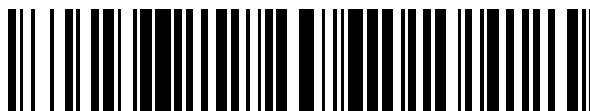


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 889**

51 Int. Cl.:

C12P 1/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
A23K 10/12 (2006.01)
A23K 10/16 (2006.01)
A23K 20/147 (2006.01)
A23K 10/14 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)
A23K 50/60 (2006.01)
A23L 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2015 PCT/KR2015/000900**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15115790**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2015 E 15743540 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3101136**

54 Título: **Cepa de Bacillus sp. con productividad mejorada de harina de soja fermentada y procedimiento de producción de harina de soja fermentada mediante el uso de la misma**

30 Prioridad:

28.01.2014 KR 20140010729

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330 Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 100-400, KR

72 Inventor/es:

KIM, TAEK BEOM;
GWON, SONG HUI;
KIM, BI NA;
CHO, SEONG JUN;
KANG, KYUNG IL;
PARK, SEUNG WON;
HONG, YOUNG HO y
PARK, MIN JU

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 742 889 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Bacillus* sp. con productividad mejorada de harina de soja fermentada y procedimiento de producción de harina de soja fermentada mediante el uso de la misma

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a una novedosa Cepa de *Bacillus* sp. con productividad mejorada de harina de soja fermentada y un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada mediante el uso de la misma. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a una novedosa cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con productividad mejorada de harina de soja fermentada, que es excelente en cuanto a la eliminación de factores antinutricionales y en la actividad de la proteasa, y muestra una alta actividad antimicrobiana contra los patógenos y una productividad reducida de sustancias viscosas durante la fermentación, un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada mediante el uso de la cepa, una harina de soja fermentada producida a partir de la misma y una composición de pienso que incluye la misma.

Técnica antecedente

Como se ha comprobado que enfermedades tales como la encefalopatía espongiforme bovina, que han sido fatales para los seres humanos, se deben a componentes de proteínas animales añadidos a un pienso, existe una tendencia mundial rápida hacia el reemplazo de proteínas animales añadidas a un pienso con proteínas vegetales.

Una harina de soja desgrasada (en lo sucesivo denominada "harina de soja") es la fuente más común de proteínas vegetales utilizadas en los mercados de piensos como sustituto de proteínas animales tales como harina de pescado, polvo de carne y hueso o plasma. La harina de soja también se llama pasta de aceite de soja, que es un subproducto sólido resultante de la extracción del aceite de soja. En Corea, la harina de soja, utilizada como fuente de proteína vegetal, representa el 60% del suministro total de harinas, llegando a 2 millones de toneladas anuales (Korea Feed Ingredients Association, 2004).

La harina de soja contiene 55~56% en peso de proteínas, 13~14% en peso de carbohidratos solubles y 21~22% en peso de carbohidratos insolubles, en función del peso seco. Además, la harina de soja contiene aproximadamente 1% en peso de grasa cruda y aproximadamente 4~6% en peso de cal (In-Kyu Han, Vegetable protein feed (Pienso proteico vegetal), Food Processing, Sun-Jin Publishing Co., 67-107, 1998).

Mientras tanto, la harina de soja contiene una variedad de factores antinutricionales (ANF), que pueden perjudicar la tasa de digestión cuando se usan como un pienso (Li et al. J. Anim. Sci, 68: 1790, 1990). Entre ellos, un inhibidor de la tripsina (TI) es representativo, y en los animales terrestres, se sabe que el TI en la dieta interfiere con las funciones enzimáticas adecuadas de la tripsina y la quimotripsina, lo que lleva a una reducción en la disponibilidad de proteínas totales. En particular, dado que estos factores antinutricionales afectan en gran medida al ganado joven, el uso de harina de soja en el pienso para ganado joven está restringido. Además, se conoce una sustancia aglutinante de glóbulos rojos, hemaglutinina, oligosacáridos que causan diarrea y dolor abdominal en animales vivos, como rafinosa, estaquiosa, etc., o polisacáridos que inhiben la absorción de nutrientes. Algunos de ellos se pueden destruir por tratamiento térmico. Sin embargo, durante este procedimiento, las proteínas de soja se desnaturalizan y, por lo tanto, se reduce su solubilidad, y se pueden destruir proteínas esenciales como la lisina, etc. Recientemente, para un uso más eficiente de las proteínas de soja, se han desarrollado procedimientos de procesamiento para aumentar la eficiencia mediante la eliminación de factores antinutricionales.

Los productos de soja procesados actuales, tales como concentrados de proteína de soja, proteínas de soja aisladas o proteínas de soja hidrolizadas, se producen generalmente mediante tratamiento químico o tratamiento enzimático. Sin embargo, el procedimiento de procesamiento químico es costoso y causa un problema de disminución de la solubilidad de la proteína, porque se produce la desnaturalización de las proteínas o la pérdida de aminoácidos solubles debido al tratamiento térmico, el tratamiento químico o el secado térmico durante el proceso de producción. Por esta razón, se realiza un tratamiento térmico, pero no causa una desnaturalización proteica extensa durante el procedimiento de procesamiento químico y, por lo tanto, un factor antinutricional, inhibidor de la tripsina, está considerablemente presente en la harina de soja.

Como un medio para resolver el problema del procedimiento de procesamiento químico, se ha desarrollado un producto de harina de soja fermentada preparado mediante un procedimiento de procesamiento biológico que utiliza bacterias *Bacillus* u hongos (Patentes Coreanas N.º 10-0645284, 10-0459240 y 10- 0925173). Este procedimiento de procesamiento del tratamiento de fermentación se usa para eliminar una pluralidad de factores antinutricionales y también para degradar proteínas o carbohidratos en formas digestivas de bajo peso molecular durante el proceso de fermentación, produciendo de este modo proteínas de alta calidad para piensos, que es excelente en cuanto a la digestión y la tasa de absorción.

Sin embargo, la fermentación sólida se usa generalmente en el procedimiento de procesamiento del tratamiento de fermentación, y la fermentación sólida tiene la desventaja de suministrar aire continuamente para mantener las condiciones aeróbicas y eliminar el calor de fermentación producido durante el proceso de fermentación.

Además, el procedimiento de procesamiento del tratamiento de fermentación requiere un tiempo de fermentación largo de 48 horas o más para eliminar los factores antinutricionales por encima del nivel óptimo. Un tiempo de fermentación tan largo reduce la velocidad de rotación del fermentador y provoca un aumento en el costo total de producción.

Por consiguiente, los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada mediante fermentación sólida usando una cepa de *Bacillus subtilis* TP6 (KFCC11343P, Número de Acceso KCCM11438P) que tiene excelentes características requeridas en la producción de harina de soja fermentada, con el fin de acortar significativamente el tiempo de fermentación durante la producción de harina de soja fermentada (Publicación de Patente Coreana N.º 10-2011-0027535).

Mediante este procedimiento, se puede producir una harina de soja fermentada con una calidad equivalente o superior a la harina de soja fermentada convencional incluso con un tiempo de fermentación más corto utilizando la cepa de *Bacillus subtilis* TP6 que es excelente en cuanto a la eliminación de factores antinutricionales y en la actividad de la proteasa.

Sin embargo, este procedimiento es problemático ya que la cepa de *Bacillus subtilis* TP6 tiene baja capacidad para inhibir la proliferación de patógenos y, por lo tanto, los patógenos también proliferan durante la fermentación cuando la harina de soja está contaminada con *E. coli* o *Salmonella* durante la fermentación.

Por consiguiente, los autores de la presente invención han realizado grandes esfuerzos para seleccionar una cepa de fermentación que tenga características mejoradas útiles para la fermentación sólida de harina de soja. Como resultado, han desarrollado una cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens*, que es excelente en cuanto a la eliminación de factores antinutricionales, en la actividad de la proteasa y en la actividad antimicrobiana contra los patógenos, y ha reducido la productividad de las sustancias viscosas durante la fermentación. Además, los autores de la presente invención encontraron que cuando la cepa se usa para realizar una fermentación sólida de harina de soja, se puede producir harina de soja fermentada de alta calidad con mejores tasas de digestión y absorción y eficiencia alimenticia debido a la baja molecularización por hidrólisis de proteínas de soja y un aumento en el contenido de proteínas crudas, inactivación del inhibidor de la tripsina, o una reducción en el contenido de factores antinutricionales como los polisacáridos no digeribles, incluso por un corto tiempo de fermentación en comparación con el procedimiento convencional. El documento WO 2011/031020 A2 se refiere a "un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada" en el que "el contenido de proteínas es alto, y las tasas de digestión y absorción también mejoran debido a la baja molecularización de las proteínas".

Divulgación

Problema técnico

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar una novedosa cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con productividad mejorada de harina de soja fermentada.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada mediante fermentación sólida mediante el uso de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar una harina de soja fermentada producida por medio del procedimiento.

Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar una composición de pienso que incluye la harina de soja fermentada.

Solución técnica

La presente divulgación proporciona una novedosa cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* (KCCM11471P) útil para la producción de harina de soja fermentada por fermentación sólida.

La cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación se caracteriza porque es excelente en cuanto a la actividad de eliminación de factores antinutricionales, la actividad de la proteasa y la actividad antimicrobiana contra los patógenos, y tiene una productividad reducida de sustancias viscosas durante la fermentación, produciendo de este modo harina de soja fermentada de alta calidad por fermentación sólida.

