



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114891701 B

(45) 授权公告日 2023.07.25

(21) 申请号 202210712999.7

(22) 申请日 2022.06.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114891701 A

(43) 申请公布日 2022.08.12

(83) 生物保藏信息
GDMCC No:62410 2022.04.24

(73) 专利权人 浙江省农业科学院
地址 310021 浙江省杭州市德胜中路298号

(72) 发明人 李欢欢 陈黎洪 唐宏刚 赵珂
张晋

(74) 专利代理机构 杭州星隆专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33441
专利代理师 刘星海

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

A23L 13/40 (2023.01)

A23L 13/60 (2016.01)

A23L 13/75 (2023.01)

C12R 1/44 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101979500 A, 2011.02.23

审查员 艾超仁

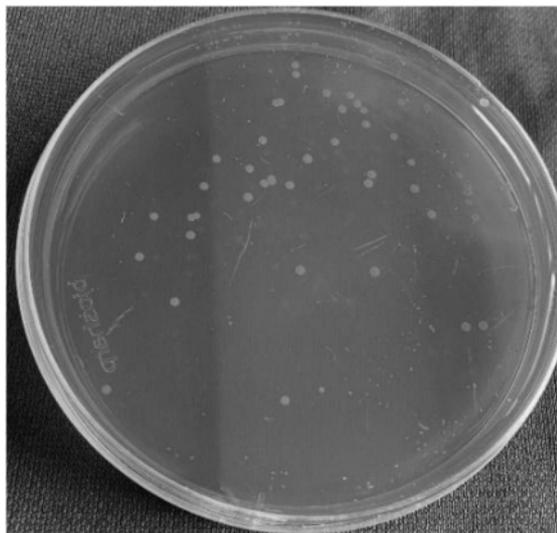
权利要求书2页 说明书20页
序列表1页 附图7页

(54) 发明名称

一株模仿葡萄球菌HZ01、菌剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物食品发酵技术领域,具体公开了一株模仿葡萄球菌HZ01、菌剂及其应用,所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏编号为,GDMCC NO.62410;所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏单位为,广东省微生物菌种保藏中心;所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏名称为,Staphylococcus simulans HZ01;所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏时间为2022年4月24日。本发明具有加工适应性较好、蛋白酶和脂肪酶活性均较高、硝酸还原酶活性较好及发酵出的肉制品风味较佳的特点。



1. 一株模仿葡萄球菌 (*Staphylococcus simulans*) HZ01, 其特征是: 所述模仿葡萄球菌 HZ01 的保藏编号为, GDMCC NO. 62410; 所述模仿葡萄球菌 HZ01 的保藏单位为, 广东省微生物菌种保藏中心; 所述模仿葡萄球菌 HZ01 的保藏名称为, *Staphylococcus simulans* HZ01; 所述模仿葡萄球菌 HZ01 的保藏时间为 2022 年 4 月 24 日。

2. 模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂, 其特征是: 所述模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂采用权利要求 1 中的模仿葡萄球菌 HZ01 制得;

所述模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂的制备包括以下步骤,

(A) 将模仿葡萄球菌 HZ01 接种到 NB 培养基中培养, 制得菌液;

(B) 待步骤 (A) 制得菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $1.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 9.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心;

(C) 待离心完成后加入灭菌脱脂牛奶重悬;

(D) 待重悬完成后进行冷冻干燥, 即制得浓度为 $1.0 \times 10^{10} \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^{11} \log_{10} \text{CFU/g}$ 的粉末状模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂。

3. 根据权利要求 1 所述的模仿葡萄球菌 HZ01 在降解肌浆蛋白质中的应用。

4. 根据权利要求 3 所述的模仿葡萄球菌 HZ01 在降解肌浆蛋白质中的应用, 其特征是: 模仿葡萄球菌 HZ01 对肌浆蛋白质的降解结果检测包括以下步骤;

(S01) 提取肌浆蛋白质, 并采用 Lowry 蛋白浓度试剂盒测定肌浆蛋白质的浓度;

(S02) 取步骤 (S01) 中的肌浆蛋白质、葡萄糖和模仿葡萄球菌 HZ01 菌液共同孵育;

(S03) 待孵育完成后将菌液离心;

(S04) 取 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液与步骤 (S03) 离心后的上清液混合, 并水浴;

(S05) 取 10%-12% 的 Bio-Rad 预制胶肌浆蛋白和标准蛋白, 并在 10%-12% 的 Bio-Rad 预制胶肌浆蛋白和标准蛋白上分别上步骤 (S04) 中的样品;

(S06) 上样后进行电泳;

(S07) 待电泳完成后用考马斯亮蓝 R-250 进行染色, 通过染色结果得出模仿葡萄球菌 HZ01 对肌浆蛋白质的降解结果;

所述肌浆蛋白质的提取包括以下步骤,

(S011) 取猪肉与 PB 缓冲液混合并匀浆;

(S012) 将步骤 (S011) 匀浆后的上清液通过滤膜过滤并除菌后, 即得肌浆蛋白质。

5. 根据权利要求 1 所述的模仿葡萄球菌 HZ01 在将硝酸盐还原为亚硝酸盐时的应用。

6. 根据权利要求 5 所述的模仿葡萄球菌 HZ01 在将硝酸盐还原为亚硝酸盐时的应用, 其特征是: 对亚硝酸盐的浓度检测包括以下步骤,

(i) 配制含适量浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的 NB 培养基;

(ii) 将模仿葡萄球菌 HZ01 菌液接种至步骤 (i) 中的 NB 培养基中培养;

(iii) 在培养过程中间隔取发酵液离心并收集上清液;

(iv) 检测步骤 (iii) 上清液中的亚硝酸盐含量;

所述步骤 (iv) 对上清液中亚硝酸盐的含量检测包括以下步骤,

(iv 01) 取适量上清液置于比色管中;

(iv 02) 在步骤 (iv 01) 的比色管中加入适量对氨基苯磺酸溶液, 混匀后静置;

(iv 03) 在步骤 (iv 02) 静置后的溶液中加入适量盐酸萘乙二胺溶液;

(iv 04) 将步骤(iv 03)中的溶液加水至比色管刻度后,混匀和静置;

(iv 05) 测定步骤(iv 04)中溶液的吸光度。

7. 根据权利要求1所述的模仿葡萄球菌HZ01在干腌发酵肉制品中的应用。

8. 根据权利要求7所述的模仿葡萄球菌HZ01在干腌发酵肉制品中的应用,其特征是:所述干腌发酵肉制品的制备包括以下步骤,

(一) 取模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液或粉剂,使用食用水稀释;

(二) 取适量份的食盐、白糖和谷氨酸钠溶解于步骤(一)中的溶液中,制成腌制液;

(三) 取肉糜,将步骤(二)中的腌制液加入肉糜中,待肉糜中模仿葡萄球菌HZ01的浓度达到 $1.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 时,对肉糜进行低温腌制;

(四) 待腌制完成后将肉糜依次进行灌肠、排气、烘制和发酵,即得干腌发酵肉制品成品。

一株模仿葡萄球菌HZ01、菌剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物食品发酵技术领域,特别涉及一株模仿葡萄球菌HZ01、菌剂及其应用。

背景技术

[0002] 目前被广泛用于发酵肉制品中的微生物发酵剂主要是乳酸菌和凝固酶阴性葡萄球菌 (Coagulase-negative staphylococci, CNS), 其中乳酸菌负责发酵初期肉的酸化, 通过产生乳酸使原料肉的pH值降低和蛋白质凝固, 硬度提升, 此外乳酸菌还可以抑制有害菌的生长从而提升发酵肉制品的微生物安全。CNS对发酵肉制品的风味形成、色泽稳定具有重要作用。研究表明, 在发酵肉制品风味形成过程中起重要作用的是葡萄球菌, 而不是乳酸菌。CNS可以将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 然后还原成一氧化二氮, 可以通过过氧化物分解防止酸败, 以及可以通过蛋白质水解和脂肪水解产生风味和芳香化合物, 这些功能在发酵肉制品品质特性的形成中起着重要作用, 被认为是发酵肉制品重要的“风味菌”。发酵肉制品中CNS具有丰富的种群多样性, 如木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosum*)、腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*)、马胃葡萄球菌 (*S. equorum*) 和肉葡萄球菌 (*S. carnosus*) 是欧洲传统发酵香肠中最具优势的种类, 而木糖葡萄球菌 (*S. xylosum*)、腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)、松鼠葡萄球菌 (*S. sciuri*) 和模仿葡萄球菌 (*S. simulans*) 等在中式发酵肉制品中更具有优势。意大利法律允许木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosum*)、肉葡萄球菌 (*S. carnosus*) 和模仿葡萄球菌 (*S. simulans*) 作为发酵香肠生产的发酵剂 (Repubblica Italiana, 1995), 我国于2016年将小牛葡萄球菌 (*S. vitulinus*)、木糖葡萄球菌 (*S. xylosum*) 和肉葡萄球菌 (*S. carnosus*) 列入《可用于食品的菌种名单》(食品安全标准与监控评估司, 中国, 2016年第4号)。

[0003] *S. xylosum*和*S. carnosus*是目前工业上使用最普遍的两种CNS商业发酵剂。然而, 商业发酵剂在跟本地微生物种群竞争的过程中不能总是保持优势, 这导致了发酵肉制品理想感官特性的丧失, 因此从本地微生物种群中筛选合适的发酵剂能更好的适应本地肉制品加工环境, 并且由于其特有的代谢能力而更具有竞争力。研究表明*S. simulans*是中式发酵肉制品中具有优良发酵性能的优势CNS种群之一。

发明内容

[0004] 本发明为了解决现有本地微生物种群在食品发酵过程中所存在的上述技术问题, 提供了一株模仿葡萄球菌HZ01、菌剂及其应用, 它具有加工适应性较好、蛋白酶和脂肪酶活性均较高、硝酸还原酶活性较好及发酵出的肉制品风味较佳的特点。

[0005] 本发明的第一种技术方案: 一株模仿葡萄球菌HZ01, 所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏编号为, GDMCC NO.62410; 所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏单位为, 广东省微生物菌种保藏中心; 所述模仿葡萄球菌HZ01 保藏单位的地址为, 广州市先烈中路100号大院59号楼5楼; 所述模仿葡萄球菌HZ01的保藏名称为, *Staphylococcus simulans* HZ01; 所述模仿葡萄球菌

HZ01的保藏时间为2022年4月24日。本发明中的模仿葡萄球菌HZ01代谢能力强,作为发酵剂使用时能跟本地微生物种群在竞争的过程中保持优势,具有很强的竞争力,使得发酵出的肉制品感官特性较为理想,能更好的适应本地肉制品的加工环境;本发明中的模仿葡萄球菌HZ01具有良好的蛋白酶活性,具有分解肌浆蛋白的能力,在72小时内可降解58.1%的肌浆蛋白质条带,且显著减少41.9%的肌浆蛋白质条带;本发明的模仿葡萄球菌HZ01具有良好的硝酸还原酶活性,在应用过程中能高效将硝酸盐还原成亚硝酸盐,利用发酵肉制品中的硝酸盐,从而减少了肉制品加工过程中亚硝酸盐的用量;本发明的模仿葡萄球菌HZ01可以代谢亮氨酸产3-甲基丁醛,增加挥发性风味物质种类及含量,产香性状优良;本发明的模仿葡萄球菌HZ01可以显著提高发酵肉制品中的酯类、醛类和酸类物质,其中乙酸乙酯、丁酸甲酯、己酸甲酯、正己醛、乙酸和异戊酸提高最显著,可显著提高发酵肉制品质量。

[0006] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01的基因登录号为OM758216,具体核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。根据模仿葡萄球菌HZ01的核苷酸序列得知,本发明中的模仿葡萄球菌HZ01是在进化过程中形成的独立进化分支,是模仿葡萄球菌的一个新菌株。

[0007] 作为优选,模仿葡萄球菌HZ01基因序列的测定包括以下步骤,

[0008] (a)采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取模仿葡萄球菌HZ01的总DNA;

[0009] (b)使用PCR反应体系对步骤(a)中提取到的总DNA进行16s全长扩增;

[0010] (c)待16s全长扩增完成后进行切胶纯化,并进行电泳测序,测得的序列即为模仿葡萄球菌HZ01的16sDNA全长序列。本发明采用细菌基因组DNA提取试剂盒来提取模仿葡萄球菌HZ01的总DNA,提取快速、便捷,稳定性和提取的纯度均较好;PCR反应体系能快速将提取到模仿葡萄球菌HZ01总DNA增加;对16s全长扩增序列完成进行切胶纯化,是为了后面更方便、准确的电泳测序,保证最终测得模仿葡萄球菌HZ01的16sDNA全长序列的准确性。

[0011] 作为优选,所述PCR反应体系包括10×ExTaqbuffer2μL,2.5mM dNTP Mix 1.6μL,5pPrimer10.6 μL,5pPrimer20.6μL,Template2μL,5uExTaq1μL,ddH₂O12.2μL。各组份协同作用,能快速将提取到的模仿葡萄球菌HZ01总DNA增加。

