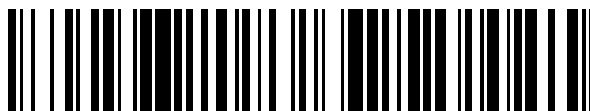


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 764**

51 Int. Cl.:

C11B 1/02 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2010 E 10800922 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2515674**

54 Título: **Proceso de biodegradación y composición**

30 Prioridad:

23.12.2009 US 289706 P

29.01.2010 US 299869 P

16.06.2010 US 355365 P

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

02.06.2016

73 Titular/es:

AGRINOS AS (100.0%)

Fornebuveien 1

1366 Lysaker, NO

72 Inventor/es:

LÓPEZ-CERVANTES, JAMIE;

SÁNCHEZ-MACHADO, DALIA ISABEL y

ROCHIN, KARL REINER FICK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 572 764 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

Proceso de biodegradación y composición

5 **Campo técnico**

Se describen una composición microbiana novedosa y procesos microbianos para tratar subproductos de animales marinos y en algunos casos el animal marino completo para producir fracciones sólidas, líquidas y lipídicas que contienen compuestos útiles.

10

Antecedentes de la invención

El procesamiento de peces y artrópodos marinos, tales como camarón, cangrejo y cangrejo de río, produce grandes cantidades de subproductos marinos. La mayoría, se usan en productos finales de gama baja tales como fertilizantes, ensilaje de pescado y alimento para mascotas pero los subproductos no usados poseen una carga económica para las industrias de procesamiento de productos marinos a causa de la necesidad de desechar dichos residuos de un modo ambientalmente racional. Algunos estiman que dichos subproductos representan el 25 % de la producción total capturada por pesadores.

15

20

Por ejemplo, durante el proceso del camarón para su posterior congelado y comercialización, se genera una gran cantidad de restos ya que el 35 % del animal no es comestible y debe desecharse. Estos remanentes o subproductos están compuestos del cefalotórax y exoesqueleto del camarón. Sin embargo, estos subproductos de camarón son ricos en sustancias de alto valor, tales como quitina, proteína, lípidos, pigmentos carotenoides (astaxantina) y minerales. La mayoría de los subproductos no comestibles se desechan en vertederos o se devuelven al océano, causando de ese modo graves problemas ambientales y considerables pérdidas a la industria de procesamiento del camarón. Actualmente, solamente una pequeña cantidad de estos subproductos se usan como suplemento para piensos de animales.

25

30

La técnica más común para la utilización de subproductos de camarón es secado al sol. Esta técnica tiene bajo control higiénico y los productos se usan principalmente para consumo por animales. Otros métodos emplean ácidos químicos y álcalis a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos para la extracción de quitina y recuperación de hidrolizados proteicos. Sin embargo, estos métodos causan una despolimerización y desacetilación parcial de la quitina. Además, estos métodos complican la recuperación de otros productos, tales como proteínas y pigmentos.

35

Se han desarrollado métodos enzimáticos para la extracción de quitina, hidrolizados líquidos y pigmentos. Dichos métodos usan extractos enzimáticos o aislados enzimáticos. Otros estudios han informado del uso de enzima microbiana, tales como alcalasa comercial, para la extracción de proteínas para subproductos de camarón y animales marinos. Se ha informado de la combinación de alcalasa y pancreatina para la extracción de quitina, proteína hidrolizada y lípidos pigmentados.

40

45

Se han usado procesos de fermentación láctica como sustituto para los anteriores procesos químicos y enzimáticos. La fermentación representa una técnica rentable que estabiliza y retiene la calidad nutricional de los subproductos. Las condiciones óptimas para la fermentación dependen de varios factores, incluyendo la elección y concentración de carbohidratos, pH, temperatura, tiempo, y la elección de condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Otro factor importante es la elección de microorganismo y la concentración inicial del inóculo. Para facilitar el proceso de fermentación de subproductos de camarón, se han usado cultivos puros de bacterias acidolácticas (LAB). Dicha LAB incluye *Lactobacillus plantarum* (Rao, M.S., Stevens, W.F., 2006, "Fermentation of shrimp biowaste under different salt concentrations with amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains for chitin production," *Food Technology and Biotechnology* 44, 83-87; Rao, M.S., Muñoz, J., Stevens, W.F., 2000, "Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste," *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 808-813; Bhaskar, N., Suresh, P.V., Sakhare, P.Z., Sachindra, N.M., 2007, "Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidilactici* CFR2182: optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery," *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1427-1434), *Lactobacillus sp. B2* (Cira, L.A., Huerta, S., Hal, G.M., Shirai, K., 2002, "Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for chitin recovery," *Process Biochemistry* 37, 1359-1366; Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzalez, R.O., Hall, G.M., 2001, "Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilage," *Enzyme and Microbial Technology* 28, 446-452), *Lactobacillus casei* (Shirai 2001), *Lactobacillus paracasei* (Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, Y.J., Oh, K.T., Park, R.D., 2007, "Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3," *Carbohydrate Polymers* 68, 746-750), *Lactobacillus pentosus* (Bautista, J., Jover, M., Gutierrez, J.F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E., Iglesias, F., Vega, J., 2001, "Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production," *Process Biochemistry* 37, 229-234; Shirai 2001), *Lactobacillus acidophilus B4495* and *Lactobacillus lactis* (Bhaskar 2007), *Lactobacillus salvarus* (Beaney 2005), *Enterococcus faecium* (Beaney 2005), *Pediococcus acidilactici* (Bhaskar 2007) y *Pediococcus sp. L1/2* (Choorit, W., Patthanamane, W., Manurakchinakorn, S., 2008, "Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells," *Biores. Technol.* 99, 6168-6173). Además, se ha usado una mezcla de cuatro LAB

65

(Bhaskar 2007) y existen informes del uso de *Lactobacillus* en combinación con *Serratia marcescens* FS-3 (Jung 2007) o *Staphylococcus carnosus* (Shirai 2001). Sin embargo, la industrialización de dichos procesos de fermentación no ha sido satisfactoria debido al mal rendimiento de los inoculantes comerciales.

5 La fermentación láctica de subproductos de camarones produce hidrolizados proteicos, quitina, minerales, y lípidos. La quitina y sus derivados desacetilados tienen muchas aplicaciones en agricultura, biomedicina, alimentos y la industria del papel, mientras que el hidrolizado líquido es una fuente excelente de aminoácidos esenciales que pueden usarse para consumo humano o animal. La pasta lipídica contiene esteroides, vitamina A y E, y pigmentos carotenoides tales como astaxantina que puede usarse en pienso para salmónidos o como colorante natural en la industria alimentaria.

15 La quitina es un polisacárido natural encontrado particularmente en el exoesqueleto de crustáceos, las cutículas de insectos y las paredes celulares de hongos. Como la quitina es uno de los biopolímeros más abundantes, se ha puesto mucho interés en sus aplicaciones biomédicas, biotecnológicas e industriales. Las quitosanas son compuestos de poli-(β-1-4)-N-acetil-D-glucosamina producidos por la desacetilación de quitina (β-1-4)-N-acetil-D-glucosamina. La glucosamina es un aminomonosacárido obtenido por despolimerización de quitosana. Participa en la constitución de glucosaminoglicanos, una clase principal de polisacáridos complejos extracelulares. El sulfato de glucosamina, clorhidrato de glucosamina y N-acetil-glucosamina se usan habitualmente solos o como parte de una mezcla.

20 En líneas generales, el hidrolizado líquido tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales, que indica un alto valor nutritivo que justifica su uso como suplemento para nutrición animal y acuícola o como fuente de nitrógeno en medios de cultivo para microorganismos. Adicionalmente, estos hidrolizados son una fuente de aminoácidos libres y pueden usarse para la nutrición en plantas como bioestimulante.