La invención es como se define en las reivindicaciones, específicamente un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada por fermentación sólida, el procedimiento comprende inocular la cepa de *Bacillus*

amyloliquefaciens con el Número de Acceso KCCM11471P en una harina de soja.

La invención también proporciona una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con el Número de Acceso KCCM11471P.

La presente divulgación también describe la materia relacionada como se expone a continuación. En la medida en que cualquiera de estos asuntos esté fuera de las reivindicaciones, es ilustrativo y forma parte de la divulgación con fines de referencia.

Específicamente, la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación produce proteasa con una fuerte actividad para inactivar diversos factores antinutricionales de polisacáridos tales como el inhibidor de la tripsina (TI) que inhibe la digestión de la harina de soja e hidroliza proteínas de soja de alto peso molecular en proteínas de bajo peso molecular, mejorando notablemente las tasas de digestión y absorción de la harina de soja fermentada.

Además, aunque la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación crece utilizando carbohidratos entre los componentes de la harina de soja, convierte los carbohidratos en proteínas que constituyen la célula. Por lo tanto, el contenido relativo de proteínas crudas en la harina de soja fermentada aumenta, lo cual es un factor importante en la producción de piensos de alta calidad.

Los autores de la presente invención aislaron 14 tipos de cepas con excelente productividad de proteasa de diversos alimentos fermentados tradicionales, con el fin de seleccionar cepas de fermentación que puedan usarse para la producción de harina de soja fermentada por fermentación sólida (véase la Tabla 1).

A partir de los 14 tipos aislados de cepas, se seleccionó la cepa CJ823, en la que la cepa muestra la actividad antimicrobiana más excelente contra *E. coli* y *Salmonella* que son patógenos representativos que causan intoxicación alimentaria en el ganado.

La cepa CJ823 seleccionada muestra una actividad antimicrobiana notablemente excelente contra *E. coli* y *Salmonella*, en comparación con la cepa de *Bacillus subtilis* TP6 (KFCC11343P; Publicación de Patente Coreana N.º 10-2011-0027535) que se ha usado como cepa de fermentación en el procedimiento de producción convencional de harina de soja fermentada por fermentación sólida (véase la Tabla 2).

Además, se confirmó que la cepa CJ823 inhibe efectivamente el crecimiento de *Salmonella* durante el proceso de fermentación práctica y, por lo tanto, es adecuada para la producción de harina de soja fermentada de alta calidad (véase la Tabla 3).

Como tal, la cepa CJ823 produce una alta concentración de proteasa y muestra una excelente actividad antimicrobiana contra los patógenos, pero produce sustancias viscosas pegajosas debido a la polimerización del levano en forma de fructano y poliglutamato que se derivan de azúcares y proteínas de la soja cruda por las enzimas producidas durante el proceso de fermentación. La producción de las sustancias viscosas puede causar problemas en el control del proceso de fermentación y la transferencia de productos fermentados tras la producción en masa de harina de soja fermentada.

Por consiguiente, los autores de la presente invención causaron mutaciones inducidas por UV en la cepa CJ823 con el fin de desarrollar una cepa mutante que tenga una productividad reducida de sustancias viscosas mientras mantiene sus propias características enzimáticas/fisiológicas (véase la Figura 3).

Primero, la cepa CJ823 se expone a UV de 254 nm, y luego se seleccionan 16 tipos de cepas mutantes dependiendo de la forma de la colonia y la formación de una zona clara debido a la producción de sustancias viscosas en un medio de selección que contiene leche descremada. Los 16 tipos seleccionados de cepas mutantes se someten a cultivo sólido, y luego se analizan la actividad de la proteasa y el contenido de γ -PGA (ácido poli- γ -glutámico) para finalmente seleccionar una cepa mutante U304 que muestra la actividad de la proteasa más alta y un contenido relativamente bajo de γ -PGAA (véase la Tabla 4).

Para la identificación de la cepa mutante U304 finalmente seleccionada, se analizó principalmente su asimilación de azúcar. Como resultado, se descubrió que la cepa mutante U304 tiene un 98% de similitud con *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* en términos de características bioquímicas (véase la Tabla 5).

Además, los resultados del análisis de la secuencia de ARNr 16S mostraron que la cepa mutante U304 tiene la secuencia de ARNr 16S de la SEQ ID NO: 1. En base a esta secuencia, se analizó la homología de secuencia y la relación filogenética entre esta cepa y las cepas conocidas. Como resultado, la cepa mutante U304 mostró un 99,92% de similitud con *Bacillus amyloliquefaciens* y la relación filogenética más alta con la misma en el árbol filogenético (véase la Tabla 5).

Cuando las características bioquímicas, la homología de secuencia y la relación filogenética se tomaron juntas, la cepa mutante U304 de acuerdo con la presente divulgación se designó como *Bacillus amyloliquefaciens* K2G.

La cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación es una cepa mejorada que tiene una productividad reducida de sustancias viscosas al reducir notablemente la producción de polímeros tales como el ácido poli- γ -glutámico, al tiempo que mantiene las características de la cepa parental, incluida la alta productividad de la proteasa y excelente actividad antimicrobiana contra patógenos como *E. coli* o *Salmonella*. Por lo tanto, puede usarse de manera muy efectiva en la producción de harina de soja fermentada por fermentación sólida.

Para confirmar la utilidad, se examinaron los cambios en el contenido de proteína cruda por fermentación sólida de la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación. Como resultado, se descubrió que la harina de soja fermentada por la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación mostró el contenido de proteína cruda equivalente o superior a la harina de soja fermentada por la cepa de *Bacillus subtilis* TP6, que se conoce como la cepa de fermentación de harina de soja convencional, tras una fermentación de 24 horas (véase la Tabla 6).

Además, se examinaron los cambios en el contenido de inhibidor de la tripsina (TI) en la harina de soja por fermentación de la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación. Como resultado, se descubrió que el contenido de TI en la harina de soja fermentada durante 16 horas por la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación era equivalente al contenido de TI en la harina de soja fermentada durante 24 horas por la cepa de *Bacillus subtilis* TP6, lo que sugiere que la reducción de los factores antinutricionales se puede lograr a un nivel equivalente con solo 16 horas de fermentación (véase la Tabla 7).

Estos resultados indican que, tras la producción de harina de soja fermentada por fermentación sólida, la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación es capaz de producir harina de soja fermentada que tiene un alto contenido de proteínas crudas y un bajo contenido de factores antinutricionales como un pienso proteico de alta calidad por un corto tiempo de fermentación, en comparación con la cepa convencional. La presente divulgación es excelente porque el tiempo de fermentación reducido aumenta la velocidad de rotación del fermentador para aumentar el número de lotes producibles anualmente y, por consiguiente, los consumidores pueden recibir harinas de soja fermentadas de alta calidad a un costo menor.

Por consiguiente, los autores de la presente invención depositaron la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens*, que es excelente en cuanto a la actividad de eliminación de factores antinutricionales, la actividad de la proteasa y la actividad antimicrobiana contra los patógenos, y ha reducido la productividad de las sustancias viscosas para ser útil para la producción de harina de soja fermentada de alta calidad por fermentación sólida, de conformidad con el Tratado de Budapest en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 7 de noviembre de 2013 con el Número de Acceso KCCM11471P.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada mediante fermentación sólida usando la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Específicamente, el procedimiento de preparación de acuerdo con la presente divulgación se caracteriza por incluir las etapas de:

- a) agregar agua a una harina de soja para realizar un tratamiento térmico;
- b) enfriar la harina de soja tratada térmicamente y, posteriormente, inocular la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* en la misma; y
- c) adquirir una harina de soja fermentada mediante cultivo sólido de la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* inoculada en la harina de soja.

La Etapa a) es una etapa de agregación de agua a una harina de soja como materia prima para realizar el tratamiento térmico. Antes de la fermentación sólida, se rocía directamente una cantidad adecuada de agua sobre la harina de soja cruda, y se mezcla para controlar el contenido de humedad, seguido de un tratamiento térmico durante un tiempo predeterminado.

En algunos casos, el agua en la Etapa a) se agrega para que el contenido de agua en la harina de soja sea del 30 al 80% (v/p), más preferentemente del 30 al 70% (v/p), y más preferentemente del 40 al 60% (v/p). Se prefiere una harina de soja que tenga un contenido de agua dentro del intervalo anterior en términos de prevención del retraso de la fermentación debido a la baja humedad, la mejora de los altos costos requeridos para la transferencia de la harina de soja y el proceso de secado después de la fermentación, y la eficiencia del calentamiento.

Posteriormente, la harina de soja con agua añadida se somete a tratamiento térmico. El tratamiento térmico se realiza con el propósito de matar una variedad de gérmenes en la harina de soja cruda, la destrucción de la pared celular de la soja y la desnaturalización de proteínas, proporcionando de este modo un ambiente para el crecimiento activo del microorganismo deseado. El proceso de tratamiento térmico puede realizarse mediante varios procedimientos conocidos en la técnica, pero se usa preferentemente vapor o vapor sobrecalentado.

En algunos casos, el tratamiento térmico de la Etapa a) se realiza usando vapor de 70 a 130 °C durante 10 a 60 minutos o vapor sobrecalentado de 200 a 300 °C durante un corto período de tiempo de varios segundos a minutos, más preferentemente vapor de 70 a 130 °C durante 10 a 30 minutos, y lo más preferentemente vapor de 80 a 121,1 °C durante 10 a 30 minutos.