[0012] 作为优选,所述PCR反应体系的用量为15μL~25μL。更优选,所述PCR反应体系的用量为18μL~22μL。根据待扩增模仿葡萄球菌HZ01的总DNA选用,兼顾模仿葡萄球菌HZ01的总DNA扩增的充分性和用量的合适性。

[0013] 作为优选,所述PCR反应体系中的16s全长扩增包括以下步骤,

[0014] (b01)将步骤(a)中提取到的总DNA在PCR反应体系中于95℃的温度条件下反应5min;

[0015] (b02)待步骤(b01)完成后,继续在95℃的温度条件下反应30s;

[0016] (b03)待步骤(b02)完成后,继续在55℃的温度条件下反应30s;

[0017] (b04)待步骤(b03)完成后,继续在72℃的温度条件下反应1min;

[0018] (b05)重复步骤(b02)~步骤(b04)24次;

[0019] (b06)待步骤(b05)完成后,在72℃的温度条件延伸10min;

[0020] (b07)待步骤(b06)完成后,在10℃的温度条件保温,即完成模仿葡萄球菌HZ01总DNA的16s全长扩增。具体温度和时间的严格限定,是为了保证对模仿葡萄球菌HZ01总DNA16s全长扩增的完全性,兼顾了扩增的完全性和时效性。

[0021] 本发明的第二种技术方案:模仿葡萄球菌HZ01菌剂,所述模仿葡萄球菌HZ01菌剂

采用模仿葡萄球菌 HZ01 制得。将模仿葡萄球菌 HZ01 制备为菌剂的形态,更方便在日常生产和生活中的使用。

[0022] 作为优选,所述模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂的制备包括以下步骤,

[0023] (A) 将模仿葡萄球菌 HZ01 接种到 NB 培养基中培养,制得菌液;

[0024] (B) 待步骤(A) 制得菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $1.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 9.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心;

[0025] (C) 待离心完成后加入灭菌脱脂牛奶重悬;

[0026] (D) 待重悬完成后进行冷冻干燥,即制得浓度为 $1.0 \times 10^{10} \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^{11} \log_{10} \text{CFU/g}$ 的粉末状模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂。NB 培养基对模仿葡萄球菌 HZ01 的培养效果较好;当菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $1.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 9.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心是因为,限定浓度时的模仿葡萄球菌 HZ01 已经具有较高的浓度了,限定区间浓度范围内的模仿葡萄球菌 HZ01 数量也足够了,浓度低的话模仿葡萄球菌 HZ01 的数量就不足了,浓度高的话就需要更多的时间培养;离心为了更好的制备浓缩液;加入灭菌脱脂牛奶重悬是为了对培养后的模仿葡萄球菌 HZ01 进行冷冻保护;冷冻干燥是为了更好的制备固体菌剂;本发明方法制得的粉末状模仿葡萄球菌 HZ01 菌剂浓度较高,性能较好。更优选,待步骤(A) 制得菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $3.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 7.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心。更优选,待步骤(A) 制得菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $5.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 5.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心。更优选,待步骤(A) 制得菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $7.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 3.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心。更优选,待步骤(A) 制得菌液中模仿葡萄球菌 HZ01 的浓度为 $9.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 1.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心。

[0027] 作为优选,所述步骤(A) 中的 NB 培养基包括蛋白胨 10g/L、牛肉浸膏 3.0g/L 和氯化钠 5.0g/L。使得 NB 培养基对模仿葡萄球菌 HZ01 具有更好的培养效果。

[0028] 作为优选,所述步骤(A) 中 NB 培养基的 pH 值为 7~7.4。更优选,所述步骤(A) 中 NB 培养基的 pH 值为 7.1~7.3。对模仿葡萄球菌 HZ01 的培养提供一个适宜的 pH 环境。

[0029] 作为优选,所述步骤(A) 中 NB 培养基的用量为 0.5L~2L。更优选,所述步骤(A) 中 NB 培养基的用量为 1L~1.5L。NB 培养基的用量根据模仿葡萄球菌 HZ01 的量已经达到限定浓度了,可以保证模仿葡萄球菌 HZ01 的良好培养。

[0030] 作为优选,所述步骤(A) 中的培养为静止培养。静止培养能有利于模仿葡萄球菌 HZ01 的良好增殖。

[0031] 作为优选,所述步骤(A) 中的培养时间为 24h~72h。更优选,所述步骤(A) 中的培养时间为 36h~60h。更优选,所述步骤(A) 中的培养时间为 40h~48h。此处对培养时间的限定,是在保证模仿葡萄球菌 HZ01 快速增殖,使其达到平台期。

[0032] 作为优选,所述步骤(A) 中的培养温度为 $15^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$ 。更优选,所述步骤(A) 中的培养温度为 $25^\circ\text{C} \sim 55^\circ\text{C}$ 。更优选,所述步骤(A) 中的培养温度为 $30^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 。更优选,所述步骤(A) 中的培养温度为 $35^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 。此处温度的限定,能更适于对模仿葡萄球菌 HZ01 的培养。

[0033] 作为优选,所述步骤(B) 中的离心转速为 5000rpm/min~20000rpm/min。更优选,所述步骤(B) 中的离心转速为 8000rpm/min~18000rpm/min。更优选,所述步骤(B) 中的离心转

速为10000rpm/min~ 15000rpm/min。合适的离心转速能更高效的使菌体实现固液分离。

[0034] 作为优选,所述步骤(B)中的离心时间为10min~20min。更优选,所述步骤(B)中的离心时间为 12min~18min。对离心时间的限定,能充分实现固液分离。

[0035] 作为优选,所述步骤(B)中的离心温度为2℃~6℃。更优选,所述步骤(B)中的离心温度为3℃~ 5℃。采用低温离心,对离心温度的限定,是为了在离心过程中充分的保证模仿葡萄球菌HZ01的活性。

[0036] 作为优选,所述步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的质量浓度为0.05%*m/v*~0.5%*m/v*。更优选,所述步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的质量浓度为0.1%*m/v*~0.4%*m/v*。更优选,所述步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的质量浓度为 0.2%*m/v*~0.3%*m/v*。限定浓度的灭菌脱脂牛奶,能对培养后的模仿葡萄球菌HZ01充分地冷冻干燥保护。

[0037] 作为优选,所述步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的用量为1ml~5ml。更优选,所述步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的用量为2ml~4ml。对灭菌脱脂牛奶的用量限定,是在充分对培养后的模仿葡萄球菌HZ01进行充分地冷冻干燥保护。

[0038] 作为优选,所述步骤(D)中的冷冻干燥温度为-90℃~-70℃。更优选,所述步骤(D)中的冷冻干燥温度为-85℃~-75℃。更优选,所述步骤(D)中的冷冻干燥温度为-83℃~-78℃。对冷冻干燥温度的限行,是充分快速干燥的同时,又更好的保证了模仿葡萄球菌HZ01菌剂中模仿葡萄球菌HZ01的活性。

[0039] 作为优选,所述步骤(D)中的冷冻干燥时间为24h~72h。更优选,所述步骤(D)中的冷冻干燥时间为36h~60h。更优选,所述步骤(D)中的冷冻干燥时间为40h~50h。对冷冻干燥时间的限定,能充分保证干燥完全。

[0040] 本发明的第三种技术方案:模仿葡萄球菌HZ01在降解肌浆蛋白质中的应用。本发明中的模仿葡萄球菌HZ01具有良好的蛋白酶活性,具有分解肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的能力,在72小时内可降解58.1%的肌浆蛋白质条带,且显著减少41.9%的肌浆蛋白质条带。

[0041] 作为优选,模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白质的降解结果检测包括以下步骤;

[0042] (S01)提取肌浆蛋白质,并采用Lowry蛋白浓度试剂盒测定肌浆蛋白质的浓度;

[0043] (S02)取步骤(S01)中的肌浆蛋白质、葡萄糖和模仿葡萄球菌HZ01菌液共同孵育;

[0044] (S03)待孵育完成后将菌液离心;

[0045] (S04)取2×SDS上样缓冲液与步骤(S03)离心后的上清液混合,并水浴;

[0046] (S05)取10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白和标准蛋白,并在10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白和标准蛋白上分别上步骤(S04)中的样品;

[0047] (S06)上样后进行电泳;

[0048] (S07)待电泳完成后用考马斯亮蓝R-250进行染色,通过染色结果得出模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白质的降解结果。Lowry蛋白浓度试剂盒能对肌浆蛋白质浓度进行快速、准确的测定;葡萄糖的加入为模仿葡萄球菌HZ01生长提供碳源;离心是为了收集蛋白质沉淀,排除无关物质地干扰,从而更好的保证检测结果的准确性;2×SDS上样缓冲液的加入是为了将上清液调整为更好检测的待检测上样样品;水浴是为了使蛋白质二级结构充分展开;10%-12%的Bio-Rad预制胶可以使肌浆蛋白条带充分分离;标准蛋白可以作为参考;电泳能充分保证蛋白质条带的分离;考马斯亮蓝R-250的染色效果较好,能使肌浆蛋白条带充分显色;整个检测方法体现出模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白的良好降解效果。

- [0049] 作为优选,所述肌浆蛋白质的提取包括以下步骤,
- [0050] (S011)取猪肉与PB缓冲液混合并匀浆;
- [0051] (S012)将步骤(S011)匀浆后的上清液通过滤膜过滤并除菌后,即得肌浆蛋白质。PB缓冲液能良好的将猪肉浆液进行分散,便于后续对猪肉浆液的处理和检测;滤膜能良好的除去猪肉浆液中不符合要求的物质,使得制得肌浆蛋白质的纯度达标;除菌操作更好的保证最终制得肌浆蛋白质的品质。
- [0052] 作为优选,所述猪肉为新鲜猪瘦肉。选用新鲜猪瘦肉,能保证最终制得肌浆蛋白质的质量。
- [0053] 作为优选,所述猪肉的用量为1g~10g。更优选,所述猪肉的用量为3g~7g。更优选,所述猪肉的用量为4g~6g。猪肉用量的限定根据需要的肌浆蛋白质用量来限定,根据检测要求来限定。
- [0054] 作为优选,所述PB缓冲液的用量为15mL~50mL。更优选,所述PB缓冲液的用量为20mL~45mL。更优选,所述PB缓冲液的用量为25mL~40mL。更优选,所述PB缓冲液的用量为30mL~35mL。PB缓冲液的用量根据需要分散的猪肉量来限定,能充分的对猪肉进行匀浆和分散。
- [0055] 作为优选,所述PB缓冲液的浓度为0.02mol/L。限定浓度的PB缓冲液能对猪肉进行更好的分散,使得最终制得的肌浆蛋白质符合后续处理要求。
- [0056] 作为优选,所述PB缓冲液的pH为5.8~6.6。更优选,所述PB缓冲液的pH为6.0~6.4。更优选,所述PB缓冲液的pH为6.2~6.3。限定pH值的PB缓冲液能更好的对猪肉浆液进行处理和分散。
- [0057] 作为优选,所述匀浆转速为10000rpm/min~15000rpm/min。作为优选,所述匀浆转速为12000rpm/min~14000rpm/min。限定的匀浆转速能使得猪肉和PB缓冲液混合的更加均匀。
- [0058] 作为优选,所述匀浆时间为15min~30min。更优选,所述匀浆时间为20min~25min。限定的匀浆时间能对猪肉匀浆充分。
- [0059] 作为优选,所述滤膜孔径为0.2 μ m~0.25 μ m。更优选,所述滤膜孔径为0.22 μ m~0.24 μ m。限定的滤膜孔径能对猪肉浆液进行严格过滤,从而保证最终制得肌浆蛋白质的质量。
- [0060] 作为优选,所述葡萄糖为1%葡萄糖。1%葡萄糖能提供模仿葡萄球菌HZ01增殖所需的碳源。
- [0061] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01菌液的用量为0.05mL~0.5mL。更优选,所述模仿葡萄球菌HZ01菌液的用量为0.1mL~0.4mL。更优选,所述模仿葡萄球菌HZ01菌液的用量为0.2mL~0.3mL。模仿葡萄球菌HZ01菌液的用量根据检测要求和肌浆蛋白质的用量来确定,保证对肌浆蛋白质的充分降解。
- [0062] 作为优选,所述孵育时间为24h~72h。更优选,所述孵育时间为36h~60h。更优选,所述孵育时间为40h~50h。孵育时间的限定,是在保证孵育充分降解。
- [0063] 作为优选,所述2 \times SDS上样缓冲液的取用量为150 μ L~250 μ L。更优选,所述2 \times SDS上样缓冲液的取用量为180 μ L~220 μ L。2 \times SDS上样缓冲液的用量限定是能良好的将上清液调整为更好检测的待检测上样样品。

[0064] 作为优选,所述冷冻完成后的上清液取用量为150uL~250uL。更优选,所述冷冻完成后的上清液取用量为180uL~220uL。冷冻完成后的上清液取用量根据后续的检测要求选用。