25 La astaxantina (3,3'-dihidroxi-β,β-caroteno-4,4'-diona), un cetocaroteno oxidado a partir de β-caroteno, existe de forma natural en una amplia diversidad de organismos marinos y acuáticos. Debido a su atractivo color rosa, sus funciones biológicas como precursor de vitamina A, y actividad antioxidante, la astaxantina puede usarse como colorante en alimentos y en medicina. En la estructura de la astaxantina, se encuentran dos átomos idénticos de carbono asimétrico en C3 y C3'. Sin embargo, la trans-astaxantina es el carotenoide cuantitativamente más prevalente en especies de crustáceos.

35 Referencias que describen estos y otros productos de la fermentación láctica incluyen: Sanchez-Machado et al. "Quantification of organic acids in fermented shrimp waste by HPLC" Food Technology and Biotechnology, volumen 46, 456 (2008); Sanchez-Machado et al. "High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for quantitation of tryptophan and tyrosine in a shrimp waste protein concentrate", Journal of Chromatography B, volumen 863, 88 (2008); Lopez-Cervantes et al., "Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC" Journal of Chromatographic Science, volumen 45, 1 (2007); Lopez-Cervantes et al., "Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC" Biomedical Chromatography, volumen 20, 981 (2006); Lopez-Cervantes et al., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate" Journal of Chromatography A, volumen 1105, 1-2 (2006); Lopez-Cervantes et al., "Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, volumen 1105, 1 (2006).

45 El documento CN 101 564 081 describe un método para la producción de un sustituto de harina de pescado, donde se mezclan bacterias de las especies *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus casei* y se cultivan en un medio de cultivo líquido. Este cultivo se añade a un medio de expansión sólido tal como camarones y se fermenta durante 12 a 15 días a 30 °C a 35 °C a un pH de 5 a 6.

50 El documento CN 101 139 223 describe la producción de un fertilizante de plantas por fermentación de, por ejemplo, harina de pescado usando una mezcla de bacterias que comprende *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus*.

55 El documento CN 101 422 210 describe la preparación de un aditivo de pienso para fermentación sólida de proteína vegetal y residuos que contienen quitina tales como cabezas y carcasas de camarones. La fermentación se realiza a través de una mezcla de bacterias que comprende *Bacillus sp*, *Lactobacillus sp*, y *Streptococcus* a un pH de 6,5 a 7,0 y una temperatura de 30 °C a 50 °C. El documento KR 2009 0085754 describe una composición probiótica para el ganado que comprende, por ejemplo, quitosana de carcasas de cangrejo y una mezcla de bacterias que comprende, por ejemplo, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei* y/o *Lactobacillus acidophilus*.

60 Bueno-solano et al. (2009) describe la fermentación de subproductos de camarón a una temperatura de 30 °C a 36 °C y un pH de 6,5 usando un "inóculo comercial" y la posterior centrifugación del caldo de fermentación para obtener, entre otros, una fracción rica en quitina.

65 Se describen una composición microbiana y procesos de biodegradación.

Una composición microbiana descrita comprende (a) una o más bacterias acidolácticas (LAB) y (b) uno o más o dos o más microorganismos seleccionados del grupo de géneros que consiste en *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Nitrobacter* y *Proteus*. En realizaciones preferidas al menos uno de los *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Nitrobacter* y *Proteus* es una cepa quitinolítica que produce una quitinasa (por ejemplo, endoquitinasa y/o exoquitinasa). En algunas composiciones microbianas la LAB se selecciona de los géneros que consisten en *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus*. Cuando la LAB es *Lactobacillus*, la LAB puede ser *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei* tal como *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) y *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

El *Bacillus* en esta composición puede seleccionarse del grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus thuringiensis* tales como *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008) y *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT).

El *Azotobacter* en esta composición puede ser *Azotobacter vinelandii* tal como *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008).

El *Trichoderma* en esta composición puede ser *Trichoderma harzianum* tal como *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL).

El *Rhizobium* en esta composición puede ser *Rhizobium japonicum* tal como *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008).

El *Clostridium* en esta composición puede ser *Clostridium pasteurianum* tal como *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008).

Las *Pseudomonas* en esta composición pueden ser *Pseudomonas fluorescens* tal como *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008).

Otra composición microbiana descrita comprende un o más o dos o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Bacillus subtilis* ((SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008).

Una composición microbiana descrita puede comprender *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) y/o *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

Otra composición microbiana descrita más puede comprender *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73, *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008).

La presente composición microbiana es HQE. HQE se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, Estados Unidos el 27 de abril de 2010 y se le dio la Patent Deposit Designation PTA-10861.

También se describen microorganismos aislados seleccionados del grupo que consiste en *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008).

El presente proceso de biodegradación comprende mezclar un animal marino o subproducto de animal marino con HQE para formar una mezcla; fermentar la mezcla; y separar la mezcla en fracciones sólidas, acuosas y lipídicas. A diferencia de los procesos de biodegradación de la técnica anterior, el proceso de biodegradación descrito produce quitosana y glucosamina que puede encontrarse en la fracción acuosa. El animal marino es preferiblemente un artrópodo marino, tal como, camarón, cangrejo de río, cangrejo o kril. En algunas realizaciones, el animal marino es un pez o un subproducto de pescado tal como piel, músculo u órgano de peces.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra esquemáticamente un proceso de degradación preferido para subproductos de camarón.

La Figura 2 representa el pH y la acidez titulable total durante la fermentación láctica de los subproductos de camarón.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, la expresión "animal marino" se refiere a cualquier animal que vive en océanos, mares o agua dulce. Los animales marinos incluyen peces y artrópodos marinos.

Como se usa en este documento, la expresión "artrópodo marino" se refiere a un animal marino invertebrado que tiene un exoesqueleto que vive en océanos, mares o agua dulce. Generalmente los artrópodos marinos tienen un cuerpo segmentado, y apéndices unidos. Los artrópodos marinos son miembros del subfilo *Crustacea*. Clases preferidas de *Crustacea* incluyen *Branchiopoda* (por ejemplo, camarones de salmuera, Cladocera y Triops), *Cephalocardia* (por ejemplo, camarón de herradura), *Maxillopoda* (por ejemplo, barnacles y copépodos (zooplancton)), *Ostracoda* (por ejemplo, ostrácodos) y *Malacostraca* (por ejemplo, cangrejos, langostas, camarón, kril, etc.).

Como se usa en este documento, el término "subproducto" se refiere a cualquier parte de un animal marino. En algunas realizaciones el subproducto se produce mediante el procesamiento comercial del animal marino. Por ejemplo, en la industria del camarón, el cefalotórax y el exoesqueleto son subproductos de camarón. En la industria del procesamiento de cangrejos y langostas el exoesqueleto (carcasa) es un subproducto.

En algunas realizaciones, puede usarse el artrópodo completo en el proceso de biodegradación. Por ejemplo, mucho kril es de aproximadamente 1-2 centímetros (0,4-0,8 in) de longitud como adultos pero unas pocas especies crecen hasta tamaños del orden de 6-15 centímetros (2,4-5,9 in). El aceite de kril contiene al menos tres componentes: (1) ácidos grasos omega-3 similares a los del aceite de pescado, (2) ácidos grasos omega-3 conjugados con fosfolípidos y (3) el antioxidante astaxantina. Además, el exoesqueleto, contiene fluoruro. Por consiguiente, estos componentes pueden separarse en el proceso de biodegradación con los componentes oleosos que se están aislando en la fracción lipídica y el fluoruro en la fracción líquida.

Como se usa en este documento, la expresión "composición microbiana" se refiere a un medio líquido, sólido o gelatinoso que contiene o soporta físicamente uno o más microorganismos, preferiblemente dos o más. Las composiciones microbianas incluyen, aunque sin limitación, caldos de fermentación que contienen uno o más microorganismos e inóculos que se usan generalmente para iniciar un caldo de fermentación y que contiene mayor concentración de los microorganismos que lo que está presente en el caldo de fermentación. Las composiciones microbianas que contienen especies/cepas a veces se mencionan como "composiciones microbianas Bioderpac" que se refiere a una composición que contiene uno o más de los microorganismos o una combinación de uno o más microorganismos con otros microorganismos.