Si la temperatura del tratamiento térmico es baja o el tiempo de tratamiento es corto, hay problemas de que el efecto de esterilización sobre varios gérmenes no sea suficiente o el proceso de fermentación posterior no se pueda realizar con facilidad. Si la temperatura del tratamiento térmico es alta o el tiempo de tratamiento es largo, se produce desnaturalización de proteínas en la harina de soja para reducir la tasa de digestión, lo que da como resultado un deterioro en la calidad del producto final. Por lo tanto, es preferente que la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico se adopten dentro de intervalos aceptables para evitar estos problemas.

A través del tratamiento térmico, se puede esperar que los contaminantes presentes en la harina de soja se eliminen casi por completo, se forme un entorno químico adecuado para la fermentación sólida posterior y factores antinutricionales tales como el inhibidor de la tripsina (TI) inhibir la tasa de digestión se reduce ligeramente.

La Etapa b) es una etapa de enfriamiento de la harina de soja tratada térmicamente a una temperatura adecuada para la fermentación sólida, y luego inocular la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* en la misma. En la presente divulgación, el enfriamiento de la harina de soja se realiza normalmente después del tratamiento térmico, en el que el proceso de enfriamiento se puede realizar fácilmente a través de un proceso de transferencia utilizando un transportador de enfriamiento para evitar el sobrecalentamiento y enfriar uniformemente aumentando la velocidad de enfriamiento.

En algunos casos, la harina de soja en la Etapa b) se enfría de 30 a 50 °C, más preferentemente de 35 a 45 °C, y más preferentemente de 37 °C.

Después de enfriar la harina de soja tratada térmicamente, es preferente que los medios de pre-cultivo de la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación se inoculen uniformemente en el medio de harina de soja preparado tal como está o por dilución con agua esterilizada.

El número de cepas de fermentación inoculadas en la harina de soja tratada térmicamente es un factor importante que influye en la fermentación sólida de la harina de soja. El número de la cepa de fermentación inmediatamente después de la inoculación en la harina de soja tratada térmicamente es preferentemente de 1×10^5 a 1×10^9 UFC/g.

Si la cantidad de inoculación es inferior a 1×10^5 UFC/g, se necesita una pequeña cantidad de caldo de fermentación de cultivo, pero existen desventajas de que se requiere mucho tiempo para que la fermentación de la harina de soja aumente el tiempo de fermentación necesario para producción y posibilidad de contaminación. Por el contrario, si la cantidad de inoculación es superior a 1×10^9 UFC/g, el tiempo de fermentación puede reducirse considerablemente, pero existe la desventaja de que la producción de microorganismos de cultivo utilizados para la inoculación es un asunto problemático. En particular, dado que el rendimiento de la fermentación está muy influenciado por las características de crecimiento de la cepa de fermentación y el tipo de fermentador, es preferente que la cantidad de inoculación se determine adecuadamente considerando las características de la cepa en la etapa de producción.

La Etapa c) es una etapa de adquisición de una harina de soja fermentada por fermentación sólida de la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* inoculada en la harina de soja. Por ejemplo, la fermentación se realiza utilizando un fermentador de lecho empacado.

El fermentador de lecho empacado se divide en varios tipos, tales como reactor de tanque agitado por lotes, cerrado y continuo. El procedimiento de la presente divulgación no se limita a ninguno de ellos, siempre que sea útil para la fermentación sólida de harina de soja. Preferentemente, se puede seleccionar dependiendo de la escala de producción.

En algunos casos, la harina de soja inoculada con cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* se aplica al fermentador de lecho empacado en un grosor de 5 a 50 cm, y se fermenta a 20 a 50 °C durante 12 a 72 horas. En este momento, es preferente que el lecho lleno de harina de soja sea más grueso, y la fermentación se

realiza a 30 a 45 °C durante 12 a 48 horas. Lo más preferentemente, la fermentación se realiza a 37 °C durante 24 horas.

El procedimiento de la presente divulgación puede incluir además la etapa de secado y pulverización de la harina de soja fermentada a baja temperatura y humedad después de la Etapa c).

El agua en la harina de soja se evapora parcialmente durante el proceso de fermentación, pero el contenido residual de agua es tan alto como 20 a 50% (v/p) inmediatamente después de la fermentación. Sin embargo, el contenido de agua final preferente del producto de harina de soja fermentada es del 10 al 12% (v/p), y por lo tanto se requiere un proceso de secado.

Cuando la fermentación sólida se realiza usando la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con la presente divulgación, la harina de soja fermentada está en muy buenas condiciones, pero los conglomerados están ligeramente formados. Por lo tanto, después del proceso de secado, se requiere el proceso de pulverización de la harina de soja fermentada forme un tamaño de partícula uniforme.

Los procesos de secado y pulverización pueden realizarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Sin embargo, cuando el proceso de secado se realiza en exceso a una temperatura alta, pueden eliminarse varias bacterias vivas en la harina de soja fermentada y, por lo tanto, debe realizarse con precaución. Preferentemente, el proceso de secado se realiza a baja temperatura sin matar las bacterias vivas. Lo más preferentemente, el proceso de secado se realiza con aire caliente a baja temperatura y humedad. En el proceso de pulverización, la harina de soja fermentada puede pulverizarse a varios tamaños dependiendo de los fines de uso, y preferentemente, por medio de un molino de martillos.

Cuando la fermentación sólida de la harina de soja se realiza usando la cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente de la presente divulgación, se reducen varios factores antinutricionales que incluyen TI en la harina de soja, la tasa de digestión y absorción mejora por hidrólisis y baja molecularización de proteínas, y el contenido de proteínas crudas también se incrementa, mejorando de este modo el valor absoluto como pienso. Por consiguiente, es muy valioso como un material de pienso proteico de alta calidad que es una alternativa a las proteínas animales.

La presente divulgación también proporciona una composición de pienso que incluye la harina de soja fermentada que se produce mediante el procedimiento anterior.

El contenido de la harina de soja fermentada en la composición de pienso de acuerdo con la presente divulgación puede controlarse adecuadamente dependiendo del tipo y edad del ganado al que se aplicará, de la forma de aplicación, los efectos deseados, etc. Por ejemplo, el contenido puede ser 1 a 99% en peso, preferentemente 10 a 90% en peso, y más preferentemente 20 a 80% en peso, pero no está limitado a ello.

Para la administración, la composición de pienso de la presente divulgación puede incluir además una mezcla de uno o más de un ácido orgánico tal como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido láctico, etc.; fosfato tal como fosfato de potasio, fosfato de sodio, polifosfato, etc.; un antioxidante natural como polifenol, catequina, tocoferol, vitamina C, extracto de té verde, quitosano, ácido tánico, etc.; además de la harina de soja fermentada. Si es necesario, se puede agregar otro aditivo común, como un agente antigripal, un tampón, un agente bacteriostático, etc. Además, se puede agregar adicionalmente un diluyente, un agente dispersante, un tensioactivo, un aglutinante o un lubricante para formular la composición en una preparación inyectable tal como una solución acuosa, una suspensión, una emulsión, etc., una cápsula, un gránulo o un comprimido.

Además, la composición de pienso de la presente divulgación puede usarse junto con diversos auxiliares tales como aminoácidos, sales inorgánicas, vitaminas, un antioxidante, un agente antifúngico, un agente antimicrobiano, etc., un suplemento nutritivo, un acelerador del crecimiento, un acelerador de la digestión y absorción, y un agente profiláctico, además de los ingredientes principales que incluyen un pienso de proteína vegetal como trigo pulverizado o fragmentado, cebada, maíz, etc., un pienso de proteína animal como harina de sangre, harina de carne, harina de pescado, etc., grasa animal y aceite vegetal.

Cuando la composición de pienso de la presente divulgación se usa como un aditivo alimenticio, la composición de pienso se puede añadir tal cual o junto con otros componentes de acuerdo con el procedimiento común. La composición de pienso puede prepararse en forma de administración de una formulación de liberación inmediata o una formulación de liberación sostenida, en combinación con vehículos no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Los vehículos comestibles pueden ser almidón de maíz, lactosa, sacarosa o propilenglicol. El vehículo sólido puede estar en la forma de administración de comprimidos, polvos, grageas, etc., y el vehículo líquido puede estar en la forma de administración de jarabes, suspensiones líquidas, emulsiones, soluciones, etc. Además, el agente de administración puede incluir un conservante, un lubricante, un acelerador de solución o un estabilizador, otros agentes para mejorar las enfermedades inflamatorias y una sustancia útil para la prevención de virus.

La composición de pienso de la presente divulgación puede aplicarse a la dieta de un animal, es decir, piensos para muchos animales, incluyendo mamíferos, aves de corral, peces y crustáceos. Se puede usar en mamíferos comercialmente importantes como cerdos, ganado vacuno, cabras, etc., animales de zoológico como elefantes, camellos, etc., ganado como perros, gatos, etc. Las aves de corral comercialmente importantes pueden incluir pollos, patos, gansos, etc., y también se pueden incluir peces y crustáceos cultivados comercialmente, como la trucha y el camarón.

La composición de pienso de acuerdo con la presente divulgación se puede mezclar en una cantidad de aproximadamente 10 a 500 g, preferentemente de 10 a 100 g por 1 kg, en función del peso seco del pienso para ganado. Después de mezclarse completamente, la composición de pienso puede proporcionarse en forma de puré, o puede someterse adicionalmente a un proceso de granulación, extensificación o extrusión, preferentemente.