[0065] 作为优选,所述水浴温度为90℃~98℃。更优选,所述水浴温度为93℃~96℃。水浴温度的限定能更好的使蛋白质二级结构充分展开。

[0066] 作为优选,所述水浴时间为3min~10min。更优选,所述水浴时间为5min~7min。在保证水浴使蛋白质二级结构充分展开的同时,防治蛋白质过分降解,影响结果。

[0067] 作为优选,对10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白的上样量为15μL~25μL;对标准蛋白的上样量为5μL~10μL。更优选,对10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白的上样量为17μL~22μL;对标准蛋白的上样量为7μL~9μL。对具体上样量的限定是根据相应蛋白质的浓度而定的。

[0068] 作为优选,所述电泳电压为110V。110V的电泳电压为标准电压。

[0069] 作为优选,所述电泳时间为60min~120min。更优选,所述电泳时间为70min~110min。更优选,所述电泳时间为80min~100min。对电泳时间的限定,是保证蛋白质条带的充分分离。

[0070] 作为优选,所述染色时间为1h~2h。更优选,所述染色时间为1.2h~1.8h。更优选,所述染色时间为1.4h~1.6h。染色时间的限定是为了保证蛋白质条带充分显色。

[0071] 本发明的第四种技术方案:模仿葡萄球菌HZ01在将硝酸盐还原为亚硝酸盐时的应用。本发明的模仿葡萄球菌HZ01具有良好的硝酸还原酶活性,在应用过程中能将硝酸盐良好的还原成亚硝酸盐,可以利用发酵肉制品中的硝酸盐,从而减少了肉制品加工过程中亚硝酸盐的用量。

[0072] 作为优选,对亚硝酸盐的浓度检测包括以下步骤,

[0073] (i) 配制含适量浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基;

[0074] (ii) 将模仿葡萄球菌HZ01菌液接种至步骤(i)中的NB培养基中培养;

[0075] (iii) 在培养过程中间隔取发酵液离心并收集上清液;

[0076] (iv) 检测步骤(iii)上清液中的亚硝酸盐含量。整个检测过程简单,方便快捷的得出模仿葡萄球菌HZ01将硝酸盐还原为亚硝酸盐的良好还原效果。

[0077] 作为优选,所述步骤(i)为配制0.1% $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基。0.1% $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基对模仿葡萄球菌HZ01的硝酸还原酶活性的体现效果更好。

[0078] 作为优选,所述步骤(i)中含适量浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基配制包括以下步骤,

[0079] (i01) 取适量的 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 和NB营养肉汤溶解于无菌水中;

[0080] (i02) 将步骤(i01)中的混合液灭菌培养后,即得含适量浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基。由 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 、NB营养肉汤和无菌水配制成的含适量浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基能更好的接受模仿葡萄球菌HZ01还原作用,更好的体现出模仿葡萄球菌HZ01将硝酸盐还原为亚硝酸盐的效果。

[0081] 作为优选,所述步骤(i01)中 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的用量为0.02g~0.1g。作为优选,所述步骤(i01)中 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的用量为0.04g~0.08g。 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的用量是为了配制需要浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基的要求来限定。

[0082] 作为优选,所述步骤(i01)中NB营养肉汤的用量为0.7g~1.2g。更优选,所述步骤

(i01)中NB 营养肉汤的用量为0.8g~1.1g。NB营养肉汤的用量是为了配制需要浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基的要求来限定。

[0083] 作为优选,所述步骤(i01)中无菌水的用量为30mL~70mL。更优选,所述步骤(i01)中无菌水的用量为40mL~60mL。更优选,所述步骤(i01)中无菌水的用量为45mL~55mL。无菌水的用量是为了配制需要浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB培养基的要求来限定。

[0084] 作为优选,所述步骤(i02)中的灭菌温度为 $115^\circ\text{C}\sim 130^\circ\text{C}$ 。更优选,所述步骤(i02)中的灭菌温度为 $120^\circ\text{C}\sim 125^\circ\text{C}$ 。灭菌温度的限定,能充分的灭活细菌及其芽孢,从而保证含适量浓度 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的NB 培养基无菌质量。

[0085] 作为优选,所述步骤(i02)中的培养时间为15min~30min。更优选,所述步骤(i02)中的培养时间为20min~25min。对培养时间的限定,能良好保证 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 及其芽孢和NB营养肉汤在无菌水中良好溶解混合。

[0086] 作为优选,所述步骤(ii)模仿葡萄球菌HZ01菌液的接种量为0.05mL~0.2mL。更优选,所述步骤(ii)模仿葡萄球菌HZ01菌液的接种量为0.1mL~0.15mL。模仿葡萄球菌HZ01菌液的接种量根据 KNO_3 的浓度来限定,能保证 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 在被充分还原。

[0087] 作为优选,所述步骤(ii)中的培养温度为 $25^\circ\text{C}\sim 35^\circ\text{C}$ 。更优选,所述步骤(ii)中的培养温度为 $28^\circ\text{C}\sim 32^\circ\text{C}$ 。对培养温度的限定,能更好的促使模仿葡萄球菌HZ01对NB培养基中的 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 进行还原。

[0088] 作为优选,所述步骤(ii)中的培养时间为12h~36h。更优选,所述步骤(ii)中的培养时间为15h~30h。更优选,所述步骤(ii)中的培养时间为20h~25h。对培养时间的限定,能保证模仿葡萄球菌HZ01对NB培养基中的 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 进行充分还原。

[0089] 作为优选,所述步骤(iii)中发酵液的取用量为1mL~5mL。更优选,所述步骤(iii)中发酵液的取用量为2mL~4mL。发酵液的取用量根据检测的要求选择,只要能满足对亚硝酸盐含量的检查需求就行了。

[0090] 作为优选,所述步骤(iii)中取发酵液的时间间隔为2h~6h。更优选,所述步骤(iii)中取发酵液的时间间隔为3h~5h。间隔取发酵液,不同时间模仿葡萄球菌HZ01对 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的还原程度不同,多次取发酵液可以更客观、更准确的得出模仿葡萄球菌HZ01对 $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_3$ 的还原效果。

[0091] 作为优选,所述步骤(iii)中的离心温度为 $2^\circ\text{C}\sim 6^\circ\text{C}$ 。更优选,所述步骤(iii)中的离心温度为 $3^\circ\text{C}\sim 5^\circ\text{C}$ 。对离心温度的低温限定,是为了在离心过程中保证模仿葡萄球菌HZ01的活性安全。

[0092] 作为优选,所述步骤(iii)中的离心转速为5000rpm/min~20000rpm/min。更优选,所述步骤(iii)中的离心转速为10000rpm/min~15000rpm/min。对离心转速的限定,是高效完成固液分离。

[0093] 作为优选,所述步骤(iv)对上清液中亚硝酸盐的含量检测包括以下步骤,

[0094] (iv 01)取适量上清液置于比色管中;

[0095] (iv 02)在步骤(iv 01)的比色管中加入适量对氨基苯磺酸溶液,混匀后静置;

[0096] (iv 03)在步骤(iv 02)静置后的溶液中加入适量盐酸萘乙二胺溶液;

[0097] (iv 04)将步骤(iv 03)中的溶液加水至比色管刻度后,混匀和静置;

[0098] (iv 05)测定步骤(iv 04)中溶液的吸光度。对氨基苯磺酸溶液能与上清液中的亚硝

酸盐发生重氮化反应,为后续的显色反应做好准备;盐酸萘乙二胺溶液的添加能良好的与发生重氮化反应后的物质结合,生成玫瑰红溶液,从而形成良好的亚硝酸盐待测样品;通过对吸光度的测定,能精确且快速的转换得出上清液中亚硝酸盐的含量。

[0099] 作为优选,所述步骤(iv 01)中上清液的用量为0.5mL~1.5mL。更优选,所述步骤(iv 01)中上清液的用量为0.8mL~1.2mL。对上清液的用量要求是根据检测要求来决定的。

[0100] 作为优选,所述步骤(iv 01)中比色管的规格为20mL~30mL。更优选,所述步骤(iv 01)中比色管的规格为25mL。对比色管的规格限定,是为了后续通过定容至刻度后,能准确快速的计算得出样品中的亚硝酸盐含量。

[0101] 作为优选,所述步骤(iv 02)中对氨基苯磺酸溶液的加入量为0.5mL~2mL,所述对氨基苯磺酸溶液的浓度为3g/L~5g/L。更优选,所述步骤(iv 02)中对氨基苯磺酸溶液的加入量为0.1mL~1.5mL,所述对氨基苯磺酸溶液的浓度为3.5g/L~4.5g/L。对氨基苯磺酸溶液的加入量和对氨基苯磺酸溶液的浓度,均根据检测要求和上清液的用量要求来设定的,都是为了更准确且快速的计算得出样品中的亚硝酸盐含量。

[0102] 作为优选,所述步骤(iv 02)中溶液的静置时间为3min~5min。更优选,所述步骤(iv 02)中溶液的静置时间为3.5min~4.5min。对静置时间的限定是为了让发生重氮化反应后的溶液恢复平静,为后续的反应保持更好的状态。

[0103] 作为优选,所述步骤(iv 03)中盐酸萘乙二胺溶液的加入量为0.2mL~1mL,所述盐酸萘乙二胺溶液的浓度为1g/L~5g/L。更优选,所述步骤(iv 03)中盐酸萘乙二胺溶液的加入量为0.5mL~0.8mL,所述盐酸萘乙二胺溶液的浓度为2g/L~4g/L。盐酸萘乙二胺溶液的加入量和盐酸萘乙二胺溶液的浓度均根据检测要求和显色反应的要求来设定,都是为了更准确且快速的计算得出样品中的亚硝酸盐含量。

[0104] 作为优选,所述步骤(iv 04)中的静置时间为10min~20min。更优选,所述步骤(iv 04)中的静置时间为13min~17min。此处对静置时间的限定,是为后续测定吸光度保持良好的状态。

[0105] 作为优选,所述步骤(iv 05)为,使用1cm比色杯,以零管调节比色杯的零点,取适量步骤(iv 04)中的溶液,于波长538nm处测吸光度。对比色杯规格的限定、零点调节和波长设定,都是根据上清液中亚硝酸盐的具体情况要求,为了能更准确且快速的计算得出样品中的亚硝酸盐含量。

[0106] 本发明的第五种技术方案:模仿葡萄球菌HZ01在干腌发酵肉制品中的应用。本发明的模仿葡萄球菌 HZ01可以显著提高发酵肉制品中的酯类、醛类和酸类物质,其中乙酸乙酯、丁酸甲酯、己酸甲酯、正己醛、乙酸和异戊酸提高最显著,可显著提高发酵肉制品质量。

[0107] 作为优选,所述干腌发酵肉制品的制备包括以下步骤,

[0108] (一)取模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液或粉剂,使用食用水稀释;

[0109] (二)取适量份的食盐、白糖和谷氨酸钠溶解于步骤(一)中的溶液中,制成腌制液;

[0110] (三)取肉糜,将步骤(二)中的腌制液加入肉糜中,待肉糜中模仿葡萄球菌HZ01的浓度达到 $1.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 时,对肉糜进行低温腌制;

[0111] (四)待腌制完成后将肉糜依次进行灌肠、排气、烘制和发酵,即得干腌发酵肉制品成品。适量份的食盐、白糖、谷氨酸钠和模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液/粉剂一起制备成腌制

液,使得对肉糜的腌制效果更好,对肉糜腌制之后直接就入味了,无需对后续的肉制品再进行调味;低温腌制能够有效保持模仿葡萄球菌HZ01的活性安全;将腌制完成的肉糜依次进行灌肠、排气、烘制和发酵,经过工艺顺序处理后制成的干腌发酵肉制品成品具有香味,营养丰富,质量也优良;其中经过烘干之后再进一步发酵,烘干之后模仿葡萄球菌HZ01的活性依然存在,并在发酵过程中进一步发挥作用,表明本发明中的模仿葡萄球菌HZ01具有较高的耐热性;经过模仿葡萄球菌HZ01处理后制成的干腌发酵肉制品成品中,酯类、醛类和酸类物质含量显著提高,其中乙酸乙烯酯、丁酸甲酯、己酸甲酯、正己醛、乙酸和异戊酸的提高最显著。

[0112] 作为优选,所述步骤(三)中模仿葡萄球菌HZ01菌剂的浓度为 $3.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g}$ ~ $7.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 。更优选,所述步骤(三)中模仿葡萄球菌HZ01菌剂的浓度为 $5.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g}$ ~ $5.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 。更优选,所述步骤(三)中模仿葡萄球菌HZ01菌剂的浓度为 $7.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g}$ ~ $3.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 。更优选,所述步骤(三)中模仿葡萄球菌HZ01菌剂的浓度为 $9.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g}$ ~ $1.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 。对模仿葡萄球菌HZ01菌剂的浓度限定,是为了与食盐、白糖及谷氨酸钠形成良好的配比,从而能对后续的待处理肉糜更好腌制,能够对肉糜在后续的腌制和发酵过程中发挥更好的作用。