Como se usa en este documento, la expresión "microorganismo aislado" se refiere a un medio líquido, sólido o gelatinoso que contiene o soporta físicamente un microorganismo.

Las composiciones microbianas descritas o microorganismos aislados pueden combinarse con otros microorganismos para formar una nueva composición microbiana que puede usarse para procesos diferentes a los descritos específicamente en este documento.

Una composición microbiana descrita puede comprender (a) una o más bacterias acidolácticas (LAB) y (b) uno o más o dos o más microorganismos seleccionados del grupo de géneros que consiste en *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Nitrobacter* y *Proteus*. Por ejemplo, al menos uno o más, dos o más o tres o más de los *Bacillus*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Nitrobacter* y *Proteus* es una cepa quitinolítica que produce una quitinasa (por ejemplo, endoquitinasa y/o exoquitinasa). En algunas composiciones microbianas, la LAB puede seleccionarse de los géneros que consisten en *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus*. Cuando la LAB es *Lactobacillus*, la LAB puede ser *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei* tal como *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) y *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

El *Bacillus* en esta composición puede seleccionarse del grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus thuringiensis* tal como *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), - , *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008) y *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT).

El *Azotobacter* en esta composición puede ser *Azotobacter vinelandii* tal como *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008).

El *Trichoderma* en esta composición puede ser *Trichoderma harzianum* tal como *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL).

5 El *Rhizobium* en esta composición puede ser *Rhizobium japonicum* tal como *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008).

El *Clostridium* en esta composición puede ser *Clostridium pasteurianu* tal como *Clostridium pasteurianu* (Bioderpac, 2008).

10 Las *Pseudomonas* en esta composición pueden ser *Pseudomonas fluorescens* tal como *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008).

15 Otra composición microbiana descrita puede comprender uno o más o dos o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Bacillus subtilis* ((SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008).

20 Otra composición microbiana descrita comprende *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008) y/o *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008).

25 Otra composición microbiana descrita más comprende *Bacillus subtilis* ((SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL®BT), *Streptomyces* (Bioderpac, 2008), *Micrococcus* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter* (Bioderpac, 2008) y *Proteus* (Bioderpac, 2008).

35 La composición microbiana para su uso en el proceso de biodegradación es HQE. HQE se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, Estados Unidos el 27 de abril de 2010 y se le dio la Patent Deposit Designation PTA-10861. HQE es un consorcio microbiano compuesto por microorganismos derivados de suelos fértiles y microorganismos de fuentes comerciales. Los microorganismos de fuentes comerciales incluyen *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus thuringiensis* cepas ND-1 y HD-73 (SILoSIL® BT) y *Trichoderma harzianum* cada uno obtenido de Biotecnología Agroindustrial S.A. DE C.V., Morelia, Michoacan, Mexico Microorganisms denominado "Bioderpac 2008" por la cepa o especie y la cepa puede obtenerse de HQE. Sin embargo, también pueden usarse subconjuntos de los microorganismos en HQE. Los microorganismos *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus thuringiensis* (SILoSIL® BT) y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL) producen enzimas quitinolíticas que son especialmente importantes al inicio de la biodegradación. Las enzimas quitinolíticas ayudan a degradar sólidos que contienen quitina que pueden constituir una barrera para la digestión posterior. Estos organismos también producen proteasas, lipasas y otras enzimas que facilitan la descomposición de proteínas, lípidos y carbohidratos.

45 Como se usa en este documento, el término "HYTb" se refiere a una fracción acuosa obtenida del proceso de biodegradación. HYTb contiene normalmente aminoácidos (aproximadamente el 3 % en peso al 12 % en peso, habitualmente aproximadamente el 12 % en peso) quitosana (aproximadamente el 1,2 % en peso) glucosamina (aproximadamente el 1 % en peso) y elementos traza (aproximadamente el 6 % en peso) incluyendo calcio, magnesio, zinc, cobre, hierro y manganeso. La cantidad de quitosana puede variar entre aproximadamente el 0,5 % en peso y el 1,5 % en peso, más preferiblemente entre aproximadamente el 1,0 % en peso y el 1,5 % en peso. La cantidad de glucosamina puede variar entre aproximadamente el 0,5 % en peso y el 1,5 % en peso, más preferiblemente entre aproximadamente 1,0 % en peso y el 1,5 % en peso. El total de quitosana y glucosamina es de aproximadamente el 2,0 al 2,5 % en peso. HYTb también contiene enzimas tales como enzimas lácticas, proteasas, lipasas quitinasas, ácido láctico, polipéptidos y otros carbohidratos. La gravedad específica de HYTb es normalmente de aproximadamente 1,050-1,054. El contenido promedio de aminoácidos en HYTb para ciertos aminoácidos se expone en la Tabla 1.

Tabla 1
Perfil de aminoácidos de hidrolizados de polvo seco (mg por gramo de peso seco)

Aminoácido	Hidrolizados en polvo seco
Ácido aspártico	38
Ácido glutámico	39
Serina	16
Histidina*	9

Glicina	28
Treonina*	14
Alanina	36,1
Prolina	25,8
Tirosina*	70
Arginina	22,2
Valina*	20
Metionina*	16,4
Isoleucina*	18,3
Triptófano*	3,1
Leucina*	23
Fenilalanina*	39
Lisina*	13
Total	431
*Aminoácidos esenciales	226

5 HYTb se produce normalmente por la centrifugación del producto de fermentación formado por el producto de biodegradación. Según procede el proceso de biodegradación, los nutrientes para los microorganismos HQE usados para el proceso de biodegradación, por ejemplo, se agotan y el pH baja debido al ácido producido durante la fermentación. Esto causa que los microorganismos en el producto de fermentación mueran o queden inactivos. Dependiendo de la fuerza g y el tiempo de la centrifugación del producto de fermentación, dichos microorganismos pueden encontrarse en HYTb. Por consiguiente, HYTb puede incluir uno cualquiera o más de los componentes identificados anteriormente, por ejemplo, quitosana y glucosamina, en combinación con todos o parte de los componentes microbianos del proceso de fermentación que están presentes cuando se detiene. Como alternativa, la centrifugación puede proceder hasta un punto donde están agotados sustancialmente todos los componentes microbianos de HYTb. En dichos casos, el componente microbiano puede centrifugarse en la fracción HYTc. Como alternativa, HYTc puede separarse de HYTb por centrifugación de baja g. La HYTb entonces puede centrifugarse para formar un sedimento de microorganismos y una solución acuosa HYTb libre de microorganismos.

15 Como se usa en este documento, el término "HYTc" se refiere a la fracción sólida obtenida del proceso de biodegradación. El componente principal de HYTc es quitina. Normalmente tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2300 dalton y constituye aproximadamente el 64 % en peso de la composición. Aproximadamente el 6 % de HYTc contiene minerales que incluyen calcio, magnesio, zinc, cobre, hierro y manganeso, aproximadamente el 24 % en peso de proteína y el 6% de agua. Tiene una gravedad específica de aproximadamente 272 kg/m³. La quitina en HYTc normalmente tiene microorganismos del producto de fermentación asociado con el mismo. Los microorganismos quitinolíticos tienen una propensión a asociarse con quitina sólida. Esto se basa en la afinidad de los microorganismos quitinolíticos por el sustrato quitina. Por consiguiente, HYTc también puede contener microorganismos quitinolíticos salvo que se emprendan etapas para retirarlos. En el caso de HQE, dichos microorganismos quitinolíticos incluyen uno o más de los microorganismos productores de quitinasa y/o exoquitinasa analizados en este documento. Dichos microorganismos incluyen *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS) 20 *Bacillus thuringiensis* cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT), y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL). Los microorganismos quitinolíticos pueden retirarse de la quitina sólida por esterilización, pasteurización o lavado de la quitina con compuestos antimicrobianos tales como jabones o cloro. HYTc también puede contener microorganismos adicionales presentes al final del proceso de biodegradación a causa de la presencia de producto de fermentación residual o la centrifugación de HYTb.