Efectos ventajosos

La cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* (KCCM11471P) de acuerdo con la presente divulgación es excelente en cuanto a la actividad de eliminación de factores antinutricionales, la actividad de la proteasa y la actividad antimicrobiana contra los patógenos, y ha reducido la productividad de las sustancias viscosas durante la fermentación. Por lo tanto, cuando la cepa se utiliza como microorganismo de cultivo para realizar la fermentación sólida de la harina de soja, se puede producir harina de soja fermentada de alta calidad con mejores tasas de digestión y absorción y eficiencia alimenticia debido a la baja molecularización por hidrólisis de proteínas de soja y un aumento en el contenido de proteínas crudas, una inactivación de inhibidores de la tripsina o una reducción en el contenido de factores antinutricionales como los polisacáridos no digeribles.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados del Ejemplo 1 para seleccionar cepas con alta productividad de proteasa de acuerdo con la presente divulgación;

La Figura 2 muestra los resultados de medición de la actividad de inhibición del crecimiento de las cepas con alta productividad de proteasa seleccionada en el Ejemplo 1 frente a la de *E. coli* y *Salmonella*;

La Figura 3 muestra un diagrama de flujo para seleccionar una cepa mutante con productividad reducida de sustancias viscosas de las cepas con alta productividad de proteasa de acuerdo con la presente divulgación;

La Figura 4 muestra los resultados de SDS-PAGE de gradiente de concentración para el análisis cualitativo del contenido de γ -PGA durante el proceso de selección de la cepa mutante de acuerdo con la presente divulgación, en la que:

Carril M: marcador de peso molecular
Carril 1: 1 g/l de γ -PGA estándar
Carril 2: 0,5 g/l de γ -PGA estándar
Carril 3: 0,25 g/l de γ -PGA estándar
Carril 4: cepa CJ823
Carril 5: cepa mutante U304
Carril 6: cepa mutante U305
Carril 7: cepa mutante U306
Carril 8: cepa mutante U307;

La Figura 5 es un árbol filogenético que muestra la relación filogenética de la cepa mutante *Bacillus amyloliquefaciens* K2G seleccionada de acuerdo con los procedimientos anteriores; y

La Figura 6 muestra los resultados de SDS-PAGE para el grado de hidrólisis de harina de soja fermentada que se obtiene por fermentación sólida de *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación, en la que:

Carril M: marcador de peso molecular
Carril 1: materia prima (harina de soja cruda)
Carril 2: fermentación TP6 durante 20 horas
Carril 3: fermentación K2G durante 16 horas
Carril 4: fermentación K2G durante 20 horas.

Ejemplo 1: selección de cepas con alta productividad de proteasa

Con el fin de aislar cepas que tienen una excelente productividad de proteasas, los autores de la presente invención aislaron aproximadamente 3000 tipos de microorganismos de una variedad de alimentos tradicionales fermentados (kimchi, pasta de frijoles fermentados, vino popular tradicional, pescado salado, etc.), y a partir de los mismos, se identificaron aproximadamente 1300 tipos de cepas de *Bacillus* adaptables para piensos (Korea Feed Ingredients Association, probióticos). A partir de las cepas, se pretendía encontrar cepas multifuncionales que tuvieran una alta expresión de proteasa, una actividad antimicrobiana y una tasa de crecimiento rápida.

En detalle, la selección de cepas que tienen una alta productividad de proteasa se realizó comparando el tamaño de la zona clara que se formó debido a la degradación del sustrato en la placa de agar YM que contiene leche descremada al 2% (p/v) (Difco, EE. UU.) (extracto de levadura 3,0 g, extracto de malta 3,0 g, peptona 10,0 g, agar 20,0 g) (Figura 1).

Las cepas que tienen una alta productividad de proteasa seleccionada de este modo se inocularon en medio TSB (digestión enzimática de caseína 17,0 g, digestión enzimática de harina de soja 3,0 g, NaCl 5,0 g, fosfato dipotásico 2,5 g, dextrosa 2,5 g, pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C), respectivamente, seguido de cultivo a 37 °C y 200 rpm durante 12 horas. Cada 1,0 µl de los caldos de cultivo se detectó en una placa de agar YM que contenía leche descremada. Las placas de agar se incubaron a 37 °C durante 16 horas y se midió el diámetro de la zona clara formada en la placa.

En este momento, *Bacillus subtilis* TP6 (KFCC11343P) que se ha usado como cepa de fermentación en el procedimiento convencional para producir harina de soja fermentada por fermentación sólida se usó como grupo de control (Publicación de Patente Coreana N.º 10-2011- 0027535).

Tabla 1

Nombre de la cepa	Número de la cepa	Diámetro de la zona clara (mm)	Número de la cepa	Diámetro de la zona clara (mm)
<i>Bacillus</i> sp.	TP6	3,30	CJ823	6,23
	CJ361	5,46	CJ873	5,48
	CJ400	5,88	CJ924	5,69
	CJ434	5,34	CJ933	5,20
	CJ453	6,40	CJ957	4,98
	CJ457	6,10	CJ968	4,87
	CJ739	5,86	CJ974	5,00
	CJ759	5,43	-	-

Como se muestra en la Tabla 1, se seleccionaron 14 tipos de cepas como cepas que tienen una alta productividad de proteasa, y todas mostraron una mayor actividad de la proteasa que el *Bacillus subtilis* TP6.

Ejemplo 2: aislamiento de cepas que tienen actividad inhibitoria sobre la proliferación de patógenos

Con el fin de aislar cepas capaces de inhibir el crecimiento o la proliferación de *E. coli* y *Salmonella*, que son los patógenos representativos que causan intoxicación alimentaria en el ganado y desarrollar productos no tóxicos libres de *Salmonella* aplicando las cepas en la producción de harina de soja fermentada, 14 tipos de las cepas que tenían una alta productividad de proteasa que se aislaron en el Ejemplo 1 se sometieron a medición de la actividad antimicrobiana contra los patógenos.

La actividad antimicrobiana contra los agentes patógenos se midió mediante un ensayo de manchas en el césped de *Salmonella typhimurium* (ATCC14028) y *E. coli* (KCCM11835).

En detalle, se inocularon 14 tipos de cepas con alta productividad de proteasa en medio GYP (glucosa 10,0 g, extracto de levadura 8,0 g, polipéptido 2,0 g, pH 7,0), respectivamente, seguido de cultivo líquido a 37 °C y 180 rpm por 12 horas. Cada 1,5 µl de los caldos de cultivo de las cepas que tienen una alta productividad de proteasa se detectaron en una placa de agar GYP (glucosa 10,0 g, extracto de levadura 8,0 g, polipéptido 2,0 g, agar 15,0 g, pH 7,0) a los cuales se añadió 1×10^5 UFC/ml de *Salmonella typhimurium* ATCC14028 y *E. coli* ATCC11835, seguido de cultivo estático a 37 °C durante 15 horas. Se examinó el tamaño de la zona de inhibición que se formó alrededor de las colonias de las cepas que tenían una alta productividad de proteasa manchada en la placa para determinar el título de actividad. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2. En este momento, se usó *Bacillus subtilis* TP6 como grupo de control.

Tabla 2

Nombre de la cepa	Nombre de la cepa	<i>E. coli</i> (KCCM11835)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC14028)
-------------------	-------------------	----------------------------	---

<i>Bacillus</i> sp.	TP6	+	++
	CJ361	++	++
	CJ400	++	++
	CJ434	-	-
	CJ453	-	-
	CJ457	-	-
	CJ739	+++	++
	CJ759	-	-
	CJ823	++++	++++
	CJ873	-	-
	CJ924	+++	++
	CJ933	-	-
	CJ957	-	-
	CJ968	++	++
	CJ974	+++	+

En la Tabla 2, '-' o '+' sirve para determinar el título de actividad, en función del diámetro de la zona de inhibición de bacterias vivas, y '-' indica que no hay actividad antimicrobiana o antimicrobiana, '+' indica que el diámetro la zona de inhibición es de 10,05 mm o menos, '++' indica que el diámetro de la zona de inhibición es de 10,05 a 14,05 mm, '+++'' indica que el diámetro de la zona de inhibición es de 14,05 a 17,05 mm y '++++' indica que el diámetro de la zona de inhibición es de 17,05 mm o más.

Se examinaron espectros antimicrobianos de 14 tipos de cepas que tienen una alta productividad de proteasa contra *Salmonella* y *E. coli*, que son las causas más comunes de enfermedad gastrointestinal en el ganado. Como resultado, CJ823 mostró el poder antimicrobiano más excelente. El CJ823 seleccionado mostró una actividad antimicrobiana notablemente alta contra *E. coli* (++++ vs. +) y *Salmonella* (++++ vs. ++), en comparación con el grupo control *Bacillus subtilis* TP6.

Ejemplo 3: Prueba para la aplicación de harina de soja inhibidora de la proliferación de *Salmonella*

Según los resultados del Ejemplo 2, CJ823 en la placa de agar mostró una excelente actividad antimicrobiana contra *Salmonella*. Sin embargo, se realizó el siguiente experimento para confirmar si la cepa también exhibía la capacidad de inhibición de la proliferación contra *Salmonella* durante la fermentación práctica de la harina de soja.

En detalle, tanto CJ823 como *Salmonella typhimurium* ATCC14028 se inocularon en harina de soja (contenido de humedad del 45%) que se vaporizó a 100 °C durante 30 minutos, a una densidad de $4,5 \times 10^7$ UFC/g y $1,0 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente, y los cambios en el número de células se examinaron a 37 °C y humedad constante durante 24 horas. En este momento, *Salmonella typhimurium* se inoculó individualmente en harina de soja, que se usó como grupo de control. La mezcla de *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* TP6 se inoculó en harina de soja, que se utilizó como grupo de comparación.