[0113] 作为优选,所述步骤(二)中的腌制液按重量份计包括以下组份,

[0114] 食盐1~5份,白糖3~8份,谷氨酸钠0.2~0.8份,食用水2~5份,适量模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂。限定份数食盐、白糖、谷氨酸钠、食用水和模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂的配比,使得制得的腌制液营养均衡,各组份之间能够相互协同作用,对肉糜的腌制发挥良好的作用,对肉糜腌制之后直接就入味了,无需对后续的肉制品再进行调味。其中还可以根据需要添加适量份的香料。

[0115] 作为优选,所述步骤(二)中的腌制液按重量份计包括以下组份,

[0116] 食盐2~4份,白糖4~7份,谷氨酸钠0.3~0.7份,食用水3~4份,适量模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂。限定份数食盐、白糖、谷氨酸钠、食用水和模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂的配比,使得制得的腌制液营养更为均衡,各组份之间能够相互协同作用,对肉糜的腌制发挥良好的作用,对肉糜腌制之后直接就入味了,无需对后续的肉制品再进行调味。

[0117] 作为优选,所述步骤(二)中的腌制液按重量份计包括以下组份,

[0118] 食盐2~4份,白糖5~6份,谷氨酸钠0.4~0.6份,食用水3~4份,适量模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂。限定份数食盐、白糖、谷氨酸钠、食用水和模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂的配比,使得制得的腌制液营养更为均衡,各组份之间能够相互协同作用,对肉糜的腌制发挥良好的作用,对肉糜腌制之后直接就入味了,无需对后续的肉制品再进行调味。

[0119] 作为优选,所述肉糜中脂肪和瘦肉的质量比为1~3:6~9。更优选,所述肉糜中脂肪和瘦肉的质量比为2:7~8。对肉糜中脂肪和瘦肉的质量比限定,使得最终制得的干腌发酵肉制品成品品质更好。

[0120] 作为优选,所述步骤(三)中的腌制温度为 2°C ~ 6°C 。更优选,所述步骤(三)中的腌制温度为 3°C ~ 5°C 。进行低温腌制,使得在腌制过程中模仿葡萄球菌HZ01始终保持有良好的活性安全。

[0121] 作为优选,所述步骤(三)中的腌制时间为48h~72h。更优选,所述步骤(三)中的腌制时间为55h~65h。对腌制时间的限定,能良好保证对肉糜充分腌制入味。

[0122] 作为优选,所述步骤(四)中的烘制温度为50℃~65℃。更优选,所述步骤(四)中的烘制温度为 55℃~60℃。对烘制温度的限定,在对灌肠进行有效烘干的同时,也不能过于影响到模仿葡萄球菌HZ01 的活性,使得模仿葡萄球菌HZ01在后续的发酵过程中依然能够发挥作用。

[0123] 作为优选,所述步骤(四)中的烘制时间为48h~72h。更优选,所述步骤(四)中的烘制时间为55h~ 65h。对烘制时间的限定,能对灌肠充分烘干。

[0124] 作为优选,所述步骤(四)中的发酵温度为20℃~30℃。更优选,所述步骤(四)中的发酵温度为 23℃~27℃。对发酵温度的限定也是为了保持模仿葡萄球菌HZ01良好的活性考虑的。

[0125] 作为优选,所述步骤(四)中的发酵时间为1周~2周。更优选,所述步骤(四)中的发酵时间为8 天~10天。对发酵时间的限定,能保证模仿葡萄球菌HZ01对烘干后的灌肠更完全发酵。

[0126] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液制备方法为,取纯化并冷藏后的模仿葡萄球菌HZ01单菌落接种于灭菌后NB液体培养基中培养,待NB液体培养基中模仿葡萄球菌HZ01的浓度达到 $1.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 5.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时,即制得浓缩液。制备浓缩液是为了后续更好对腌制液的配制,从而良好的对肉糜进行后续的腌制和发酵过程;其中对浓缩液中模仿葡萄球菌HZ01浓度的限定,均是为了适应后续工序中对肉糜的加工要求,为了最终制得的干腌发酵肉制品成品具有更好的品质。

[0127] 作为优选,所述浓缩液制备过程中的冷藏温度为2℃~6℃。更优选,所述浓缩液制备过程中的冷藏温度为3℃~5℃。对冷藏温度的限定,是为了良好保证模仿葡萄球菌HZ01的活性安全。

[0128] 作为优选,所述浓缩液制备过程中NB液体培养基的用量为40mL~60mL。更优选,所述浓缩液制备过程中NB液体培养基的用量为45mL~55mL。此处NB液体培养基用量的限定是根据待培养的模仿葡萄球菌 HZ01浓度和最终配制的浓缩液量来要求的。

[0129] 作为优选,所述浓缩液制备过程中的培养时间为12h~36h。更优选,所述浓缩液制备过程中的培养时间为15h~35h。更优选,所述浓缩液制备过程中的培养时间为20h~30h。此处对培养时间的限定,是在保证对模仿葡萄球菌HZ01进行良好培养,模仿葡萄球菌HZ01浓度达到平台期。

[0130] 作为优选,所述浓缩液制备过程中的培养温度为25℃~35℃。更优选,所述浓缩液制备过程中的培养温度为28℃~32℃。此处对培养温度的限定,是为了创造一个良好的温度条件,使得模仿葡萄球菌HZ01 在灭菌后NB液体培养基中能够良好培养,使得模仿葡萄球菌HZ01快速达到需要浓度的浓缩液。

[0131] 作为优选,所述浓缩液制备过程中的培养为静止培养。静止培养适宜模仿葡萄球菌HZ01的生长特性。

[0132] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受pH为4~8。更优选,所述模仿葡萄球菌HZ01 在发酵过程中的耐受pH为5~7。模仿葡萄球菌HZ01能在酸性、中性和碱性条件下进行生长,模仿葡萄球菌HZ01的耐酸碱性效果较好、范围较广。

[0133] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受亚硝酸盐量为0~150mg/kg。更优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受亚硝酸盐量为50mg/kg~100mg/kg。

kg。模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受亚硝酸盐含量范围较宽,从而可以在发酵过程中根据实际需要较大范围的添加亚硝酸盐的用量。

[0134] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐盐量为3%~12%。更优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐盐量为5%~10%。更优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐盐量为6%~8%。模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐盐量范围较宽,从而可以在发酵过程中根据实际需要较大范围的添加用盐量。

[0135] 作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受温度为20℃~40℃。作为优选,所述模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受温度为25℃~35℃。模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受温度范围较宽,从而可以在发酵过程中根据实际需要较大温度范围内进行调节。

[0136] 本发明具有如下有益效果:

[0137] (1) 模仿葡萄球菌HZ01代谢能力强,作为发酵剂使用时能跟本地微生物种群在竞争的过程中保持优势,具有很强的竞争力,使得发酵出的肉制品感官特性较为理想,能更好的适应本地肉制品的加工环境;

[0138] (2) 模仿葡萄球菌HZ01具有良好的蛋白酶活性,具有分解肌浆蛋白的能力,在72小时内可降解58.1%的肌浆蛋白质条带,且显著减少41.9%的肌浆蛋白质条带;

[0139] (3) 模仿葡萄球菌HZ01具有良好的硝酸还原酶活性,在应用过程中能高效将硝酸盐还原成亚硝酸盐,利用发酵肉制品中的硝酸盐,从而减少了肉制品加工过程中亚硝酸盐的用量;

[0140] (4) 模仿葡萄球菌HZ01可以代谢亮氨酸产生3-甲基丁醛,增加挥发性风味物质种类及含量,产香性状优良;

[0141] (5) 模仿葡萄球菌HZ01可以显著提高发酵肉制品中的酯类、醛类和酸类物质,其中乙酸乙烯酯、丁酸甲酯、己酸甲酯、正己醛、乙酸和异戊酸提高最显著,可显著提高发酵肉制品质量。

附图说明

[0142] 图1是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的菌落形态图;

[0143] 图2是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的革兰氏染色结果图;

[0144] 图3是本发明中模仿葡萄球菌HZ01与其他葡萄球菌菌株的比对结果图;

[0145] 图4是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的进化关系图;

[0146] 图5是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的耐受pH发酵特性曲线图;

[0147] 图6是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的耐受亚硝酸盐量发酵特性曲线图;

[0148] 图7是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的耐盐量发酵特性曲线图;

[0149] 图8是本发明中模仿葡萄球菌HZ01的耐受温度发酵特性曲线图;

[0150] 图9是本发明中模仿葡萄球菌HZ01分解肌浆蛋白质的SDS-PAGE图;

[0151] 图10是本发明厌氧条件下模仿葡萄球菌HZ01菌株利用 NO_3^- 转化为 NO_2^- 的情况柱状图。

具体实施方式

[0152] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明,但并不作为对本发明限制的依据。

[0153] 一株模仿葡萄球菌HZ01,模仿葡萄球菌HZ01的保藏编号为,GDMCCN0.62410;模仿葡萄球菌HZ01的保藏单位为,广东省微生物菌种保藏中心;所述模仿葡萄球菌HZ01保藏单位的地址为,广州市先烈中路 100号大院59号楼5楼;模仿葡萄球菌HZ01的保藏名称为,Staphylococcus simulans HZ01;模仿葡萄球菌HZ01的保藏时间为2022年4月24日。

[0154] 模仿葡萄球菌HZ01菌剂,模仿葡萄球菌HZ01菌剂采用模仿葡萄球菌HZ01制得;

[0155] 模仿葡萄球菌HZ01菌剂的制备包括以下步骤,

[0156] (A) 将模仿葡萄球菌HZ01接种到NB培养基中培养,制得菌液;步骤(A)中的NB培养基包括蛋白胨10g/L、牛肉浸膏3.0g/L和氯化钠5.0g/L;步骤(A)中NB培养基的pH值为7~7.4;步骤(A)中NB培养基的用量为0.5L~2L;步骤(A)中的培养为静止培养;步骤(A)中的培养时间为24h~72h;步骤(A)中的培养温度为25℃~35℃;

[0157] (B) 待步骤(A)制得菌液中模仿葡萄球菌HZ01的浓度为 $1.0 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 9.9 \times 10^9 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时进行离心;步骤(B)中的离心转速为5000rap/min~20000rap/min;步骤(B)中的离心时间为10min~20min;步骤(B)中的离心温度为2℃~6℃;

[0158] (C) 待离心完成后加入灭菌脱脂牛奶重悬;步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的质量浓度为0.05%*m/v*~0.5%*m/v*;步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的用量为1ml~5ml;

[0159] (D) 待重悬完成后进行冷冻干燥,即制得浓度为 $1.0 \times 10^{10} \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^{11} \log_{10} \text{CFU/g}$ 的粉末状模仿葡萄球菌HZ01菌剂;步骤(D)中的冷冻干燥温度为-90℃~-70℃;步骤(D)中的冷冻干燥时间为24h~72h。

[0160] 模仿葡萄球菌HZ01的基因登录号为OM758216,具体核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0161] 模仿葡萄球菌HZ01基因序列的测定包括以下步骤,

[0162] (a) 采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取模仿葡萄球菌HZ01的总DNA;

[0163] (b) 使用PCR反应体系对步骤(a)中提取到的总DNA进行16s全长扩增;PCR反应体系包括10×Ex Taqbuffer 2μL,2.5mM dNTP Mix 1.6μL,5pPrimer 10.6μL,5pPrimer 20.6μL,Template 2μL,5uEx Taq 1μL,ddH₂O 12.2μL;PCR反应体系的用量为15μL~25μL;

[0164] PCR反应体系中的16s全长扩增包括以下步骤,

[0165] (b01) 将步骤(a)中提取到的总DNA在PCR反应体系中于95℃的温度条件下反应5min;

[0166] (b02) 待步骤(b01)完成后,继续在95℃的温度条件下反应30s;

[0167] (b03) 待步骤(b02)完成后,继续在55℃的温度条件下反应30s;

[0168] (b04) 待步骤(b03)完成后,继续在72℃的温度条件下反应1min;

[0169] (b05) 重复步骤(b02)~步骤(b04)24次;

[0170] (b06) 待步骤(b05)完成后,在72℃的温度条件延伸10min;

[0171] (b07) 待步骤(b06)完成后,在10℃的温度条件保温,即完成模仿葡萄球菌HZ01总DNA的16s全长扩增;

[0172] (c) 待16s全长扩增完成后进行切胶纯化,并进行电泳测序,测得的序列即为模仿

葡萄球菌HZ01的 16sDNA全长序列。

[0173] 模仿葡萄球菌HZ01在降解肌浆蛋白质中的应用；

[0174] 模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白质的降解结果检测包括以下步骤；

[0175] (S01)提取肌浆蛋白质,并采用Lowry蛋白浓度试剂盒测定肌浆蛋白质的浓度；

[0176] 肌浆蛋白质的提取包括以下步骤，

[0177] (S011)取猪肉与PB缓冲液混合并匀浆；猪肉为新鲜猪瘦肉；猪肉的用量为1g~10g；PB缓冲液的用量为15mL~50mL；PB缓冲液的浓度为0.02mol/L；PB缓冲液的pH为5.8~6.6；匀浆转速为10000rpm/min~15000rpm/min；匀浆时间为15min~30min；