30 Consorcio HQE

Los siguientes son los microorganismos en HQE que se cree que están implicados en el proceso de biodegradación y sus propiedades conocidas. En algunos casos la cepa se identifica como "Bioderpac, 2008". Cuando no se conoce la especie, se identifica la especie y la cepa como "Bioderpac, 2008".

HQE se depositó en la ATCC el 27 de abril de 2010 y se le dio la Patent Deposit Designation PTA-10861.

40 ***Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS)** es una bacteria Gram positiva que es mesófila y crece a una temperatura óptima entre 25 y 35 °C. Es aeróbica y puede crecer en condiciones anaeróbicas y utiliza una amplia diversidad de fuentes de carbono. Contiene dos nitratos reductasas, una de las cuales se utiliza para la asimilación del nitrógeno. Es capaz de secretar amilasa, proteasas, pululanasa, quitinasas, xilanasas y lipasas.

45

- 5 ***Bacillus thuringiensis* (Cepas HD-1 y HD-73 (SILoSil® BT))** son bacterias anaeróbicas facultativas Gram positivas, en forma de un flagelo peritricoso. Las cepas HD-1 y HD-73 sintetizan cristales con diversas formas geométricas de actividad proteica e insecticida durante el período de esporas. Las cepas HD-1 y HD-73 secretan exoquitinasas cuando están en un medio que contiene quitina y pueden utilizarse para la degradación de los restos de crustáceo durante producción de quitoligosacáridos.
- 10 ***Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria aeróbica facultativa, Gram positiva, y formadora de esporas. Es mesófila y crece a una temperatura óptima entre 20 y 40 °C. Produce los antibióticos zwittermicina A y kanosamina.
- 15 ***Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria Gram positiva, móvil, formadora de esporas y anaeróbica facultativa. Produce bacitracina, alfa-amilasas, lactamasas, proteasas, y fosfatasa alcalinas. Este es un microorganismo no patogénico que está asociado con plantas o materiales vegetales.
- 20 ***Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria aeróbica Gram positiva. Se considera un saprófito. Produce glucosa deshidrogenasa, penicilina amidasa, beta-amidasa y proteasas neutras.
- 25 ***Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008)** es un miembro de una de las ocho especies de bacterias acidolácticas. Es Gram positiva, no es porulante y produce ácido láctico durante la fermentación que utiliza lactosa como fuente principal de carbono para producir energía. Crece con o sin la presencia de oxígeno en un medio ácido (pH 4-5). Produce las bacteriocinas llamadas lactacina B, ácidos orgánicos, diacetilos y peróxido de hidrógeno.
- 30 ***Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008)** es un aeróbico facultativo, mesófilo que es Gram positivo y que no forma esporas. Tiene la capacidad de adaptarse a temperaturas frías. El pH óptimo para su crecimiento es 5,5. Fermenta galactosa, glucosa, fructosa, manosa, manitol, y acetilglucosamina. Esta especie puede crecer sobre un amplio intervalo de pH y temperatura. Produce enzimas amilasa. Inhibe el crecimiento de bacterias patogénicas tales como *H. Pylori* reduciendo el pH a través de la producción de (1) ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico o láctico o (2) peróxido de hidrógeno. Este microorganismo secreta bacteriocinas.
- 35 ***Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria con múltiples flagelos, aeróbico forzado y su temperatura óptima para el crecimiento es entre 25 y 35 °C. Produce lipasas y proteasas termoestables. Es antagonista hacia una gran cantidad de cepas fúngicas del suelo. Produce metabolitos secundarios tales como antibióticos, quelatos de hierro, y cianuros. Produce endoquitinasa y celulasa en medios con diferentes concentraciones de glucosa.
- 40 ***Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL)** es un hongo saprófito. Muestra acción antibiótica y competición biológica y por esta razón tiene propiedades de control biológico. Produce enzimas que degradan las paredes celulares o una combinación de dichas actividades. Produce clucanasas, quitinasas, lipasas y proteasas extracelulares cuando interacciona con algunos hongos patogénicos, tales como *Fusarium*.
- 45 ***Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria de fijación del nitrógeno. Sintetiza un sistema hidrogenasa que participa en el reciclado del hidrógeno para evitar su pérdida durante la fijación del nitrógeno.
- 50 ***Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria aeróbica. Produce nitrogenasas y es capaz de fijar el nitrógeno.
- 55 ***Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria Gram positiva, anaeróbica obligada. Produce ferroxina (una proteína transportadora de electrones) que actúa como donante directo de electrones en la reducción de hierro proteico.
- 60 ***Proteus vulgaris* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria Gram positiva, anaeróbica, facultativa que crece a temperaturas cercanas a 23 °C. Degrada de forma proteolítica proteínas en aminoácidos libres por las enzimas que produce.
- 65 ***Streptomyces sp.* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria el suelo Gram positiva. Produce múltiples enzimas que metabolizan diversos nutrientes. Puede sobrevivir a cambios significativos en temperatura, humedad y fuentes de nutrientes. Las enzimas extracelulares producidas por estas bacterias utilizan quitina y quitosana como sustratos a un pH de 4,5 a 6,5 y a 60 °C. Estas son condiciones generadas al inicio y en las fases finales de la fermentación láctica en el proceso de biodegradación.
- 65 ***Nitrobacter sp.* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria Gram negativa, aeróbica, que convierte nitritos en nitratos. Crece a un pH entre 6 y 9 y a temperaturas entre 10 a 34 °C. Las bacterias degradan polímeros orgánicos tales como quitina en compuestos que se utilizan por otros organismos, tales como *Pseudomonas fluorescens* () y *Rhizobium japonicum* (Bioderpac2008).
- 65 ***Micrococcus sp.* (Bioderpac, 2008)** es una bacteria Gram positiva esférica. Este microorganismo en asociación con *Streptomyces sp* () es capaz de degradar derivados coloidales de quitina.

Grupos y actividad enzimática de microorganismos en HQE

La biodegradación de los componentes de animales o subproductos marinos requiere enzimas hidrolíticas tales como proteasas, lipasas, y quitinasas. La composición microbiana descrita contiene una o más de dichas enzimas.

El grupo principal de microorganismos en HQE es *Lactobacillus acidophilus* (Biodepac 2008), *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Pseudomonas fluorescens* (Biodepac 2008), *Bacillus licheniformis* (Biodepac 2008) y *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL). Estos microorganismos son capaces de biodegradar artrópodos o subproductos de artrópodos. Uno o más de los miembros de este grupo principal también tienen acción sinérgica cuando se combinan con otros microorganismos de HQE.

El primer grupo de microorganismos incluye microorganismos que causan la reducción del pH y que estabilizan la fermentación debido a la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. Este grupo incluye *Lactobacillus acidophilus* (Biodepac 2008) y *Lactobacillus casei* (Biodepac 2008). Su actividad es importante al inicio de la fermentación y durante las fases finales de la fermentación para producir el pH óptimo para las enzimas hidrolíticas. Su actividad también crea un entorno de cultivo que evita el crecimiento de microorganismos indeseados y favorece la desmineralización de los restos de quitina. *Lactobacillus acidophilus* (Biodepac 2008) es un miembro del grupo principal.