Las cepas se inocularon, y se tomó una cantidad predeterminada de harina de soja antes de la fermentación y después de la fermentación durante 12, 16 y 20 horas. La harina de soja se diluyó en una solución estéril de NaCl al 0,8%, y luego cada 100 µl de la misma se aplicó a una placa de agar XLD (extracto de levadura 3 g, lactosa 7,5 g, sacarosa 7,5 g, xilosa 3,5 g, L-lisina 5 g, férrico citrato de amonio 0,8 g, rojo fenol 0,08 g NaCl 5 g, desoxicolato de sodio 2,5 g, tiosulfato de sodio 6,8 g, agar 13,5 g, pH final: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C) para contar el número de colonias de *Salmonella typhimurium* y los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3.

La relación entre dos cepas se midió suponiendo que se produce contaminación por *Salmonella typhymurium* durante la proliferación de la cepa principal de fermentación CJ823 en la harina de soja al vapor. El índice de contaminación real puede diferir dependiendo de las condiciones ambientales para la producción de harina de soja fermentada.

Tabla 3

Tiempo de Fermentación	Número de <i>Salmonella typhymurium</i> (×10/g)		
	<i>Salmonella lyphymurium</i> sola	<i>Salmonella typhymurium</i> + TP6	<i>Salmonella typhymurium</i> + CJ823
0 h	2330	2330	2330

12 h	13900	2400	2000
16 h	1200000	2300	50
20 h	3100000	2200	35

Como se muestra en la Tabla 3, en el grupo de control inoculado solo con *Salmonella typhimurium*, a medida que aumentaba el tiempo de cultivo, el número de bacterias aumentaba constantemente a $3,1 \times 10^7$ UFC/g después de 20 h de fermentación. Por el contrario, en el grupo de comparación inoculado con una mezcla con *Bacillus subtilis* TP6, el número de *Salmonella typhimurium* se inhibió a 22×10^4 UFC/g. En el grupo experimental inoculado con la mezcla con el CJ823 de acuerdo con la presente divulgación, el número de *Salmonella typhimurium* se redujo adicionalmente a $3,5 \times 10^2$ UFC/g.

Estos resultados indican que CJ823 de acuerdo con la presente divulgación inhibe efectivamente el crecimiento de *Salmonella* durante un proceso de fermentación práctico, y por lo tanto es adecuado para la producción de harina de soja fermentada de alta calidad.

Ejemplo 4: selección de cepas mutantes

La cepa CJ823 seleccionada en los Ejemplos 1 a 3 produce una alta concentración de proteasa y muestra una excelente actividad antimicrobiana contra los patógenos, pero produce sustancias viscosas pegajosas debido a la polimerización del levano en forma de fructano y poliglutamato que se derivan de azúcares y proteínas de la soja cruda por las enzimas producidas durante el proceso de fermentación. La producción excesiva de las sustancias viscosas en un proceso industrial a gran escala dificulta la agitación, y existen dificultades para controlar el oxígeno disuelto en el producto fermentado, así como la temperatura y la transferencia.

Por consiguiente, los autores de la presente invención causaron mutaciones inducidas por UV en la cepa CJ823 de la siguiente manera, con el fin de desarrollar una cepa mutante que tenga una productividad reducida de sustancias viscosas mientras mantiene o mejora sus propias características enzimáticas/fisiológicas. El proceso de selección de la cepa mutante es como se muestra en la Figura 3.

Primero, se sembró CJ823 en placa de agar TSB (digestión enzimática de caseína 17,0 g, digestión enzimática de harina de soja 3,0 g, NaCl 5,0 g, fosfato dipotásico 2,5 g, dextrosa 2,5 g, agar 15,0 g, pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C) y se cultivó a 37 °C durante 12 horas para activar la cepa.

En este cultivo, se inoculó el 1% de una suspensión del microorganismo de cultivo en medio TSB (digestión enzimática de caseína 17,0 g, digestión enzimática de harina de soja 3,0 g, NaCl 5,0 g, fosfato dipotásico 2,5 g, dextrosa 2,5 g, pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C) preparado de antemano, y cultivado con agitación a 37 °C y 180 rpm. Después del cultivo, el caldo de cultivo se centrifugó a 25 °C y 8000 rpm durante 10 minutos para separar el sedimento celular y el sobrenadante. Solo se tomó el sedimento celular y se lavó con solución estéril de NaCl al 0,8%. Después del lavado, se indujo una mutación artificial por irradiación UV (254 nm) al sedimento celular recuperado usando una lámpara UV (VIBER LOURMAT, 115 V, 60 Hz).

La célula se sembró en una placa de agar TSA que contenía leche desnatada al 2% (digestión enzimática de caseína 15 g, digestión enzimática de harina de soja 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C), que es un medio de selección, y se cultiva a 37 °C durante 20 horas. Después del cultivo, el tamaño (diámetro, mm) de la zona clara formada se determinó usando Caliper (CD-20CPX, Mitutoyo, Kanagawa, Japón), y se seleccionaron principalmente 16 tipos de cepas mutantes que tienen una alta actividad proteolítica.

Posteriormente, cada uno de los 16 tipos de cepas mutantes seleccionadas de este modo se inoculó en harina de soja tratada térmicamente y se cultivó durante 20 horas, y el caldo de cultivo obtenido a partir de la misma se centrifugó a 25 °C y 8000 rpm durante 10 minutos para separar el sedimento celular y el sobrenadante. El contenido de γ -PGA en el sobrenadante se determinó midiendo el peso de γ -PGA que se recuperó después del aislamiento y purificación y liofilización de acuerdo con el procedimiento divulgado en el documento (Goto et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56:1031-1035., 1992).

La actividad de la proteasa se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, y el contenido de γ -PGA se midió mediante los siguientes dos procedimientos de análisis cualitativo y cuantitativo.

Primero, para el análisis cualitativo de la actividad γ -PGA, se mezclaron 40 μ l del sobrenadante separado con 10 μ l de solución tampón de tinción 5x, y luego se cargó en un gel de SDS-poliáamida con gradiente de 5 a 20% para realizar un gradiente de concentración SDS-PAGE. Después de la electroforesis, la proteína estándar se tiñó con un reactivo de tinte Coomassie, seguido de destinción. Luego, el ácido poli- γ -glutámico se tiñó con azul de metileno para realizar un análisis cualitativo.

Como se muestra en la Figura 4, se detectó ácido poli- γ -glutámico en el sobrenadante de CJ823 (cepa parental)

del Carril 4, pero la capacidad de producción de polímeros se redujo considerablemente y se observó una alta actividad de la proteasa en el sobrenadante de la cepa mutante U304 del Carril 5.

Mientras tanto, para el análisis cuantitativo del contenido de γ -PGA, el sobrenadante de fermentación sólida se diluyó con una cantidad igual de agua destilada, y luego se centrifugó a 20.000×g durante 20 minutos. El pH del sobrenadante obtenido se ajustó a 3,0 usando HCl 6 M y se dejó a 4 °C durante un día. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 25000×g durante 30 minutos, y luego se recuperó el sedimento. El sedimento se disolvió completamente en 100~200 veces el volumen de agua destilada, y se centrifugó a 25000×g durante 30 minutos para eliminar las impurezas. Las sales se eliminaron por diálisis a 4 °C durante un día. El resultante se liofilizó para recuperar γ -PGA, y los resultados obtenidos a partir de los mismos se muestran en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Cepa mutante	γ -PGA (g/l)	Proteasa (U/g)	Cepa mutante	γ -PGA (g/l)	Proteasa (U/g)
TP6	1,61	150	U609	6,13	15
CJ823	25,36	450	U610	11,09	450
U101	11,19	330	U611	21,77	260
U102	13,36	220	U612	12,05	400
U103	14,83	320	U813	10,12	180
U304	4,96	500	U814	23,13	370
U305	24,50	400	U815	1,06	260
U306	16,70	280	U816	5,26	100
U307	5,52	120	U1019	13,01	400

Como se muestra en la Tabla 4, la mayoría de las cepas mutantes mostraron un bajo contenido de γ -PGA, en comparación con CJ823. De ellas, finalmente se seleccionó la cepa mutante U304 que muestra la mayor actividad de la proteasa y un contenido relativamente bajo de γ -PGA. En particular, la cepa mutante U304 mostró un contenido de γ -PGA más bajo y una actividad de la proteasa tres veces o más alta que el grupo de control, *Bacillus subtilis* TP6.

La cepa mutante U304 finalmente seleccionada se caracteriza porque ha reducido la productividad de las sustancias viscosas al reducir notablemente la producción de polímeros como el ácido poli- γ -glutámico, al tiempo que mantiene las características de la cepa parental, incluida la producción de alta concentración de proteasa y excelente actividad antimicrobiana contra patógenos.

Ejemplo 5: Determinación de la secuencia de ARNr 16S de la cepa mutante U304 (K2G) y análisis filogenético

Con el fin de identificar la cepa mutante U304 que tiene una productividad reducida de sustancias viscosas, la cepa se inoculó en una nueva placa de agar NA y se cultivó a 37 °C durante 16 horas. Las colonias formadas se diluyeron con una solución estéril de NaCl al 0,8% y luego se inyectaron en una tarjeta de identificación BCL (bioMérieux Inc., Hazelwood, EE. UU.) que consta de 63 tipos de medios secos y reactivos bioquímicos, y los resultados se almacenaron integralmente en VITEK 2 Compact software (bioMérieux) cada 15 minutos, y la identificación se completó después de 14 horas.

