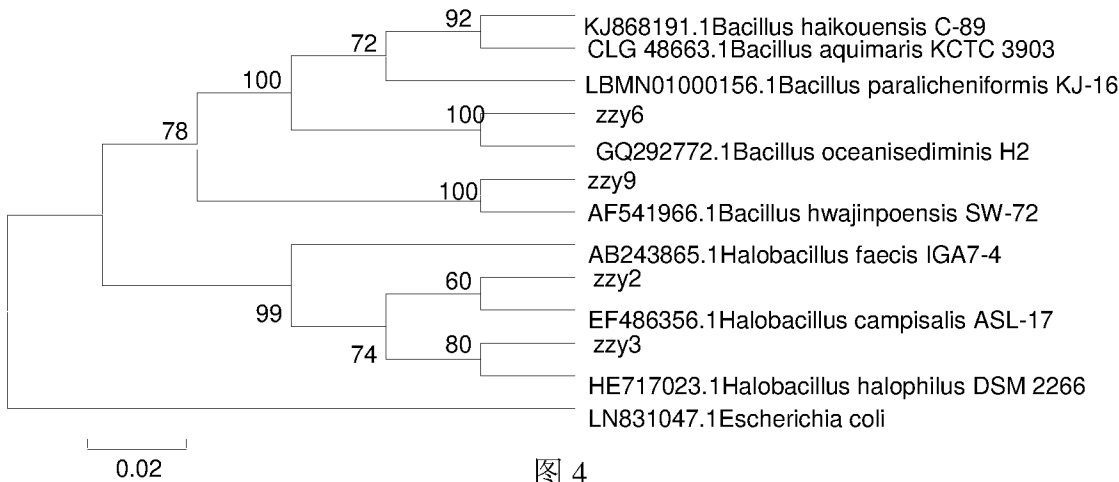


图 4

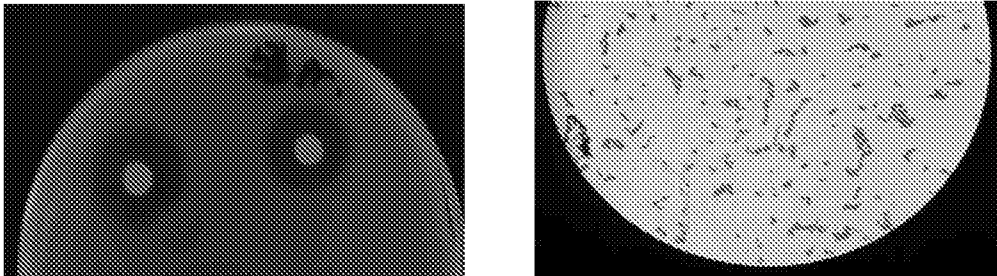


图 5

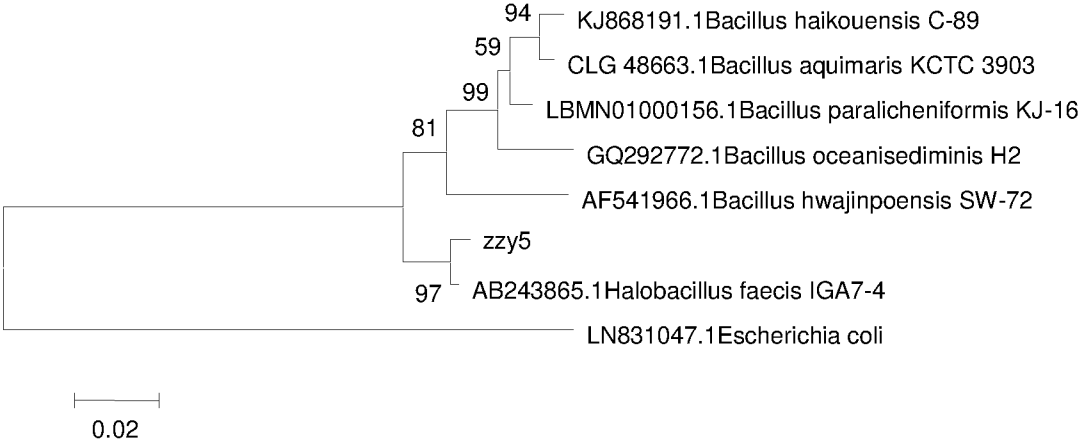


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/080282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 17/00(2016.01)i; C12R 1/07(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A23L; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; CNKI; USTXT; EPTXT; WOTXT; NCBI; EBI; VEN; ISI web of knowledge; 中国专利生物序列检索系统; China Patents Biological Sequence Search System: 中度嗜盐菌, 海水芽孢杆菌, CGMCC NO.16541, 化津滩芽孢杆菌, CGMCC NO.16542, 沉泥喜盐芽孢杆菌, CGMCC NO.16543, 鱼肉酱, 鱼酱, 发酵, moderate halophilic bacteria, halophil, halophile, Bacillus aquimaris, Bacillus hwajinpoensis, Halobacillus faecis, fish sauce, ferment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103740605 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 23 April 2014 (2014-04-23) description, paragraphs [0004]-[0006]	1-7
A	CN 106085925 A (XINJIANG SHANCHUANXIULI BIOLOGICAL CO., LTD.) 09 November 2016 (2016-11-09) entire document	1-7
A	CN 103966146 A (SICHUAN UNIVERSITY) 06 August 2014 (2014-08-06) entire document	1-7
A	JPH 02156895 A (SUMITOMO HEAVY INDUSTRIES) 15 June 1990 (1990-06-15) entire document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2019

Date of mailing of the international search report

02 August 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/080282

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103740605	A	23 April 2014	CN	103740605	B	18 January 2017
CN	106085925	A	09 November 2016	CN	106085925	B	26 March 2019
CN	103966146	A	06 August 2014	CN	103966146	B	30 March 2016
JPH	02156895	A	15 June 1990	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/080282

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 17/00(2016.01)i; C12R 1/07(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A23L; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;CNKI;USTXT;EPTXT;WOTXT;NCBI;EBI;VEN;ISI web of knowledge;中国专利生物序列检索系统: 中度嗜盐菌, 海水芽孢杆菌, CGMCC NO.16541, 化津滩芽孢杆菌, CGMCC NO.16542, 沉泥喜盐芽孢杆菌, CGMCC NO.16543, 鱼肉酱, 鱼酱, 发酵, moderate halophilic bacteria, halophil, halophile, Bacillus aquimaris, Bacillus hwa-jinpoensis, Halobacillus faecis, fish sauce, ferment

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103740605 A (华南理工大学) 2014年 4月 23日 (2014 - 04 - 23) 说明书第[0004]-[0006]段	1-7
A	CN 106085925 A (新疆山川秀丽生物有限公司) 2016年 11月 9日 (2016 - 11 - 09) 全文	1-7
A	CN 103966146 A (四川大学) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 全文	1-7
A	JPH 02156895 A (SUMITOMO HEAVY INDUSTRIES) 1990年 6月 15日 (1990 - 06 - 15) 全文	1-7

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 6月 14日

国际检索报告邮寄日期

2019年 8月 2日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

王光新

电话号码 (86-512) 88996448

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/080282

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	103740605	A	2014年 4月 23日	CN 103740605 B	2017年 1月 18日
CN	106085925	A	2016年 11月 9日	CN 106085925 B	2019年 3月 26日
CN	103966146	A	2014年 8月 6日	CN 103966146 B	2016年 3月 30日
JPH	02156895	A	1990年 6月 15日	无	