El segundo grupo de microorganismos incluye microorganismos que producen enzimas extracelulares. Este segundo grupo incluye *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Biodepac 2008), *Trichoderma harzianum* (Biodepac 2008), *Rhizobium japonicum* (Biodepac 2008) y *Azotobacter vinelandii* (Biodepac 2008). Las cadenas de quitina en artrópodos o subproductos de artrópodos están asociadas con moléculas proteicas. La separación de dichos polímeros requiere la acción hidrolítica obtenida de las enzimas quitinolíticas y proteolíticas producidas por estos microorganismos. Ambos tipos de enzimas descomponen las cadenas en la parte interna del polímero para producir oligómeros de diversos tamaños. La acción de esas enzimas sucede de un modo sucesivo dentro de las fases intermedias y finales del proceso de fermentación cuando se consiguen las condiciones apropiadas de pH. Los microorganismos en este grupo y las condiciones ambientales que producen facilitan la liberación de pigmentos y la fracción lipídica adherida a esos restos. *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS) y *Trichoderma harzianum* (Biodepac 2008) son miembros del grupo principal.

El tercer grupo de microorganismos incluye los microorganismos *Bacillus licheniformis* (Biodepac 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Biodepac 2008), *Spreptomycetes*, (Biodepac 2008) y *Clostridium* (Biodepac 2008). Estos microorganismos hidrolizan oligómeros (quito-oligosacáridos y péptidos) para producir quitobiosas, glucosamina, y aminoácidos libres. *Bacillus licheniformis* (Biodepac 2008) y *Pseudomonas fluorescens* (Biodepac 2008) son miembros del grupo principal.

Un cuarto grupo de microorganismos incluye *Bacillus thuringiensis* (cepas HD-1 y/o HD-73), *Streptomyces* (Biodepac, 2008), *Micrococcus* (Biodepac, 2008), *Nitrobacter* (Biodepac, 2008) y *Proteus vulgaris* (Biodepac, 2008).

Cada uno de estos grupos, incluyendo el grupo principal, puede ser útil por separado y puede combinarse con composiciones microbianas de la técnica anterior para potenciar su rendimiento. A este respecto, el cuarto grupo está particularmente indicado.

La Tabla 2 expone algunas de las combinaciones mencionadas anteriormente. La columna 1 es una lista de los microorganismos conocidos en HQE que se cree que son activos en el proceso de biodegradación. La columna 2 enumera los microorganismos de la columna 1 sin los microorganismos en el cuarto grupo de microorganismos. La columna 3 muestra la combinación de los microorganismos principales mientras que las columnas 4, 5 y 6 identifican la combinación de microorganismos del primer, segundo y tercer grupo. La columna 4 es la combinación de los grupos 1 y 2; la columna 5 de los grupos 1 y 3 y la columna 6 de los grupos 2 y 3. Otras combinaciones útiles se exponen en las columnas 7-10.

Tabla 2 Composición de cultivo

Microorganismo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	X	X	X	X		X	X	X		X
<i>Bacillus cereus</i>	X	X		X		X		X		X
<i>Bacillus megaterium</i>	X	X								
<i>Azotobacter vinelandii</i>	X	X		X		X		X		X
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	
<i>Lactobacillus casei</i>	X	X		X	X			X	X	
<i>Trichoderma harzianum</i>	X	X	X	X		X	X	X		X

<i>Rhizobium japonicum</i>	X	X		X		X		X		X
<i>Clostridium pasteurianum</i>	X	X			X	X			X	X
<i>Bacillus licheniformis</i>	X	X	X		X	X	X		X	X
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X	X	X		X	X				
<i>Bacillus thuringiensis</i>	X					X	X	X	X	X
<i>Streptomyces</i>	X				X	X	X	X	X	X
<i>Nitrobacter</i>	X						X	X	X	X
<i>Micrococcus</i>	X						X	X	X	X
<i>Proteus vulgaris</i>	X						X	X	X	X

La actividad de los extractos enzimáticos producidos por los microorganismos en HQE es compleja, pero ha permitido la degradación de los restos quitinosos de artrópodos tales como crustáceos. Los microorganismos en HQE se activan de un modo sucesivo de acuerdo con el entorno generado por los organismos usados.

5

Métodos para la identificación y aislamiento de microbios en HQE

Es importante obtener aislados puros antes de intentar caracterizar o identificar una especie. Unas pocas bacterias son morfológicamente únicas y pueden identificarse sin aislamiento, pero casi todas requieren aislamiento. Lo siguiente describe el aislamiento de cultivos puros de una mezcla de especies contenida en HQE para *Bacillus subtilis* (SILoSil® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (cepas HD-1 y HD-73), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Proteus vulgaris* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* (SILoSil® BT), *Streptomyces sp.* (Bioderpac, 2008), *Nitrobacter sp.* (Bioderpac, 2008) y *Micrococcus sp.* (Bioderpac, 2008).

15

Las primeras etapas incluyen:

- (1) Siembra en estrías de diluciones e incubaciones diferenciales
- (2) Identificación y separación de tipos de colonias
- (3) Reducción de la colección, y
- (4) Determinación de las características iniciales de colonias específicas y la conservación de aislados.

20

Siembra en estrías de diluciones e incubaciones diferenciales

25

Una vez se retira un espécimen de la muestra HQE debe cultivarse inmediatamente. Cualquier muestra líquida debe agitarse con vórtice minuciosamente antes de la preparación de las placas porque las bacterias no móviles pueden asentarse en el fondo de una muestra si están asociadas con materia particulada. Desafortunadamente, las bacterias no segregan de forma homogénea y muestras replicadas de la misma mezcla pueden contener diferentes cantidades de bacterias. El objeto de la agitación con vórtice minuciosa y la posterior siembra en estrías de diluciones es propagar CFU (unidades formadoras de colonias) individuales para obtener colonias concretas que puedan sub-cultivarse.

30

Todos los microorganismos mencionados anteriormente pueden someterse por separado a los siguientes procedimientos para la identificación y aislamiento con la excepción de *Nitrobacter sp.* que se explicará por separado.

35

Se obtiene una carga completa de muestra agitada con vórtice minuciosamente de HQE de forma aséptica y se aplica a un borde de la superficie de agar. Con movimientos hacia atrás y hacia delante debe hacerse el estriado a aproximadamente una cuarta parte de la superficie mientras se extrae el asa hacia el centro de la placa. El estriado no debe romper la superficie del agar, y debería ser de (20 o más) líneas estriadas producidas. Para diluir o propagar la muestra, el asa debe quemarse para destruir todo el material viable, tocarse en una parte limpia del agar para enfriarlo, después hacer estrías perpendiculares al inóculo original, solapando la parte de la placa una vez o dos veces. La segunda sección debe cubrir una mitad de la superficie estéril restante. Esto propaga una pequeña parte del inóculo original posiblemente diluyéndolo suficientemente para provocar la aparición de colonias individuales después de incubación. Una tercera sección después se estria perpendicular a la segunda sección, quemando y enfriando el asa y solapando la sección previa como anteriormente, para diluir adicionalmente el inóculo.

40

45

50

En la preparación de aislados de cada lote de producto, la siguiente fase es preparar placas estriadas replicadas e incubarlas en condiciones diferentes en una posición invertida, para maximizar las oportunidades de diferenciación de los tipos de colonias para *Bacillus subtilis* (SILoSIL® BS), *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus acidophilus* (Bioderpac, 2008), *Lactobacillus casei* (Bioderpac, 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Bioderpac, 2008), *Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL), *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), *Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008), *Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008), *Proteus vulgaris* (Bioderpac, 2008), *Bacillus thuringiensis* (cepas HD-1 y HD-73, SILoSIL® BT), *Streptomyces sp.* (Bioderpac, 2008), y *Micrococcus sp.* (Bioderpac, 2008). La temperatura de incubación se varía (normalmente 25, 30, y 37 °C) y se incuba en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Este enfoque aumenta las posibilidades de separación de especies individuales, ya que diferentes especies/bacterias tienen diferentes intervalos de temperatura óptima para el crecimiento y diferentes necesidades de oxígeno. Los organismos aeróbicos deben comprobarse después de un día de incubación, ya que algunas de nuestras bacterias caracterizadas que se están ensayando crecen muy rápido y excluyen a las otras.