Como un cebador universal para la identificación bacteriana mediante análisis de secuencia de ARNr 16S, se usó 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') de las SEQ ID NO: 2 y 3, y después de la amplificación de ARNr 16S por PCR, 1,333 pb que contiene una secuencia de bases de 50~900 pb, que es importante en la identificación, se tradujo usando un kit de Secuenciación de Ciclos BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Inc., EE. UU.). El resultado del análisis de la secuencia de ARNr 16S mostró que la cepa mutante U304 tiene la secuencia de ARNr 16S de la SEQ ID NO: 1.

La similitud de secuencia se determinó mediante el programa de búsqueda de similitud Blast (Instituto Nacional de Información Biotecnológica) y la posición se determinó en un árbol filogenético después de la alineación de secuencia múltiple (Figura 5).

Tabla 5

Características	Resultado	Características	Resultado
β -Xilosidasa	+	D-Manitol	+
L-Lisina-arilamidasa	-	D-Manosa	+
L-Aspartato arilamidasa	-	D-Melezitosa	-

	Características	Resultado	Características	Resultado
	Leucina arilamidasa	(+)	N-Acetil-D-glucosamina	-
5	Fenilalanina arilamidasa	+	Palatinosa	(+)
	L-Prolina arilamidasa	-	L-Ramnosa	-
	β -Galactosidasa	-	β -Glucosidasa	(+)
	L-Pirrolidonil-arilamidasa	+	β -Manosidasa	-
10	α -Galactosidasa	+	Fosforilcolina	-
	Alanina arilamidasa	+	Piruvato	+
	Tirosina arilamidasa	+	α -Glucosidasa	-
	β -N-Acetil-glucosaminidasa	(-)	D-Tagatosa	-
15	Ala-Fe-Pro arilamidasa	+	D-Trehalosa	(+)
	Ciclodextrina	-	Insulina	-
	D-Galactosa	-	D-Glucosa	(+)
	Glicógeno	-	D-Ribosa	-
	mio-Inositol	-	Asimilación de putrescina	-
20	Acidificación de Metil-A-D-glucopiranososa	+	Resistencia a Kanamicina	(-)
	Ellman	-	Resistencia a Oleandomicina	-
	Methil-D-xilosa	-	Hidrolizado de Esculina	+
	α -Manosidasa	-	Rojo de Tetrazolio	-
25	MALTOTRIOSIA	-	Resistencia a Plomixina_B	-
	Glicina ARILAMIDASA	(-)		

Los resultados de 63 tipos de pruebas bioquímicas fueron analizados por Vitec 2 Compact Software. Como resultado, la cepa se clasificó como *Bacillus subtilis*/*Bacillus amyloliquefaciens* con una probabilidad del 98%. Como se muestra en la Figura 5, los resultados del análisis filogenético mostraron que la cepa mutante U304 tiene la relación más cercana con la cepa estándar, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum FZB42T (CP000560) y la homología de secuencia de ADNr 16S fue del 99,92% (1332 pb/1333 pb).

Por lo tanto, cuando las características bioquímicas y los resultados del análisis filogenético se consideraron conjuntamente, la cepa mutante U304 de acuerdo con la presente divulgación se designó como *Bacillus amyloliquefaciens* K2G, y se depositó de conformidad con el Tratado de Budapest en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el día 7 de noviembre de 2013 con el Número de Acceso KCCM11471P.

Ejemplo 6: Cambios en el contenido de proteína cruda según el tiempo de fermentación tras la fermentación de la harina de soja usando *Bacillus amyloliquefaciens* K2G

Con el fin de examinar los cambios en el contenido de proteína cruda de acuerdo con el tiempo de fermentación tras la fermentación de la harina de soja usando *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación, se realizó el siguiente experimento.

Primero, se prepararon 400 g de harina de soja para tener un contenido de agua del 45%, y se vaporizaron a 100 °C durante 30 minutos, y luego se enfriaron a 40 °C o menos. Posteriormente, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* K2G se sembró en placa de agar TSB (digestión enzimática de caseína 17,0 g, digestión enzimática de harina de soja 3,0 g, NaCl 5,0 g, fosfato dipotásico 2,5 g, dextrosa 2,5 g, agar 15,0 g, pH final: 7,3 $\pm$ 0,2 a 25 °C) y se cultivó a 37 °C durante 12 horas para activar la cepa. Aproximadamente 2 bucles de la cepa activada se suspendieron en 9 ml de solución estéril de NaCl al 0,8% (diluida a 0,2 a A_{660nm}), y esta suspensión se usó como un microorganismo de cultivo. En este cultivo, el 1% de la suspensión del microorganismo de cultivo se inoculó en 40 ml de medio TSB (digestión enzimática de caseína 17,0 g, digestión enzimática de harina de soja 3,0 g, NaCl 5,0 g, fosfato dipotásico 2,5 g, dextrosa 2,5 g, pH final: 7,3 $\pm$ 0,2 a 25 °C) preparado de antemano y cultivado con agitación a 37 °C y 180 rpm.

Se prepararon 40 ml del caldo de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* K2G para tener un contenido de agua del 45%, se añadió a la harina de soja al vapor y se mezcló bien, seguido de cultivo estático a 37 °C y humedad constante durante 20 horas. La muestra de cultivo se secó en un secador de 60 °C hasta que el contenido de agua alcanzó el 10% o menos, y luego se midió el contenido de proteína cruda en cada muestra usando un sistema Kjeldahl (Kjtec 2100). En este momento, el contenido de proteína cruda se midió antes de la fermentación y después de la fermentación durante 12, 16 y 20 horas, y se usó *Bacillus subtilis* TP6 como grupo de control. El contenido de proteína cruda (%), corrección al 10% de humedad) medido a partir del mismo se muestra en la siguiente Tabla 6. En este momento, se usó *Bacillus subtilis* TP6 como grupo de control.

Tabla 6

Sección	TP6 (% , corrección al 10% de humedad)	K2G (% , corrección al 10% de humedad)
Harina de soja cruda	50,86±0,15	50,86±0,15
Harina de soja al vapor	50,91±0,12	50,91±0,12
0 h de fermentación	51,19±0,38	51,19±0,38
12 h de fermentación	54,21±1,18	55,59±0,66
16 h de fermentación	55,07±0,79	56,40±0,19
20 h de fermentación	55,86±0,75	57,32±0,28
24 h de fermentación	56,36±0,80	58,02±0,45

Como se muestra en la Tabla 6, en función de la fermentación de 24 horas, la harina de soja fermentada por *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación mostró el contenido de proteína cruda equivalente o superior a la harina de soja fermentada por *Bacillus subtilis* TP6 que se conoce como la cepa convencional de fermentación de harina de soja.

Estos resultados indican que *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación puede usarse eficazmente en la producción de harina de soja fermentada como un pienso proteico de alta calidad.

Ejemplo 7: Cambios en el contenido de TI según el tiempo de fermentación tras la fermentación de la harina de soja usando *Bacillus amyloliquefaciens* K2G

Con el fin de examinar los cambios en el contenido de inhibidor de la tripsina (TI) de acuerdo con el tiempo de fermentación tras la fermentación de harina de soja usando *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación, se realizó el siguiente experimento.

Específicamente, como en el Ejemplo 6, se prepararon 400 g de harina de soja para tener un contenido de agua del 45%, y se vaporizaron a 100 °C durante 30 minutos, y luego se inoculó *Bacillus amyloliquefaciens* K2G en la harina de soja al vapor a densidad de $4,5 \times 10^7$ UFC/ml, seguido de cultivo a 37 °C y humedad constante durante 24 horas. El contenido de TI se midió de acuerdo con AACC-71-10 (American Association of Cereal Chemists, 1995) antes de la fermentación y después de la fermentación durante 16, 20 y 24 horas, y el contenido de TI (mg/g) medido a partir de ello se muestra a continuación. Tabla 7. En este momento, *Bacillus subtilis* TP6 se utilizó como grupo de control.

Tabla 7

Sección	TP6 (TI, mg/g)	K2G (TI, mg/g)
Harina de soja cruda	4~5	4~5
Harina de soja al vapor	2~2,5	2~2,5
16 h de fermentación	1,26	0,39
20 h de fermentación	0,53	0,00
24 h de fermentación	0,38	0,00

Como se muestra en la Tabla 7, la harina de soja fermentada por *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación mostró un contenido de TI de 0,39 mg/g después de una fermentación de 16 horas, que corresponde al contenido en la harina de soja fermentada por *Bacillus subtilis* TP6 durante 24 horas, que se conoce como la cepa de fermentación de harina de soja convencional, lo que sugiere que la reducción de los factores antinutricionales se puede lograr a un nivel equivalente con solo una fermentación de 16 horas.

La presente divulgación es excelente porque la reducción en el tiempo de fermentación aumenta la velocidad de rotación del fermentador para aumentar el número de lotes producibles anualmente y, por consiguiente, los consumidores pueden recibir harinas de soja fermentadas de alta calidad a un costo menor.

Ejemplo 8: Medición del grado de hidrólisis de la proteína de soja y su solubilidad en KOH tras la fermentación de la harina de soja usando *Bacillus amyloliquefaciens* K2G

La harina de soja es una materia prima alimenticia vegetal que tiene un alto contenido de proteínas, pero tiene la desventaja de que es insuficiente, en particular para el ganado joven, debido a factores antinutricionales y proteínas que tienen una baja tasa de digestión y absorción. Uno de los procedimientos para mejorar esta desventaja es preparar las proteínas en forma de péptidos hidrolizados o degradarlas en proteínas de bajo peso molecular que sean fácilmente digeribles por fermentación utilizando un microorganismo. *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación es una cepa que tiene una alta productividad de proteasa, y por lo tanto se esperaba que las proteínas de soja en la harina de soja fermentada preparada usando la misma puedan degradarse por la proteasa secretada por la cepa.