[0178] (S012)将步骤(S011)匀浆后的上清液通过滤膜过滤并除菌后,即得肌浆蛋白质；滤膜孔径为0.2 μ m~0.25 μ m；

[0179] (S02)取步骤(S01)中的肌浆蛋白质、葡萄糖和模仿葡萄球菌HZ01菌液共同孵育；葡萄糖为1%葡萄糖；模仿葡萄球菌HZ01菌液的用量为0.05mL~0.5mL；孵育时间为24h~72h；

[0180] (S03)待孵育完成后将菌液离心；

[0181] (S04)取2 \times SDS上样缓冲液与步骤(S03)离心后的上清液混合,并水浴；2 \times SDS上样缓冲液的取用量为150 μ L~250 μ L；离心后的上清液取用量为150 μ L~250 μ L；水浴温度为90 $^{\circ}$ C~98 $^{\circ}$ C；水浴时间为3min~10min；

[0182] (S05)取10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白和标准蛋白,并在10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白和标准蛋白上分别上步骤(S04)中的样品；对10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白的上样量为15 μ L~25 μ L；对标准蛋白的上样量为5 μ L~10 μ L。

[0183] (S06)上样后进行电泳；电泳电压为110V；电泳时间为60min~120min；

[0184] (S07)待电泳完成后用考马斯亮蓝R-250进行染色,通过染色结果得出模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白质的降解结果；染色时间为1h~2h。

[0185] 模仿葡萄球菌HZ01在将硝酸盐还原为亚硝酸盐时的应用；

[0186] 对亚硝酸盐的浓度检测包括以下步骤，

[0187] (i)配制含适量浓度KNO₃/NaNO₃的NB培养基；步骤(i)为配制0.1%KNO₃/NaNO₃的NB培养基；

[0188] 步骤(i)中含适量浓度KNO₃/NaNO₃的NB培养基配制包括以下步骤，

[0189] (i01)取适量的KNO₃/NaNO₃和NB营养肉汤溶解于无菌水中；步骤(i01)中KNO₃/NaNO₃的用量为0.02g~0.1g；步骤(i01)中NB营养肉汤的用量为0.7g~1.2g；步骤(i01)中无菌水的用量为30mL~70mL；

[0190] (i02)将步骤(i01)中的混合液灭菌培养后,即得含适量浓度KNO₃/NaNO₃的NB培养基；步骤(i02)中的灭菌温度为115 $^{\circ}$ C~130 $^{\circ}$ C；步骤(i02)中的培养时间为15min~30min；

[0191] (ii)将模仿葡萄球菌HZ01菌液接种至步骤(i)中的NB培养基中培养；步骤(ii)模仿葡萄球菌HZ01菌液的接种量为0.05mL~0.2mL；步骤(ii)中的培养温度为25 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C；步骤(ii)中的培养时间为12h~36h；

[0192] (iii)在培养过程中间隔取发酵液离心并收集上清液；步骤(iii)中发酵液的取用量为1mL~5mL；步骤(iii)中取发酵液的时间间隔为2h~6h；步骤(iii)中的离心温度为2 $^{\circ}$ C~6 $^{\circ}$ C；步骤(iii)中的离心转速为5000rap/min~20000rap/min；

- [0193] (iv) 检测步骤(iii) 上清液中的亚硝酸盐含量;
- [0194] 步骤(iv) 对上清液中亚硝酸盐的含量检测包括以下步骤,
- [0195] (iv 01) 取适量上清液置于比色管中;步骤(iv 01) 中上清液的用量为0.5mL~1.5mL;步骤(iv 01) 中比色管的规格为20mL~30mL;
- [0196] (iv 02) 在步骤(iv 01) 的比色管中加入适量对氨基苯磺酸溶液,混匀后静置;步骤(iv 02) 中对氨基苯磺酸溶液的加入量为0.5mL~2mL,对氨基苯磺酸溶液的浓度为3g/L~5g/L;步骤(iv 02) 中溶液的静置时间为3min~5min;
- [0197] (iv 03) 在步骤(iv 02) 静置后的溶液中加入适量盐酸萘乙二胺溶液;步骤(iv 03) 中盐酸萘乙二胺溶液的加入量为0.2mL~1mL,盐酸萘乙二胺溶液的浓度为1g/L~5g/L;
- [0198] (iv 04) 将步骤(iv 03) 中的溶液加水至比色管刻度后,混匀和静置;步骤(iv 04) 中的静置时间为 10min~20min;
- [0199] (iv 05) 测定步骤(iv 04) 中溶液的吸光度;步骤(iv 05) 为,使用1cm比色杯,以零管调节比色杯的零点,取适量步骤(iv 04) 中的溶液,于波长538nm处测吸光度。
- [0200] 模仿葡萄球菌HZ01在干腌发酵肉制品中的应用;
- [0201] 干腌发酵肉制品的制备包括以下步骤,
- [0202] (一)取模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液/粉剂,使用食用水稀释;
- [0203] 模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液制备方法为,取纯化并冷藏后的模仿葡萄球菌HZ01单菌落接种于灭菌后 NB液体培养基中培养,待NB液体培养基中模仿葡萄球菌HZ01的浓度达到 $1.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/mL} \sim 5.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/mL}$ 时,即制得浓缩液;浓缩液制备过程中的冷藏温度为 $2^\circ\text{C} \sim 6^\circ\text{C}$;浓缩液制备过程中NB液体培养基的用量为40mL~60mL;浓缩液制备过程中的培养时间为12h~36h;浓缩液制备过程中的培养温度为 $25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$;浓缩液制备过程中的培养为静止培养;
- [0204] (二)取适量份的食盐、白糖和谷氨酸钠溶解于步骤(一)中的溶液中,制成腌制液;
- [0205] 步骤(二)中的腌制液按重量份计包括以下组份,
- [0206] 食盐1~5份,白糖3~8份,谷氨酸钠0.2~0.8份,食用水2~5份,模仿葡萄球菌HZ01浓缩液/粉剂1~5份;
- [0207] (三)取肉糜,将步骤(二)中的腌制液加入肉糜中,待肉糜中模仿葡萄球菌HZ01的浓度达到 $1.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 时,对肉糜进行低温腌制;以肉糜质量计,所述步骤(三)中模仿葡萄球菌HZ01菌剂的浓度为 $3.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g} \sim 7.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 。肉糜中脂肪和瘦肉的质量比为1~ 3:6~9;步骤(三)中的腌制温度为 $2^\circ\text{C} \sim 6^\circ\text{C}$;步骤(三)中的腌制时间为48h~72h;
- [0208] (四)待腌制完成后将肉糜依次进行灌肠、排气、烘制和发酵,即得干腌发酵肉制品成品;步骤(四) 中的烘制温度为 $50^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$;步骤(四) 中的烘制时间为48h~72h;步骤(四)中的发酵温度为 $20^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$;步骤(四)中的发酵时间为1周~2周;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受pH为4~8;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受亚硝酸盐量为0~150mg/kg;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐盐量为3%~12%;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受温度为 $20^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 。
- [0209] 实施例1:
- [0210] 模仿葡萄球菌HZ01菌剂,该菌株命名为Staphylococcus simulans HZ01,其制备包

括以下步骤，

[0211] (A) 将模仿葡萄球菌HZ01接种到NB培养基中培养，制得菌液；步骤(A)中的NB培养基包括蛋白胨10g/L、牛肉浸膏3.0g/L和氯化钠5.0g/L；步骤(A)中NB培养基的pH值为7.2±0.2；步骤(A)中NB培养基的用量为1L；步骤(A)中的培养为静止培养；步骤(A)中的培养时间为48h；步骤(A)中的培养温度为30℃；

[0212] (B) 待步骤(A)制得菌液中模仿葡萄球菌HZ01的浓度为 $2.5 \times 10^9 \log_{10}$ CFU/mL时进行离心；步骤(B)中的离心转速为10000rap/min；步骤(B)中的离心时间为15min；步骤(B)中的离心温度为4℃；

[0213] (C) 待离心完成后加入灭菌脱脂牛奶重悬；步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的质量浓度为0.1%*m/v*；步骤(C)中灭菌脱脂牛奶的用量为2ml；

[0214] (D) 待重悬完成后进行冷冻干燥，即制得浓度为 $2.0 \times 10^{11} \log_{10}$ CFU/g的粉末状模仿葡萄球菌HZ01菌剂；步骤(D)中的冷冻干燥温度为-80℃；步骤(D)中的冷冻干燥时间为48h。

[0215] 实施例2：

[0216] 模仿葡萄球菌HZ01的CNKI基因登录号为OM758216，广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC)保藏编号为62410，具体核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示：

[0217] GCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTAC CTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATACATGAAACCGCATGGTTTTCATGATGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG GCCACACTGGAAGTGAAGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAGGGTGTAAGTAAGTGTGCATCCCCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG CGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAGTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGCAACTGACGCTGATG TCGGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCA GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC AAGCGG TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTT AGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAACCCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGCCGTTCTCAGTTCG GATTGTA GTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAACTAGCCGTCGAAGGTGACA

[0218] 模仿葡萄球菌HZ01基因序列的测定包括以下步骤，

[0219] (a) 采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取模仿葡萄球菌HZ01的总DNA；

[0220] (b) 使用PCR反应体系对步骤(a)中提取到的总DNA进行16s全长扩增；PCR反应体系

包括10×Ex Taqbuffer2μL, 2.5mM dNTP Mix 1.6μL, 5pPrimer 10.6μL, 5pPrimer 20.6μL, Template 2μL, 5uExTaq 1μL, ddH₂O 12.2μL; PCR反应体系的用量为20μL;

[0221] PCR反应体系中的16s全长扩增包括以下步骤,

[0222] (b01) 将步骤(a)中提取到的总DNA在PCR反应体系中于95℃的温度条件下反应5min, 进行预变性;

[0223] (b02) 待步骤(b01)完成后, 继续在95℃的温度条件下反应30s;

[0224] (b03) 待步骤(b02)完成后, 继续在55℃的温度条件下反应30s;

[0225] (b04) 待步骤(b03)完成后, 继续在72℃的温度条件下反应1min;

[0226] (b05) 重复步骤(b02)~步骤(b04) 24次;

[0227] (b06) 待步骤(b05)完成后, 在72℃的温度条件延伸10min;

[0228] (b07) 待步骤(b06)完成后, 在10℃的温度条件保温, 即完成模仿葡萄球菌HZ01总DNA的16s全长扩增;

[0229] (c) 待16s全长扩增完成后进行切胶纯化, 并使用水平电泳仪进行电泳测序, 测得的序列即为模仿葡萄球菌HZ01的16sDNA全长序列, 1437bp, 如图1和图2所示, 该菌株与亲缘关系最近的菌株*S. simulans* MR1 (CP015642.1) 的相似度为如图3所示的99.65%, 在进化过程中形成独立的如图4所示的进化分支, 是模仿葡萄球菌的一个新菌株。

[0230] 实施例3:

[0231] 如图5、图6、图7和图8所示, 模仿葡萄球菌HZ01可耐受pH值5~8, 亚硝酸盐150mg/kg, 盐分3%~9%, 温度20℃~35℃的发酵条件。

[0232] 模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液制备方法为, 挑取4℃冰箱保存的纯化的模仿葡萄球菌HZ01单菌落接种于50mL的灭菌NB液体培养基, 30℃静置培养24小时, 其浓度达到 $3.0 \times 10^7 \log_{10}$ CFU/mL, 该培养液即为浓缩液。分别配置pH值为4, 5, 6, 7, 8, 盐度为0%, 3%, 6%, 9%, 12%和亚硝酸盐浓度为0, 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg的50mL的NB液体培养基, 将1mL浓缩液接种于不同培养条件的NB培养基, 30℃培养24小时, 每3小时测定OD值, 验证模仿葡萄球菌HZ01的最适发酵条件。配置50mL的NB液体培养基, 接种1mL浓缩液, 验证不同温度下的菌株HZ01的OD值曲线, 确定HZ01的温度生长范围。结果显示, HZ01的生长范围较宽, 在pH值5~8, 亚硝酸盐0~150mg/kg, 盐分3%~9%, 温度20℃~35℃的条件下均可生长。

[0233] 实施例4:

[0234] 模仿葡萄球菌HZ01在降解肌浆蛋白质中的应用; 如图9和图10所示, 模仿葡萄球菌HZ0可分泌高活性蛋白酶, 在72小时内可降解58.1%的肌浆蛋白质条带, 且显著减少41.9%的肌浆蛋白质条带;

[0235] 模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白质的降解结果检测包括以下步骤;