15 **Enfoques para la identificación y separación de tipos de colonias**

Puede usarse un microscopio de disección con un iluminador posterior para distinguir colonias individuales. Las placas deben permanecer invertidas durante el examen. Las colonias son distinguibles por tamaño, forma, opacidad y textura respecto a los microorganismos mencionados anteriormente. Tras el examen, es mejor indicar las colonias a muestrear poniendo una pequeña marca al lado de ellas en la parte inferior de la placa. Será necesario dar la vuelta a la tapa de la placa para recoger el material de las colonias. Debe tenerse cuidado de insertar cuidadosamente el asa estéril solamente el tiempo que lleva obtener un inóculo.

Para color, características superficiales y perfil (elevado, plano, etc.), es necesario examinar las colonias con luz incidente, a través de la tapa transparente. Las tapas deben dejarse encima porque de otro modo las placas quedarán contaminadas. Antes de girar la placa hay que retirar e invertir la tapa para retirar la humedad. La tapa antigua debe remplazarse con una nueva para la visión.

En el caso de que dos colonias solapen y aún puedan distinguirse, entonces están presentes al menos dos colonias. Las colonias habitualmente tienen una textura bastante simple, uniforme. Si un área parece un mosaico, probablemente hay al menos dos especies. Cada tipo único de colonia debe muestrearse tomando un inóculo en aguja y realizando una siembra en estrías de diluciones de factor tres en una placa nueva. Debe tenerse cuidado de muestrear solamente la colonia de interés. Se incuba cada nueva placa estriada en condiciones aeróbicas a la temperatura que se incubó la placa original.

Las especies mostrarán óptimos de temperatura, indicados por colonias de crecimiento más rápido y/o más grande a temperaturas cercanas a la ideal. Cualquier colonia que se muestree a partir de una placa incubada de forma anaeróbica probablemente será un anaerobio facultativo.

40 **Reducción de la colección**

Probablemente tienen que aislarse duplicados de la misma especie y cepa a partir de diferentes placas estriadas. Muchas especies diferentes y diferentes cepas de la misma especie producen tipos de colonias muy similares. Para reducir la cantidad de aislados a especies/cepas únicas, se cultivan aislados duplicados sospechosos en la misma placa. En dos tercios de la superficie se realizan dos "mini-diluciones" para obtener colonias individuales para cada cultivo, y en el tercio restante se mezclan. Después de incubación, si los dos aislados crecen en la misma placa y/o el inóculo mixto produce dos tipos de colonias distinguibles, se han identificado dos aislados únicos.

50 **Caracterización inicial de colonias y conservación de aislados**

La mayoría de las características de los organismos en consideración deben determinarse usando luz incidente, no transmitida.

Una vez obtenido un aislado y establecida la pureza por examen de colonias y examen microscópico, debe inocularse un tubo inclinado de agar e incubarse a una temperatura apropiada con el tapón flojo para permitir el intercambio de gases. Después de que aparezca crecimiento, el cultivo debe describirse, apretarse el tapón, y mantenerse el tubo a temperatura ambiente como fuente de cultivo puro para ensayos.

Además de la caracterización descriptiva global, debe teñirse con gram un cultivo joven (<18 h) y registrarse los resultados incluyendo la forma y tamaño de las células, vainas o cápsulas si fueran evidentes, y cualquier evidencia de esporas o estructuras similares. La relación al oxígeno es la siguiente etapa con la que reducir las posibles categorías. Después de eso, es esta combinación particular de resultados de tinción gram, tipo celular, y relación a oxígeno lo que determina las siguientes series de etapas hacia la caracterización del aislado.

Detección y recuento de población de *Nitrobacter sp.* en el producto

Hay varios estudios sobre el metabolismo, supervivencia, y crecimiento de oxidantes de nitrito en cultivos puros y en su actividad nitrificante en diversos entornos, pero pocos estudios han tratado con la población *Nitrobacter* natural. Aunque la conversión biológica de nitrito en nitrato es un proceso bien conocido, los estudios y procedimientos de la población *Nitrobacter* actualmente se ha visto impedida por métodos inadecuados de detección y recuento.

Este fallo se debe en parte a las características fisiológicas desfavorables de estas bacterias, concretamente crecimiento lento, biomasa pequeña, y susceptibilidad de los cultivos a contaminación. No hay modo de contar la población de *Nitrobacter* en el suelo porque consume mucho tiempo y es selectiva.

Descripción detallada del proceso de crecimiento de *Bacillus cereus* (Bioderpac, 2008), *Bacillus megaterium* (Bioderpac, 2008), *Bacillus subtilis* (SiLoSil® BS) y *Bacillus licheniformis* (Bioderpac, 2008)

Ingrediente del medio: agua purificada y agar nutriente de medio de placa.

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de la placa es agar nutriente, (4) incubar las placas a 37 °C durante 24-48 horas, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

Pseudomonas fluorescens* y *Proteus vulgaris

Ingrediente del medio: agua purificada y agar nutriente de medio de placa.

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de la placa es agar nutriente, (4) incubar las placas a 37 °C durante 24-48 horas, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei

Se desarrolló el agar M.R.S. por Man, Rogosa y Sharpe para proporcionar medios que pudieran demostrar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias acidolácticas. El medio de cultivo permite un desarrollo abundante de todas las especies de lactobacilos. La peptona y la glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monooleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, contribuyen a los cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como un agente inhibidor del crecimiento de bacterias Gram negativas. Véase la Tabla 3.

Tabla 3

Fórmula (en gramos por litros)		Instrucciones
Proteosa peptona n.º 3	10,0	Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando hasta el punto de ebullición durante 1 o 2 minutos. Esterilizar en esterilizador durante 15 minutos a 121 °C.
Extracto de carne	8,0	
Extracto de levadura	4,0	
Glucosa	20,0	
Monooleato de sorbitán	1 ml	
Fosfato dipotásico	2,0	
Acetato sódico	5,0	
Citrato de amonio	2,0	
Sulfato de magnesio	0,2	
Sulfato de manganeso	0,05	
Agar	13,0	
pH final: 6,4 ± 0,2		

Ingrediente del medio: agua purificada y sustrato M.R.S. de agar nutriente de medio de placa.

5 Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar en cámara aeróbica con CO₂ al 5-10 % una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de la placa es agar M.R.S., (4) incubar las placas a 33-37 °C durante 72 horas o 30 °C durante 5 días, (5) las unidades formadoras de colonia deben ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

Resultados. Las unidades formadoras de colonia deben ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

10 Características de las colonias: generalmente pequeñas, blanco-grisáceas, lisas o rugosas.

Características del medio: el medio preparado es amarillo.

15 Identificación de lactobacilos:

Tabla 4

	Crecimiento a		Ácido						NH ₃ Arginina	Crecimiento en caldo de NaCl al 4 %
	15 °C	45 °C	la	su	sal	mn	so	xi		
<i>L. acidophilus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	V	+/-	+/-	+	+	+	-	-	+

***Azotobacter vinelandii* (Bioderpac, 2008)**

20 Ingrediente del medio: agua purificada y sustrato de agar nutriente de medio de placa (Burk's, Asbhy, Jensen's).

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) incubar esta solución a 25 °C durante 48 horas, (3) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (4) incubar una placa de réplica, con sustrato de agar nutriente, serie con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de placa es agar nutriente, (5) 25 incubar las placas a 25 °C durante 48-72 horas, (6) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

***Clostridium pasteurianum* (Bioderpac, 2008)**

30 Ingrediente del medio: agua tamponada con fosfato y sustrato de agar de métodos convencionales de medio de placa (TYG).