Para confirmar lo anterior, primero se midió el grado de hidrólisis de la harina de soja fermentada de acuerdo con la presente divulgación. Como en el Ejemplo 6, se prepararon 400 g de harina de soja para tener un contenido de agua del 45%, y se vaporizaron a 100 °C durante 30 minutos, y luego se inoculó *Bacillus amyloliquefaciens* K2G en la harina de soja al vapor a una densidad de $4,5 \times 10^7$ UFC/ml, seguido de cultivo a 37 °C y humedad constante durante 24 horas. El caldo de cultivo obtenido a partir del mismo se centrifugó a 25 °C y 8000 rpm durante 10 minutos para separar el sedimento celular y el sobrenadante. Se mezclaron 40 µl del sobrenadante separado con 10 µl de solución tampón de tinción 5x, y luego se realizó SDS-PAGE (10%) para examinar la migración de las proteínas de acuerdo con su peso molecular. Después de la electroforesis, el gel de poliamida se tiñó con Coomassie Brilliant R250 para examinar la composición y el peso molecular de la proteína, y los resultados se muestran en la Figura 6. En este momento, la harina de soja cruda y la harina de soja fermentada preparada por *Bacillus subtilis* TP6 se utilizaron como grupos de control.

Como se muestra en la Figura 6, se encontró que la harina de soja fermentada preparada por *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación mostró una alta densidad de proteínas en la región de bajo peso molecular, en comparación con la harina de soja cruda y la harina de soja fermentada preparada por otra cepa. En el gel de SDS-poliamida, las bandas superiores indican proteínas de alto peso molecular y las bandas inferiores indican proteínas de bajo peso molecular. Estos resultados indican que en el caso de las harinas de soja que tienen los mismos pesos moleculares, las proteínas de alto peso molecular en la harina de soja fermentadas por *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación se hidrolizan en proteínas de bajo peso molecular.

Según los informes anteriores, la suplementación dietética de pollos de engorde se realizó cuatro veces usando la harina de soja que muestra una solubilidad de KOH (hidróxido de potasio) del 80% y la harina de soja que muestra una solubilidad más baja (55% a 68%). Como resultado, el peso, la ingesta alimenticia y la eficiencia alimenticia de los pollos de engorde que fueron alimentados con harina de soja con baja solubilidad en KOH fueron notablemente bajos o disminuidos, en comparación con los pollos de engorde alimentados con harina de soja con una solubilidad en KOH del 80% (Abulto et al. J. Appl. Poult. Res. 7:189-195, 1998b).

Por lo tanto, la solubilidad en KOH de la harina de soja fermentada de acuerdo con la presente divulgación se midió de acuerdo con el procedimiento divulgado en el documento (Parsons et al. J Anim Sci., 69: 2918-24, 1991). A modo de resumen, se añadió 1,0 g de la harina de soja fermentada preparada de este modo a una solución de KOH al 0,2% y se mezcló durante 20 minutos, seguido de filtración. El contenido de nitrógeno en el filtrado se midió usando un sistema Kjeldahl y se convirtió en solubilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Sección	TP6 (KOH, %)	K2G (KOH, %)
Harina de soja cruda	80,17±2,38	80,17±2,38
Harina de soja al vapor	73,35±3,32	73,35±3,32
16 h de fermentación	78,38±2,85	85,03±3,07
24 h de fermentación	78,99±3,01	85,20±3,60

Como se muestra en la Tabla 8, la solubilidad de KOH de la harina de soja al vapor se redujo del 80% al 70%, pero la solubilidad de KOH se incrementó al 85% durante la fermentación sólida por *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación. Estos resultados sugieren que el KOH se incrementó debido a la degradación de las proteínas de soja por la proteasa secretada por *Bacillus amyloliquefaciens* K2G de acuerdo con la presente divulgación.

Aplicabilidad industrial

La cepa K2G de *Bacillus amyloliquefaciens* (KCCM11471P) de acuerdo con la presente divulgación es excelente en cuanto a la actividad de eliminación de factores antinutricionales, la actividad de la proteasa y la actividad antimicrobiana contra patógenos, y ha reducido la productividad de sustancias viscosas durante la fermentación. Por lo tanto, cuando la cepa se utiliza como microorganismo de cultivo para realizar la fermentación sólida de la harina de soja, se puede producir harina de soja fermentada de alta calidad con mejores tasas de digestión y absorción y eficiencia alimenticia debido a la baja molecularización por hidrólisis de proteínas de soja y un aumento en el contenido de proteínas crudas, inactivación de inhibidores de tripsina o una reducción en el contenido de factores antinutricionales como los polisacáridos no digeribles.

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> Cepa de Bacillus sp. con productividad mejorada de harina de soja fermentada y procedimiento de producción de harina de soja fermentada mediante el uso de la misma

5 <130> OPA14202-PCT
 <150> KR 10-2014-0010729
 <151> 2014-01-28

 <160> 3

10 <170> KopatentIn 2.0

 <210> 1
 <211> 1333
 <212> ADN

15 <213> Bacillus amyloliquefaciens K2G 16s ARNr

 <400> 1

ES 2 742 889 T3

	acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat	60
	ggttgtctga accgcatggt tcagacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg	120
5	acccgcggcg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc	180
	gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg	240
10	cagcagtagg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga	300
	tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga acaagtgccg ttcaaatagg	360
	gcggcacctt gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgccg gcagccgcgg	420
15	taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagggtc gcaggcgggt	480
	tcttaagtct gatgtgaaag ccccggtc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa	540
20	cttgagtgca gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg	600
	gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaaagc	660
	gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag	720
25	tgtagggggg tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga	780
	gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca	840
30	tgtggtttta ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc	900
	ctagagatag gacgtcccct tcgggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgcgtcagc	960
	tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagtgtcc	1020
35	agcattcagt tgggcaactc aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg	1080
	acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca	1140
40	aagggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc	1200
	agtctgcaac tcgactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg	1260
45	gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc	1320
	cgaagtcggt gag	1333
50	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Cebador universal 518F	
	<400> 2 ccagcagccg cgtaatacg 20	
60	<210> 3 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65		

<220>

<223> Cebador universal 800R

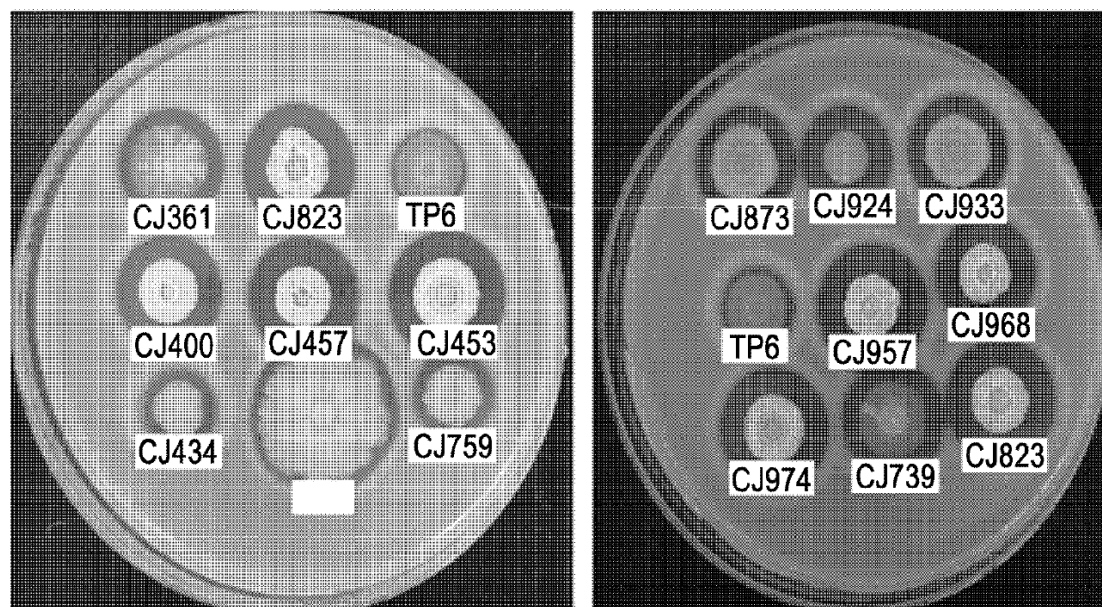
<400> 3

5 taccagggtatctaatcc 18

REIVINDICACIONES

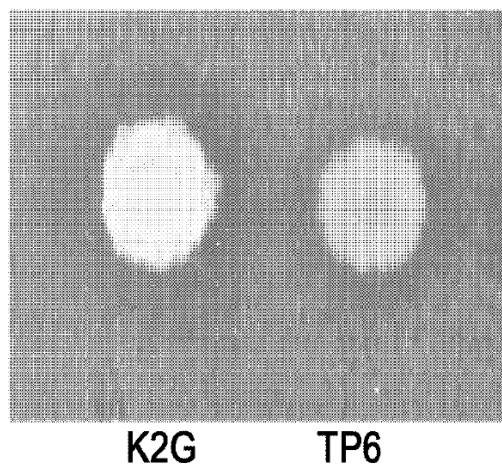
1. Un procedimiento de producción de una harina de soja fermentada por fermentación sólida, que comprende
inocular la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con Número de Acceso KCCM11471P en una harina de soja.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - a) agregar agua a una harina de soja para realizar un tratamiento térmico;
 - b) enfriar la harina de soja tratada térmicamente e inocular la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*
con Número de Acceso KCCM11471P en la misma; y
 - c) obtener una harina de soja fermentada mediante cultivo sólido de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con Número de Acceso KCCM11471P inoculada en la harina de soja.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la harina de soja con agua añadida en la Etapa a) tiene un contenido de agua del 30 al 80% (v/p).
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tratamiento térmico de la Etapa a) se lleva a cabo calentando la harina de soja a una temperatura de 70 a 130 °C durante 10 a 30 minutos.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la harina de soja en la Etapa b) se enfría a una temperatura de 30 a 50 °C.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el número de cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* con Número de Acceso KCCM11471P inmediatamente después de la inoculación en la Etapa b) está en un intervalo de 1×10^5 a 1×10^9 UFC/g.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el cultivo sólido en la Etapa c) se realiza a una temperatura de 30 a 45 °C durante 12 a 48 horas.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, que además comprende la etapa de secar y pulverizar la harina de soja fermentada obtenida en la Etapa c).
9. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con Número de Acceso KCCM11471P.