[0236] (S01) 提取肌浆蛋白质, 并采用Lowry蛋白浓度试剂盒测定肌浆蛋白质的浓度;

[0237] 肌浆蛋白质的提取包括以下步骤,

[0238] (S011) 取猪肉与PB缓冲液混合并匀浆; 猪肉为新鲜猪瘦肉; 猪肉的用量为2g; PB缓冲液的用量为20mL; PB缓冲液的浓度为0.02mol/L; PB缓冲液的pH为6.5; 匀浆转速为13000rpm/min; 匀浆时间为20min;

[0239] (S012) 将步骤(S011)匀浆后的上清液通过滤膜过滤并除菌后, 即得肌浆蛋白质; 滤膜孔径为0.22μm;

[0240] (S02)取步骤(S01)中的肌浆蛋白质、葡萄糖和模仿葡萄球菌HZ01菌液共同孵育;葡萄糖为1%葡萄糖;模仿葡萄球菌HZ01菌液的用量为0.1mL;孵育时间为12h~36h;

[0241] (S03)隔24小时取菌液2mL离心;

[0242] (S04)取2×SDS上样缓冲液与步骤(S03)离心完成后的上清液混合,并水浴;2×SDS上样缓冲液的取用量为200uL;离心完成后的上清液取用量为200uL;水浴温度为95℃;水浴时间为5min;

[0243] (S05)取取10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白和标准蛋白,并在取10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白和标准蛋白上分别上步骤(S04)中的样品;对10%-12%的Bio-Rad预制胶肌浆蛋白的上样量为20μL;对标准蛋白的上样量为8μL。

[0244] (S06)上样后进行电泳;电泳电压为110V;电泳时间为90min;

[0245] (S07)待电泳完成后用考马斯亮蓝R-250进行染色,通过染色结果得出模仿葡萄球菌HZ01对肌浆蛋白质条带的降解结果;染色时间为1.5h。

[0246] 实施例5:

[0247] 模仿葡萄球菌HZ01在将硝酸盐还原为亚硝酸盐时的应用;

[0248] 对亚硝酸盐的活性检测包括以下步骤,

[0249] (i)配制含适量浓度KNO₃的NB培养基;步骤(i)为配制0.1%KNO₃的NB培养基;

[0250] 步骤(i)中含适量浓度KNO₃的NB培养基配制包括以下步骤,

[0251] (i01)取适量的KNO₃和NB营养肉汤溶解于无菌水中;步骤(i01)中KNO₃的用量为0.05g;步骤(i01)中NB营养肉汤的用量为0.9g;步骤(i01)中无菌水的用量为50mL;

[0252] (i02)将步骤(i01)中的混合液灭菌培养后,即得含适量浓度KNO₃的NB培养基;步骤(i02)中的灭菌温度为121℃;步骤(i02)中的培养时间为20min;

[0253] (ii)将模仿葡萄球菌HZ01菌液接种至步骤(i)中的NB培养基中培养;步骤(ii)模仿葡萄球菌HZ01菌液的接种量为0.1mL;步骤(ii)中的培养温度为30℃;步骤(ii)中的培养时间为24h;

[0254] (iii)在培养过程中间隔取发酵液离心并收集上清液;步骤(iii)中发酵液的取用量为2mL;步骤(iii)中取发酵液的时间间隔为4h;步骤(iii)中的离心温度为4℃;步骤(iii)中的离心转速为10000rap/min;

[0255] (iv)检测步骤(iii)上清液中的亚硝酸盐含量;

[0256] 步骤(iv)对上清液中亚硝酸盐的含量检测包括以下步骤,

[0257] (iv01)取适量上清液置于带塞比色管中;步骤(iv01)中上清液的用量为1mL;步骤(iv01)中比色管的规格为25mL;

[0258] (iv02)在步骤(iv01)的比色管中加入适量对氨基苯磺酸溶液,混匀后静置;步骤(iv02)中对氨基苯磺酸溶液的加入量为1mL,对氨基苯磺酸溶液的浓度为4g/L;步骤(iv02)中溶液的静置时间为3min~5min;

[0259] (iv03)在步骤(iv02)静置后的溶液中加入适量盐酸萘乙二胺溶液;步骤(iv03)中盐酸萘乙二胺溶液的加入量为0.5mL,盐酸萘乙二胺溶液的浓度为2g/L;

[0260] (iv04)将步骤(iv03)中的溶液加水至比色管刻度后,混匀和静置;步骤(iv04)中的静置时间为15min;

[0261] (iv05)测定步骤(iv04)中溶液的吸光度;步骤(iv05)为,使用1cm比色杯,以零管

调节比色杯的零点,取适量步骤(iv 04)中的溶液,于波长538nm处测吸光度,同时做试剂空白和标准曲线。

[0262] 实施例6:

[0263] 模仿葡萄球菌HZ01在干腌发酵肉制品中的应用;

[0264] 干腌发酵肉制品的制备包括以下步骤,

[0265] (一)取模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液,使用食用水稀释;

[0266] 模仿葡萄球菌HZ01的浓缩液制备方法为,挑取4℃冰箱保存的纯化的模仿葡萄球菌HZ01单菌落接种于50mL的灭菌NB液体培养基,30℃静置培养24小时,其浓度达到 $3.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/mL}$,该培养液即为浓缩液。

[0267] (二)取适量份的食盐、白糖和谷氨酸钠溶解于步骤(一)中的溶液中,制成腌制液;

[0268] 步骤(二)中的腌制液按重量份计包括以下组份,

[0269] 食盐2.5份,白糖4份,谷氨酸钠0.4份,食用水2.5份,模仿葡萄球菌HZ01浓缩液2.5份;

[0270] (三)取肉糜,将步骤(二)中的腌制液加入肉糜中,待肉糜中模仿葡萄球菌HZ01的浓度达到 $8.0 \times 10^7 \log_{10} \text{CFU/g} \sim 9.9 \times 10^8 \log_{10} \text{CFU/g}$ 时,对肉糜进行低温腌制;肉糜中脂肪和瘦肉的质量比为2:8;步骤(三)中的腌制温度为4℃;步骤(三)中的腌制时间为48h~72h;

[0271] (四)待腌制完成后将肉糜依次进行灌肠,灌肠长度和直径不做要求;排气、烘制和发酵,即得干腌发酵肉制品成品;步骤(四)中的烘制温度为52℃~54℃;步骤(四)中的烘制时间为48h~72h;步骤(四)中的发酵温度为20℃~30℃;步骤(四)中的发酵时间为1周~2周;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受pH为4~8;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受亚硝酸盐量为0~150mg/kg;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐盐量为3%~12%;模仿葡萄球菌HZ01在发酵过程中的耐受温度为20℃~35℃。

[0272] 模仿葡萄球菌HZ01接种发酵肉制品的理化特性如表1所示:

[0273] 表1:模仿葡萄球菌接种发酵肉制品的理化特性

指标	对照	HZ01
pH	5.53 ± 0.02^a	5.63 ± 0.08^a
a_w	0.81 ± 0.03^a	0.77 ± 0.03^a
葡萄球菌浓度($\log_{10} \text{CFU/g}$)	7.58 ± 0.89^a	7.34 ± 0.86^a
亚硝酸盐浓度(mg/kg)	15.8 ± 0.10^b	38.4 ± 0.43^a
L*	36.0 ± 1.32^a	35.2 ± 1.89^a
a*	8.56 ± 2.92^a	6.08 ± 0.69^b
b*	7.31 ± 1.56^b	9.86 ± 1.42^a

[0275] 由表1所示,可减少肉制品中亚硝酸盐的用量。

[0276] 不同处理发酵肉制品的挥发性化合物组成如表2所示:

[0277] 表2:不同处理发酵肉制品的挥发性化合物组成(AU* 10^5)

[0278]

挥发性风味物质	HZ01	对照
酯类		
乙酸乙烯酯	15.8±3.82	2.00±0.30
硝酸丁酯	1.11±0.25	1.38±0.14
甲酸甲酯	5.99±1.54	6.45±0.84
异硫氰酸丁酯	1.07±0.24	
异丁酸甲酯	0.83±0.09	
丁酸甲酯	15.9±2.40	3.83±0.61
异戊酸甲酯	8.19±1.88	5.88±0.81
2-甲基丁酸甲酯	3.63±1.09	
丁酸苯乙酯	1.83±0.36	
己酸甲酯	13.9±1.65	3.98±0.79
庚酸甲酯	1.88±0.23	19.7±2.97
辛酸甲酯	1.44±0.33	2.61±0.38
碳酸甲乙酯		2.67±0.62
异戊酸异戊酯		2.95±0.73
部分总计	71.6±7.72	51.4±3.41
醛类		

[0279]

异戊醛	1.26±0.24	3.37±0.98
2-甲基丁醛	1.63±0.44	
正己醛	18.2±1.41	4.44±0.32
正庚醛	2.24±0.14	
苯甲醛	15.2±2.07	17.2±1.86
壬醛	6.11±0.85	8.14±1.34
部分总计	44.6±8.51	33.1±2.86
醇类		
异丙硫醇	2.77±0.59	
2,3-丁二醇	13.2±1.44	15.2±2.14
1-辛烯-3-醇	4.41±0.75	4.55±1.86
4-甲基-1-己醇	1.13±0.65	1.11±0.61
异戊醇	2.04±1.18	1.48±0.56
部分总计	23.5±3.26	22.3±5.14
酸类		
乙酸	12.5±1.63	4.31±0.74
异戊酸	6.71±1.36	
2-甲基丁酸	5.35±0.66	5.52±0.81
部分总计	24.5±4.83	9.84±2.32
酮类		
3-羟基-2-丁酮	9.33±2.05	20.3±1.69
烷烃类		
氯代叔丁烷	1.99±0.15	
1-硝基己烷	1.64±0.71	
1-氯庚烷		4.01±.85
部分总计	3.63±0.95	4.01±1.03
吡嗪类		
2,3,5,6-四甲基吡嗪	2.86±0.65	
2,5-二甲基吡嗪	0.97±0.16	2.02±0.42
2,3,5-三甲基吡嗪		
部分总计	3.83±0.94	2.02±0.61
呋喃类		
2-正戊基呋喃	4.47±0.32	12.9±2.42
其他		
乙酰氯	2.40±0.80	0.70±0.21
二硫化碳	7.69±0.68	36.0±3.63
苯甲腈	4.45±0.43	5.67±0.96
N-亚硝基二正丁胺	2.85±0.77	3.11±0.24
N,N-二异丙基乙二胺	1.69±0.33	
1,2-二甲基肼	2.08±0.33	
4-乙烯基-1,2-二甲基苯		7.31±1.23
N,N-二丁基甲酰胺		2.87±0.47
部分总计	21.2±2.84	55.7±5.26

[0280] 由表2可知,模仿葡萄球菌HZ01可以显著提高发酵肉制品中的酯类、醛类和酸类物质,其中乙酸乙烯酯、丁酸甲酯、己酸甲酯、正己醛、乙酸和异戊酸提高最显著,可显著提高发酵肉制品质量。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	浙江省农业科学院
[0003]	<120>	一株模仿葡萄球菌HZ01、菌剂及其应用
[0004]	<160>	1
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	1444
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	Staphylococcus simulans
[0010]	<400>	1
[0011]		gctatacatg caagtcgagc gaacagacga ggagcttgct cctctgacgt tagcggcgga 60
[0012]		cgggtgagta acacgtgggt aacctaccta taagactggg ataactccgg gaaaccgggg 120
[0013]		ctaataccgg ataatacatg aaaccgcatg gtttcatgat gaaagacggt tttgctgtca 180
[0014]		cttatagatg gaccgcggc gtattagcta gttggtaagg taacggctta ccaaggcaac 240
[0015]		gatactgtagc cgacctgaga gggtagtcgg ccacactgga actgaggaca cggctccagac 300
[0016]		tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatgggc gaaagcctga cggagcaacg 360
[0017]		ccgcgtgagg tgatgaaggt cttcggatcg taaaactctg ttattagga agaacaaggg 420
[0018]		tgtaagtaac tgtgcatccc cttgacggta cctaatacaga aagccacggc taactacgtg 480
[0019]		ccagcagccg cgtaatacag taggtggcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagcg 540
[0020]		cgcgtaggcg gtttttaag tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg gagggtcatt 600
[0021]		ggaaactgga aaacttgagt gcagaagagg aaagtggaat tccatgtgta gcggtgaaat 660
[0022]		gcgcagagat atggaggaa accagtgggc aaggcgactt tctggtctgc aactgacgct 720
[0023]		gatgtgcgaa agcgtgggga tcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac 780
[0024]		gatgagtgct aagtgttagg gggtttccgc cccttagtgc tgcagctaac gcattaagca 840
[0025]		ctccgcctgg ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac 900
[0026]		aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca aatcttgaca 960
[0027]		tcctttgaca actctagaga tagagcttc cccttcgggg gacaaagtga caggtggtgc 1020
[0028]		atggttgctc tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaacc 1080
[0029]		ttaagcttag ttgccagcat taagttggc actctaagtt gactgccggt gacaaaccgg 1140
[0030]		aggaaggtgg gggatgacgt caaatcatca tgcccccttat gatttgggt acacacgtgc 1200
[0031]		tacaatggac ggtacaaagg gcagcgaacc cgcgaggtca agcaaatccc ataaagccgt 1260
[0032]		tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgt 1320
[0033]		agatcagcat gctacggtga atacgttccc gggctttgta cacaccgcc gtcacaccac 1380
[0034]		gagagtttgt aacaccgaa gccggtggag taacctttta ggaactagcc gtcgaaggtg 1440
[0035]		aca 1444