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua tamponada con fosfato, (2) preparar diluciones apropiadas en serie, (3) sembrar una alícuota apropiada para dilución deseada en placas Petri, (4) añadir agar de métodos convencionales templado y mezcla de placa, (5) colocar placas secadas invertidas en cámara anaeróbica, (6) 35 incubar las placas a 35-37 °C durante 48-72 horas, (7) después del periodo de incubación, retirar las placas de la cámara anaeróbica y contar las placas, registrar las diluciones usadas y contar la cantidad total de colonias para cada dilución, (8) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

40 La identificación de esta especie de *Clostridium* usa una morfología microscópica típica de una colonia que permite una identificación rápida y especulativa de algunas especies de *Clostridium* frecuentemente aisladas. Además, junto con el uso de ensayos bioquímicos simples tales como el estudio de la producción de lecitinasa y lipasa en yema de huevo en agar, la hidrólisis de la gelatina y urea y la producción de indol a través del método rápido (p-dimetil-amino-cinamaldehído), constituyen un método fácil y barato para la identificación, incluso definitivo, de algunas de ellas.

45 ***Micrococcus* sp. (Bioderpac, 2008)**

Ingrediente del medio: agua purificada y agar nutriente de medio de placa.

50 Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de la placa es agar nutriente, (4) incubar las placas a 37 °C durante 24 horas, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

55 Si se encuentran cocos Gram positivos, realizar ensayos de sensibilidad a antibióticos. *Micrococcus* es sensible a Bacitracina y resistente a furazolidona.

***Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008)**

60 Ingrediente del medio: agua purificada y medio ALM de placa (agar con manitol de extracto de levadura).

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de placa es ALM (agar con manitol de extracto de levadura), (4) incubar las placas a 28 °C durante 96 horas, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

Para confirmar *Rhizobium japonicum* (Bioderpac, 2008), la colonia aislada se usa para infectar una leguminosa de forma aséptica para causar la formación de nódulos.

***Trichoderma harzianum* (TRICHOSIL)**

Ingrediente del medio: agua purificada y sustrato de medio de agar de extracto de malta (2 % p/vol) suplementado con cloranfenicol, sulfato de estreptomina, y nistatina. Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de placa es agar de extracto de malta, (4) incubar las placas a 25 °C durante 4 días, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

***Bacillus thuringiensis* (Cepas HD-1 y HD-73 (SILoSIL® BT))**

Ingrediente del medio: agua purificada y sustrato de agar de medio Superbroth de placa suplementado con 2 g/litro de D-glucosa y 50 µg/ml de eritromicina.

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de placa es agar Superbroth, (4) incubar las placas a 28 °C durante 10-14 días, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

***Streptomyces* sp. (Bioderpac, 2008)**

Ingrediente del medio: agua purificada y medio de agar de aislamiento de actinomicetes de placa.

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de placa es agar de aislamiento de actinomicetes, (4) incubar las placas a 28 °C durante 2-3 días, (5) las unidades formadoras de colonia deben de ser 1.000.000 por 1 ml de producto.

***Nitrobacter* sp. (Bioderpac, 2008)**

Ingrediente del medio: agua purificada y sustrato de agar nutriente de medio de placa.

Procedimiento: (1) colocar 0,1 ml de muestra líquida de HQE en 9,9 ml de agua purificada, (2) comenzar un intervalo de dilución en serie hasta 1-10, (3) incubar una serie de placas de réplica con 1 ml del intervalo de dilución, el medio de placa es sustrato de agar nutriente de placa, (4) incubar las placas a 30 °C durante 10-14 días.

Proceso de biodegradación

En una realización preferida, el artrópodo marino es un crustáceo y el crustáceo preferido es camarón. El subproducto de camarón comprende cefalotórax y/o exoesqueleto de camarón.

En el proceso de biodegradación, se prefiere que la fermentación sea fermentación aeróbica facultativa. También se prefiere que la fermentación se realice a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 40 °C. El pH es preferiblemente menor de aproximadamente 6, más preferiblemente menor de aproximadamente 5,5. Sin embargo, el pH debe mantenerse por encima de aproximadamente 4,3. La fermentación se realiza durante aproximadamente 24-96 horas. En algunas realizaciones, la fermentación se realiza durante aproximadamente 24-48 horas y más preferiblemente 24-36 horas. Estos tiempos de fermentación son mucho más cortos que los tiempos de fermentación típicos de la técnica anterior de 10 a 15 días para conseguir sustancialmente la misma cantidad de digestión, aunque sin formación detectable de quitosana y glucosamina.

La separación de la mezcla es preferiblemente por centrifugación (por ejemplo, aproximadamente 920 g). También puede usarse separación por gravedad, pero no es preferida a causa del tiempo necesario para conseguir la separación.

La mezcla se separa en tres fracciones: sólida, acuosa y lipídica. La fracción sólida comprende quitina y se denomina HYTc. La fracción acuosa comprende hidrolizado de proteína, aminoácidos, quitosana y glucosamina y se denomina HYTb. La fracción lipídica comprende esteroides, vitamina A y E y pigmentos carotenoides tales como astaxantina.

Tiene que usarse HQE en el proceso de biodegradación. En otras realizaciones, se prefiere añadir HYTb a HQE o el caldo de fermentación. Como se ha descrito anteriormente, HYTb contiene aminoácidos, quitosana, glucosamina y elementos traza incluyendo calcio, magnesio, zinc, cobre, hierro y manganeso. HYTb también contiene enzimas tales como enzimas lácticas, proteasas, lipasas, quitinasas, ácido láctico, polipéptidos y otros carbohidratos. HYTb también puede contener microorganismos inactivos de un proceso previo de biodegradación. Dichos microorganismos pueden volver a reactivarse y, en combinación con HQE, contribuyen a un proceso de biodegradación más robusto en comparación con cuando se usa HQE en sí mismo, como se describe de otro modo en este documento.

Más particularmente, el proceso incluye las siguientes etapas:

- a. Activación de las células microbianas en una solución básica de azúcar para potenciar su crecimiento y la formación de biomasa.
- b. Molienda de los subproductos de camarón (cefalotórax y exoesqueleto) para preparar una pasta homogénea.
- c. Mezcla homogénea de la pasta de subproducto de camarón con al menos un 10 % del inóculo activado.
- d. Ajuste de los valores de pH a menos de 6,0 en la mezcla usando una solución de ácido cítrico para inhibir el crecimiento de microorganismos y para promover el desarrollo de células microbianas que constituyen el inóculo.
- e. Fermentación de la mezcla en un sistema agitado de forma no continua a temperaturas dentro de un intervalo de 30 a 40 °C durante al menos 96 horas manteniendo el pH a menos de 5,0. El pH se controla periódicamente. Si el pH sube por encima de 5,0, se añade un tampón ácido cítrico en una cantidad para mantener el pH por debajo de 5,0.
- f. Centrifugación del fermento para separar las tres fracciones principales: quitina, hidrolizado líquido y pasta pigmentada.
- g. Aclarado de la quitina en bruto y recogida del agua de aclarado para recuperar los sólidos finos o minerales.
- h. Secado de la quitina y almacenamiento.
- i. Secado y almacenamiento del hidrolizado líquido.
- j. La pasta pigmentada (fracción lipídica) se almacena en recipientes cerrados para su conservación.

El proceso y fundamentos operativos se entienden mejor con referencia a la Figura 1 y la siguiente descripción de tallada.

Activación de células microbianas

El inóculo de HQE tiene una concentración de microbios de aproximadamente el 2,5 al 3,0 % (p/v). HQE se activa por dilución hasta el 5 % en solución de caña de azúcar (concentración final del 3,75 % de caña de azúcar), y se incuba a 37 °C durante 5 días. Se añade preferiblemente HYTb (10 ml por litro de cultivo) para proporcionar una fuente de minerales y aminoácidos obtenidos de forma natural. El crecimiento celular de los microorganismos se estimó por densidad óptica medida a 540 nm. La activación está completa a una densidad óptica de aproximadamente 1,7. La concentración de microbios después de la activación es de aproximadamente el 1,9 al 3,0 % (p/v).