[FIG. 1]

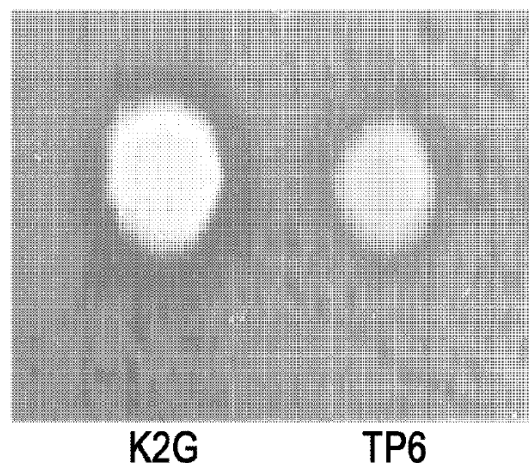


[FIG. 2]

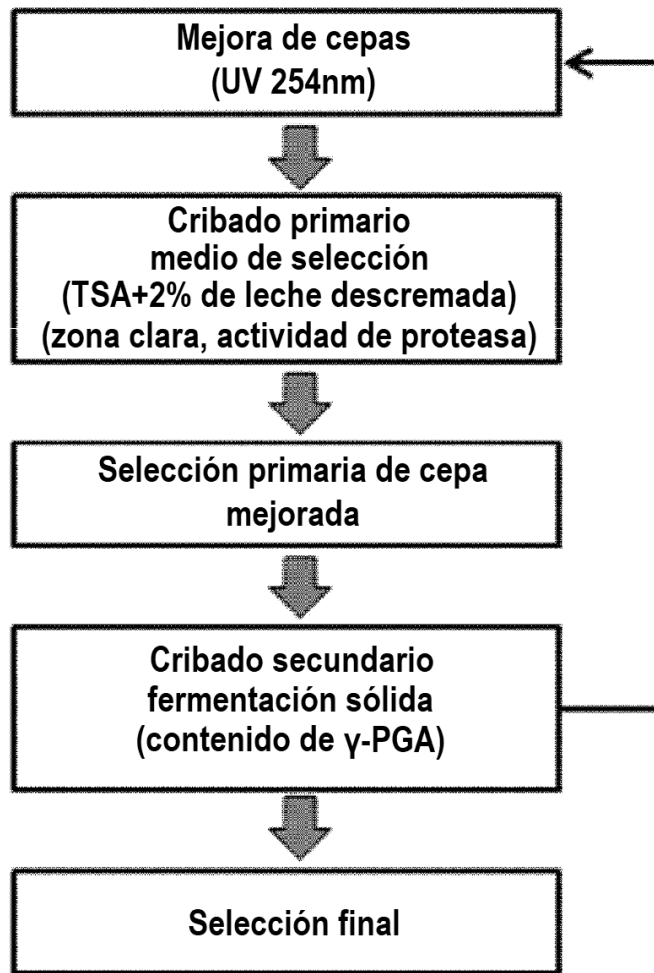
S. typhimurium (ATCC14028)



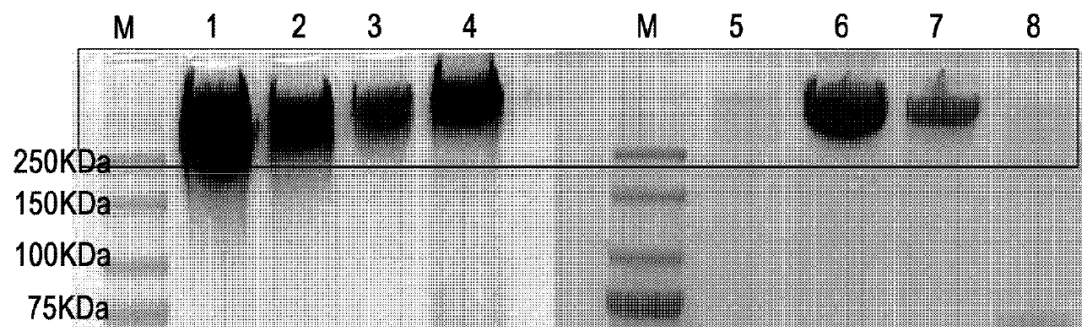
E. coli (KCCM11835)



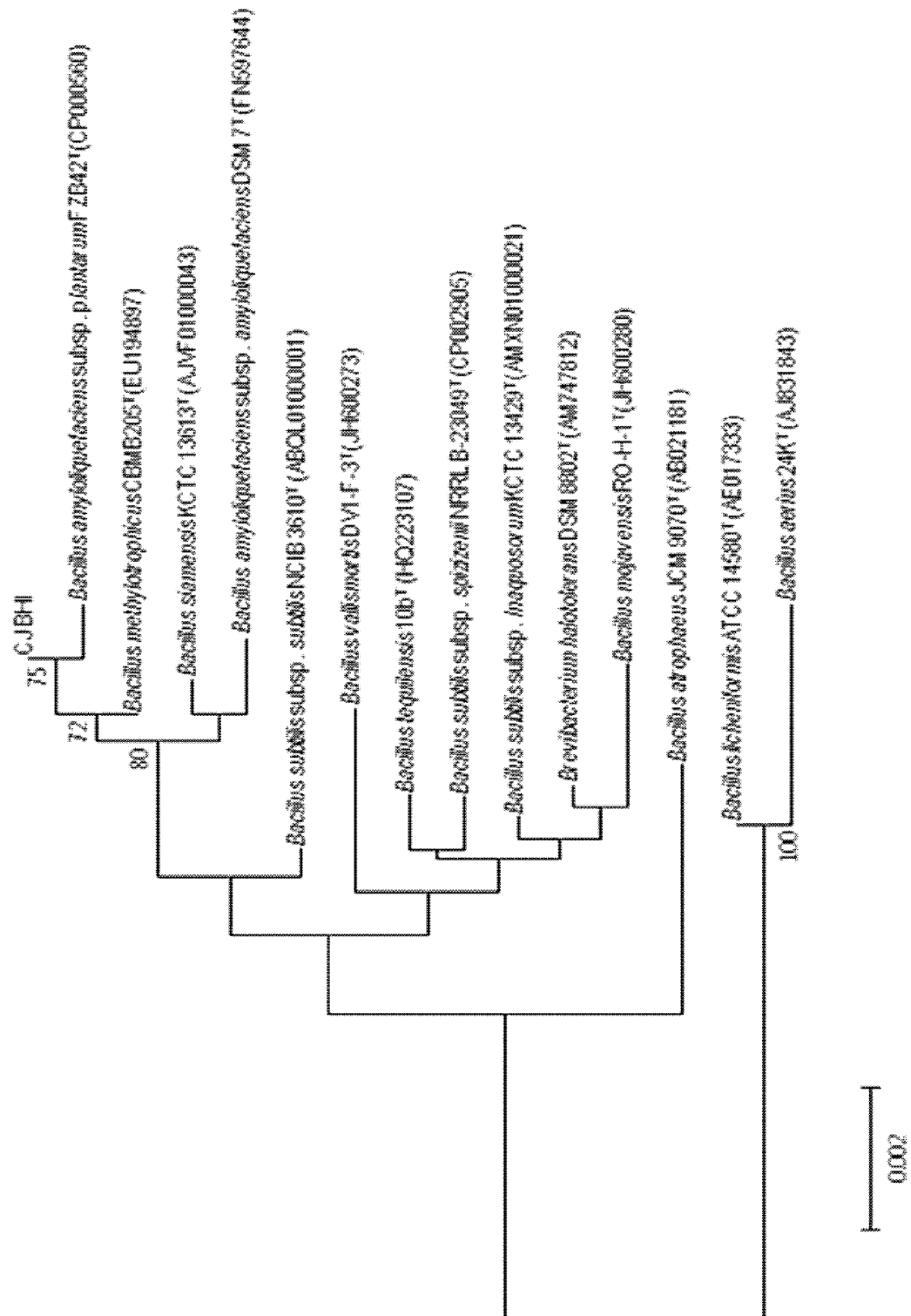
[FIG. 3]



[FIG. 4]



[FIG. 5]



[FIG. 6]