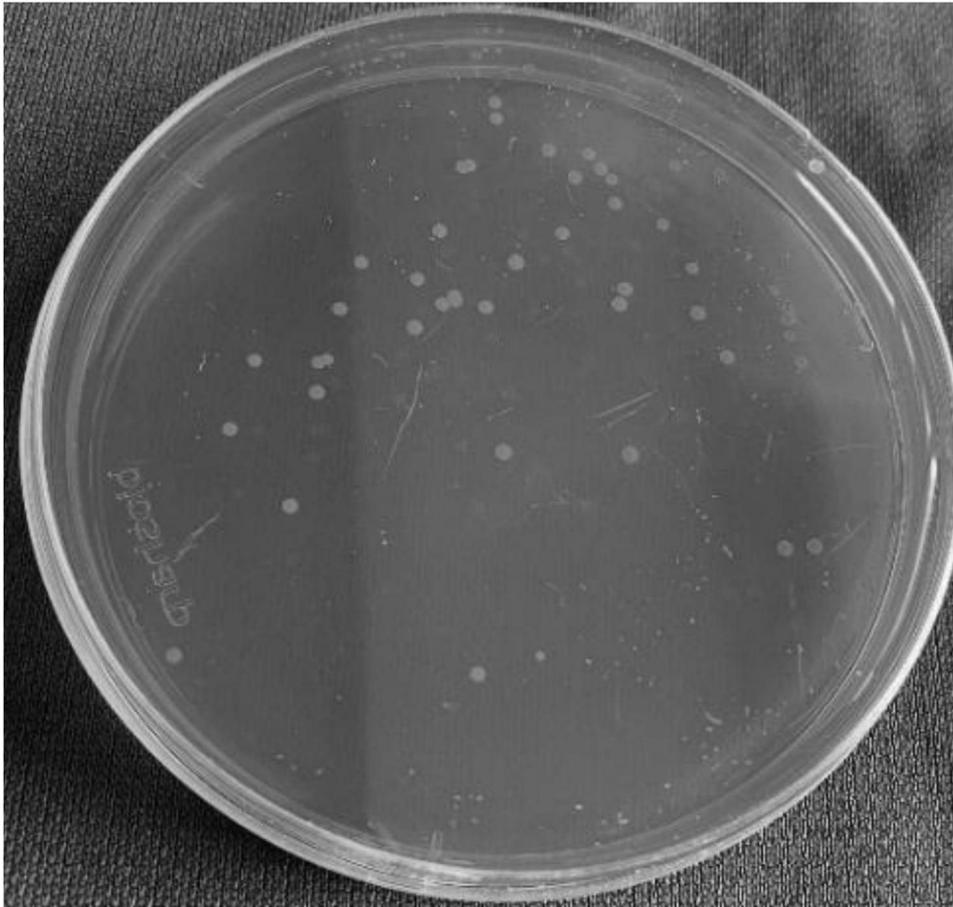


图1

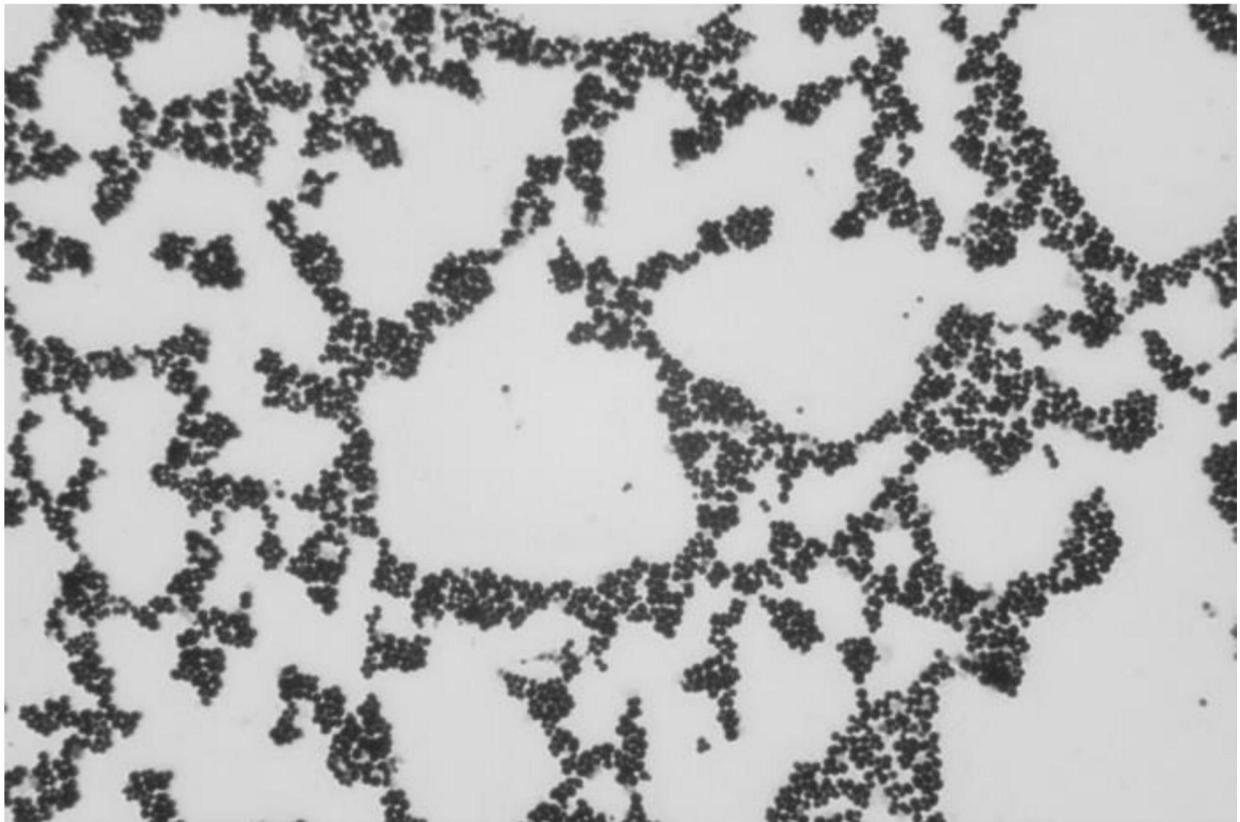


图2

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus simulans strain MR1 chromosome complete genome	Staphylo...NA		1286	2623	15657	99%	0.0	99.65%	2661512	CP015642.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus simulans strain MR2 chromosome complete genome	Staphylo...NA		1286	2623	15657	99%	0.0	99.65%	2680372	CP016157.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus simulans strain MR4 chromosome complete genome	Staphylo...NA		1286	2623	15657	99%	0.0	99.65%	2685102	CP017430.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus simulans strain MR3 chromosome complete genome	Staphylo...NA		1286	2623	15649	99%	0.0	99.65%	2679685	CP017428.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus simulans strain NCTC7944 genome assembly chromosome_1	Staphylo...NA		1286	2617	15668	99%	0.0	99.58%	2675237	LR134264.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus simulans strain NCTC11046 genome assembly chromosome_1	Staphylo...NA		1286	2617	15657	99%	0.0	99.58%	2762956	LS483313.1

图3

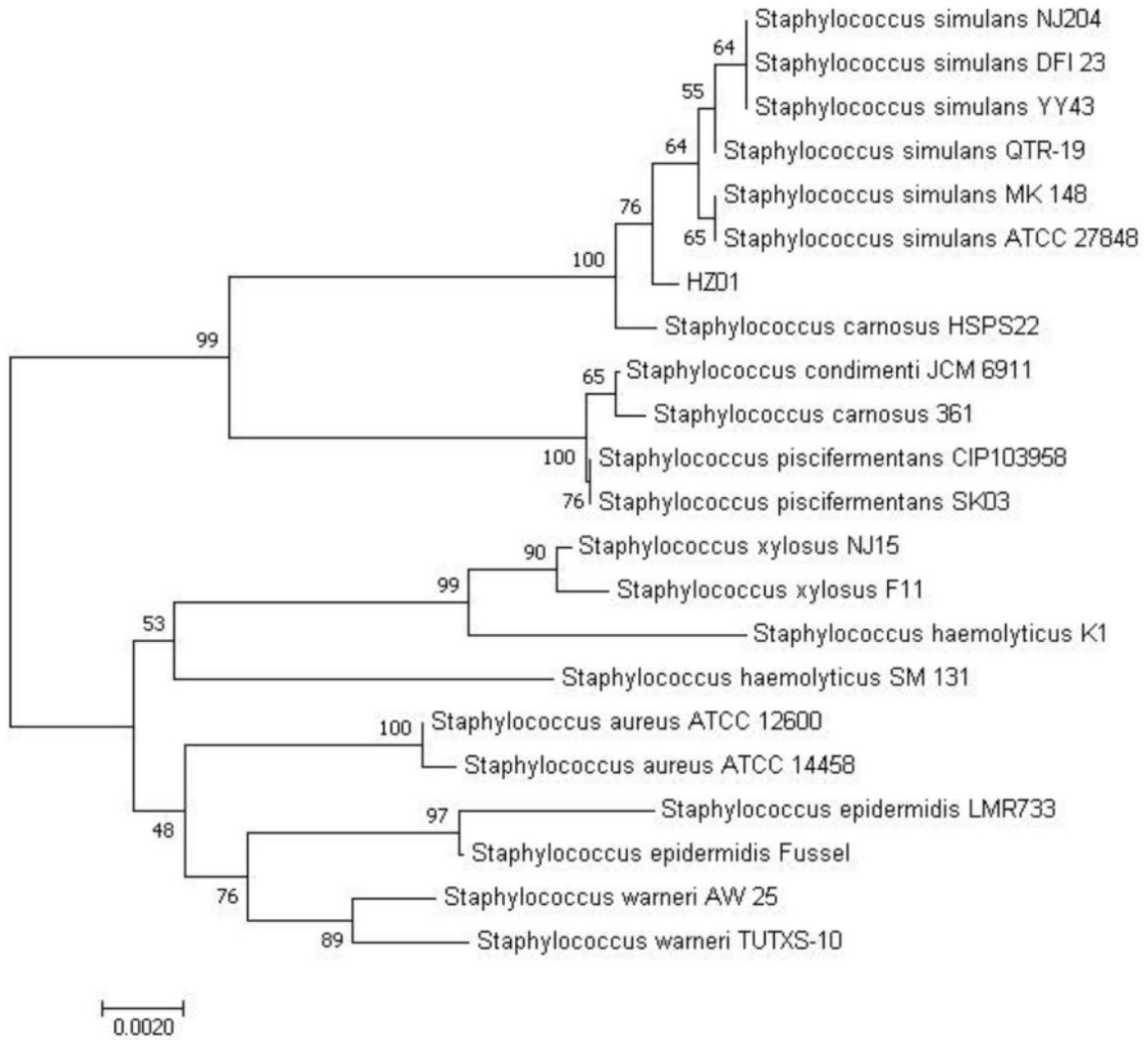


图4

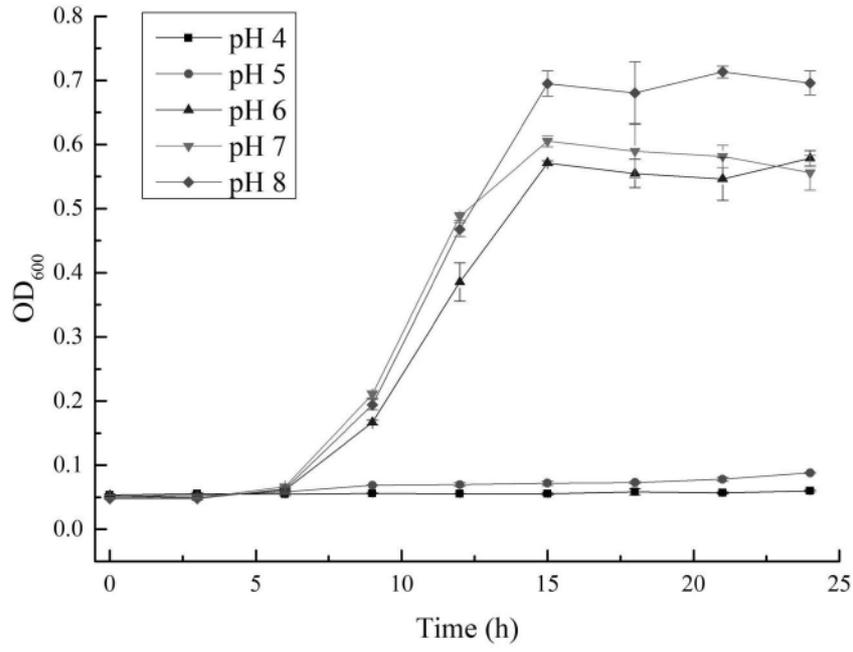


图5

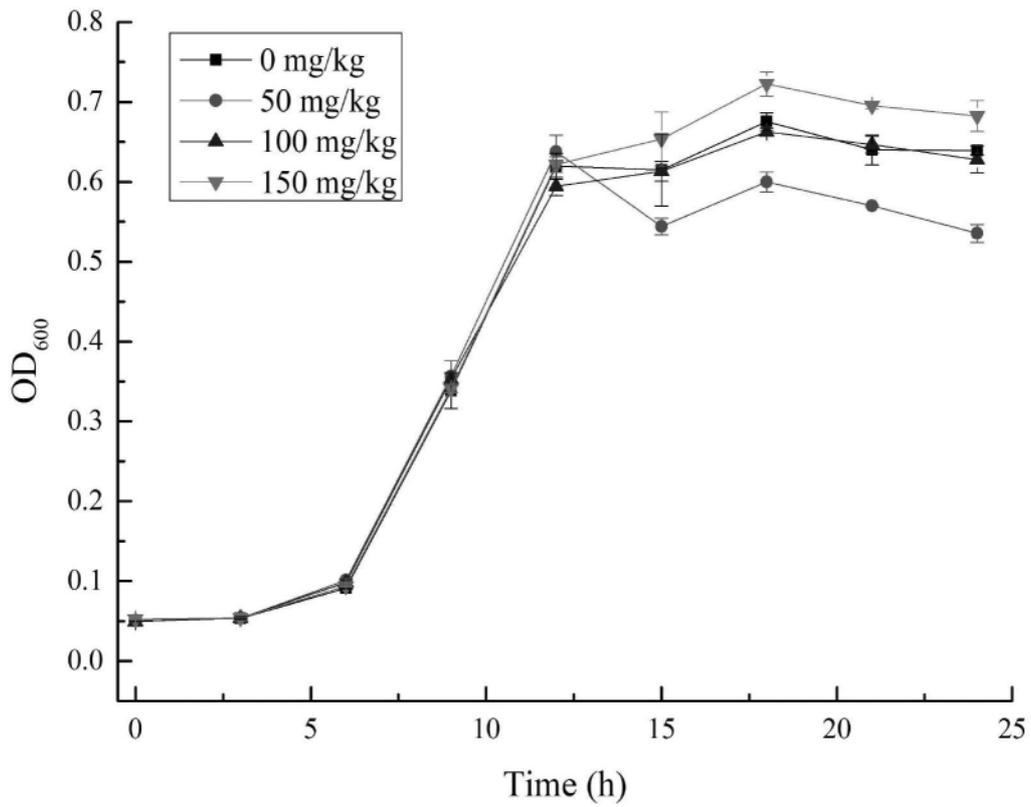


图6

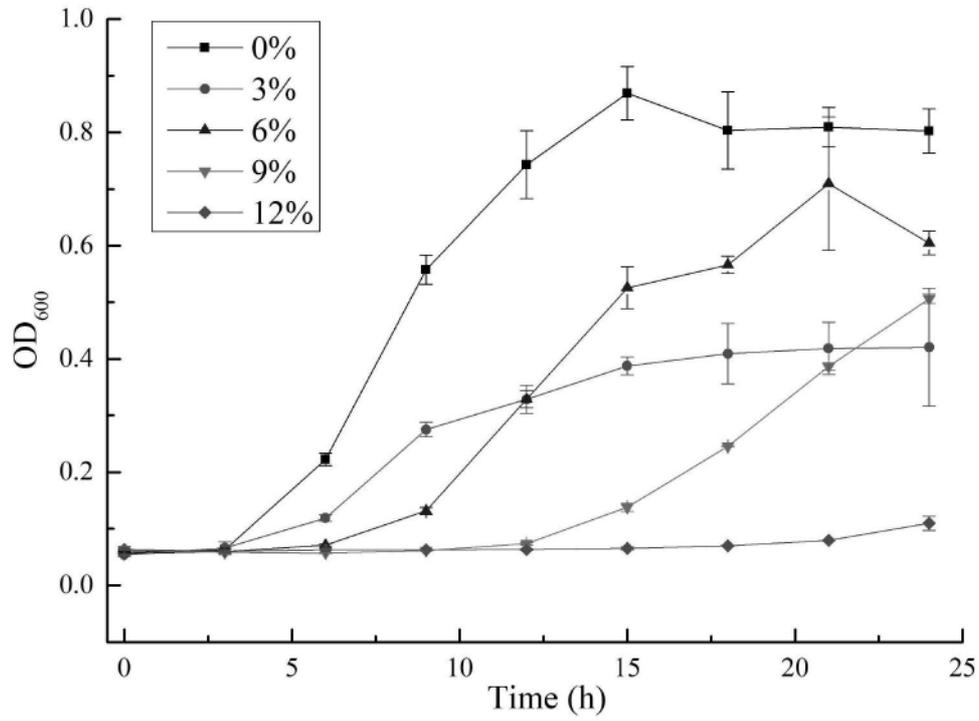


图7

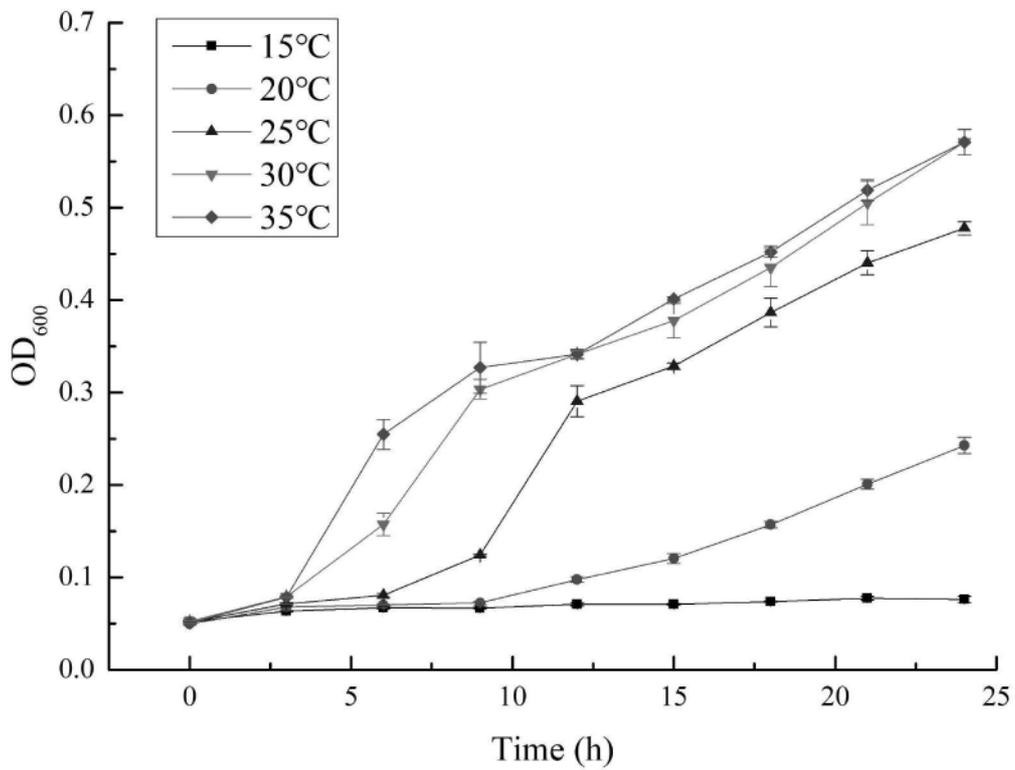


图8

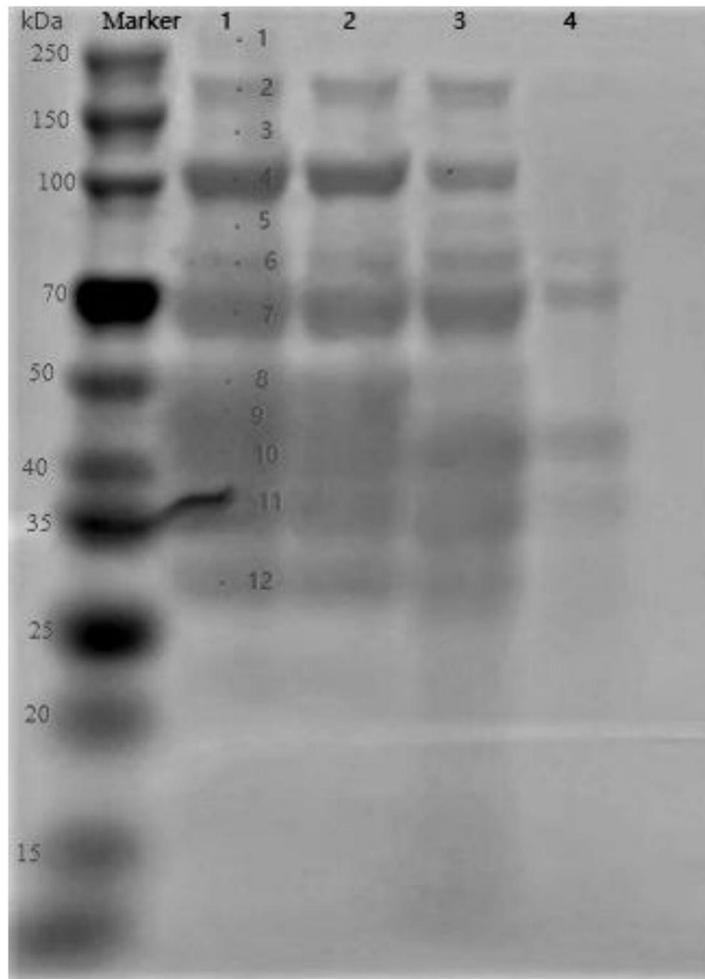


图9

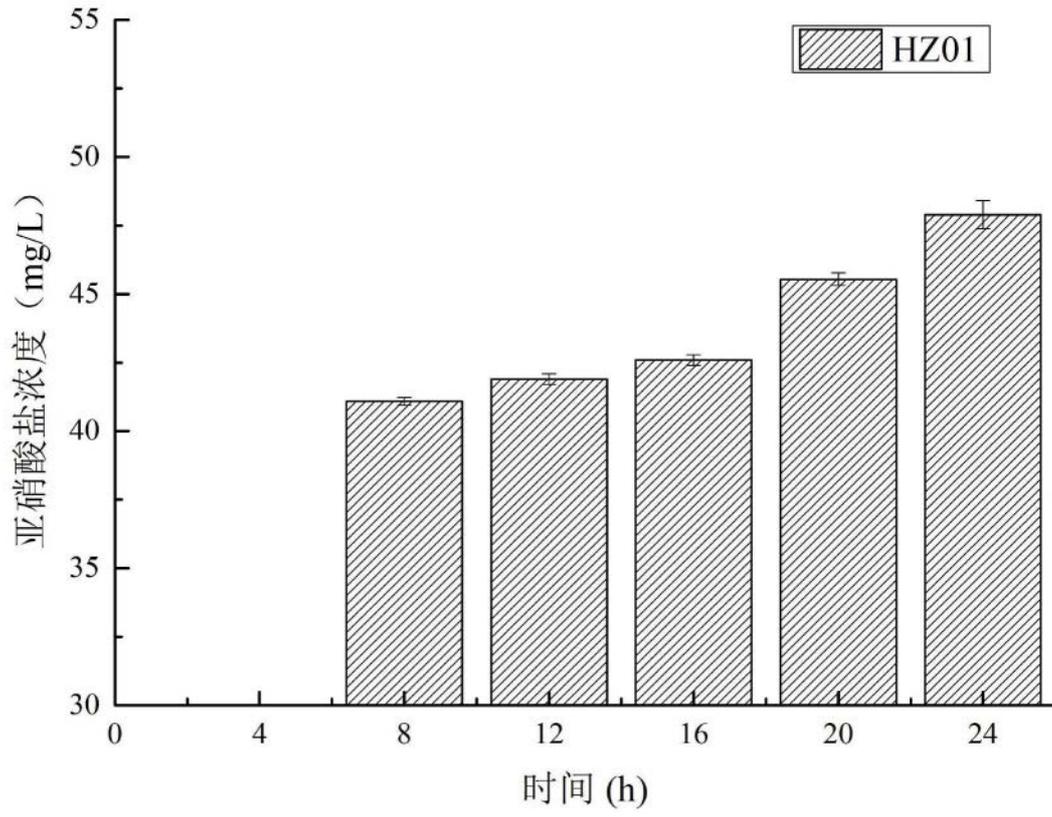


图10