Preparación de muestras

Las muestras de subproductos de camarón se obtienen de plantas de procesamiento de camarón. Se mezcla residuo ligeramente descongelado y picado (1500 g por lote) con 99 gramos de caña de azúcar (concentración final del 6,6 % en peso) y 85,5 ml de HQE activado al 5 % (v/p) (densidad óptica de célula = 1,7). Después se ajusta el pH a 5,5 usando ácido cítrico 2 M.

Control de fermentación

La mezcla se incuba a 36 °C con agitación no continua durante 96 h. Durante el proceso de fermentación, se controla el pH usando un potenciómetro, y se determina la acidez titulable total (TTA, %) por titulación con NaOH 0,1 N hasta que se obtiene un pH de 8,5. La TTA se expresa como un porcentaje de ácido láctico.

Condiciones de separación

El producto de fermentación es un ensilaje viscoso que tiene un color naranja intenso, debido a la presencia de astaxantina. El ensilaje se centrifuga (5 °C) a 1250 rpm (930 g) durante 15 min para obtener la quitina, los hidrolizados líquidos, y la pasta pigmentada. La fase superior (pasta pigmentada) se separa manualmente. Los hidrolizados líquidos se separan por decantación, y el sedimento que constituye la quitina sin procesar se lava con agua destilada para separar los sólidos finos. El líquido resultante se recoge y seca. La quitina sin procesar, los hidrolizados líquidos y los sólidos finos se secan a 60 °C. Todas las fracciones se almacenan para protegerlas de la luz.

El protocolo anterior se realizó usando HQE en tres lotes de fermentación por duplicado como se expone en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Control de fermentación por medición de pH y acidez titulable total (TTA, %).

5 Los valores iniciales promedio de pH y TTA fueron $7,31 \pm 0,10$ y $0,53 \pm 0,09$, respectivamente. Como se muestra en la Figura 2, el pH se redujo inicialmente hasta 6,5 mediante la adición de ácido cítrico 2M. Después, debido a la proteólisis y la liberación de amonio, el pH aumentó de nuevo hasta $7,11 \pm 0,08$ durante las primeras 2 h, y después, el pH disminuyó en un 28 % (hasta $5,28 \pm 0,01$) durante las 12 horas de fermentación. A aproximadamente 24 horas de fermentación, el pH final fue $4,57 \pm 0,15$. En paralelo a la disminución en el pH se observó un comportamiento similar en los valores medios de la TTA. Durante las 2 primeras horas, los valores promedio de TTA fueron del 1 %, y después estos valores aumentaron gradualmente hasta un valor promedio de $3,33 \pm 0,23$ a las 24 horas, como se muestra en la Fig.2.

Ejemplo 2

15 **Productos de la fermentación y composición química.**

Después del proceso de fermentación, se centrifugó el ensilaje para separar los tres productos principales (quitina, hidrolizado líquido, y pasta pigmentada). El otro producto, los sólidos finos, se retuvieron con el lavado de quitina sin procesar. La Tabla 5 muestra la proporción recuperada en cada fracción. En peso seco, la fracción más grande correspondía al hidrolizado líquido (55 %), después los sólidos finos (29 %), quitina sin procesar (10 %) y pasta pigmentada (5 %). En el lote fermentado, el valor promedio de peso seco fue del 32 % ($481,1 \pm 5,6$ g).

25 La Tabla 6 muestra la caracterización química de cada uno de los cuatro productos principales que se obtuvieron a través de fermentación. El producto quitinoso (quitina) muestra una desmineralización parcial reflejada como ceniza. Esto también revela alto contenido de proteína (42,34 %) cuantificada en los hidrolizados líquidos. Esto facilitó la recuperación de una pasta pigmentada consistente principalmente de lípidos totales (42,67 %), y produjo una fracción abundante en ceniza (16,72 %) en los sólidos finos.

30 **Tabla 5. Productos separados de la fermentación**

<i>Materia seca (g)</i>	<i>Quitina sin procesar (g)</i>	<i>Hidrolizado líquido (g)</i>	<i>Pasta lipídica (g)</i>	<i>Sólidos finos (g)</i>
480,0	48,0	264,4	22,9	141,2
487,5	50,2	268,8	24,0	140,8
475,7	51,0	265,7	23,7	131,7
481,1 ± 5,6	49,5 ± 2,4	266,3 ± 4,6	23,3 ± 0,5	141,9 ± 5,5

Tabla 6. Composición química (peso seco) de los productos de fermentación

Productos	% Proteína	% Ceniza	% Lípido total
Quitina sin procesar	$18,12 \pm 0,15$	$4,36 \pm 0,26$	$2,02 \pm 0,46$
Hidrolizado líquido	$42,34 \pm 0,03$	$7,96 \pm 0,16$	$4,28 \pm 0,28$
Pasta lipídica	$30,80 \pm 0,25$	$5,11 \pm 0,16$	$42,67 \pm 0,63$
Sólidos finos	$31,62 \pm 0,10$	$16,72 \pm 0,37$	Nd

Ejemplo 3

35 **Perfil de aminoácidos en los hidrolizados en polvo seco**

El contenido de aminoácidos del hidrolizado seco se determinó como se describe por Lopez-Cervantes et al., "Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography A, volumen 1105, 1 (2006). La Tabla 6 muestra el perfil total de aminoácidos de los hidrolizados en polvo seco. La proporción de aminoácidos esenciales fue del 52,5 % a los hidrolizados en polvo seco.

Tabla 7. Perfil de aminoácidos de los hidrolizados en polvo seco (mg por g de peso seco)

<i>Aminoácido</i>	<i>Hidrolizados en polvo seco</i>
Ácido aspártico	38
Ácido glutámico	39
Serina	16
Histidina*	9
Glicina	28

Treonina*	14
Alanina	30
Prolina	8
Tirosina*	70
Arginina	18
Valina*	20
Metionina*	4
Isoleucina*	15
Leucina*	23
Fenilalanina*	39
Lisina*	13
Total	394
*Aminoácidos esenciales	207

Ejemplo 4

Cuantificación de glucosamina en quitina sin procesar

5 En la quitina, el contenido de glucosamina se cuantificó como un índice de pureza. Los contenidos de glucosamina en quitina fueron de 516, 619 y 640 mg por g (peso seco), correspondiendo estos valores a los resultados de los tres lotes de fermentación realizados por duplicado. Por lo tanto, la cantidad promedio de glucosamina en este estudio fue de 591 mg por g de peso seco de quitina. Se informó del método para la cuantificación de glucosamina por Lopez-Cervantes et al., "Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC" Journal of Chromatographic Science, volumen 45, 1 (2007).

Ejemplo 5

Contenidos de astaxantina y perfil de ácidos grasos en la pasta pigmentada

15 La astaxantina es el pigmento principal en la pasta lipídica obtenida de los residuos fermentados de camarón. El contenido de astaxantina varió de 1,98 a 2,25 mg g⁻¹ de pasta lipídica seca, y el promedio es de 2,11 mg g⁻¹ de pasta lipídica seca. La astaxantina se determinó por una versión del método de Lopez-Cervantes et al., "Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC" Biomedical Chromatography, volumen 20, 981 (2006).

20 En la pasta pigmentada, se identificaron catorce ácidos grasos. El ácido palmítico (C16:0), y el ácido oleico (C18:1n9) se encontraron en mayor cantidad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende los microbios en la Patent Deposit Designation de la ATCC PTA-10861.
- 5 2. Un proceso de biodegradación que comprende:
mezclar un animal marino o un subproducto de animal marino con una composición que comprende los
microbios en la Patent Deposit Designation de la ATCC PTA-10861 para formar una mezcla;
fermentar dicha mezcla; y
10 separar dicha mezcla en fracciones sólidas, acuosas y lipídicas.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho animal marino es un artrópodo marino.
4. El proceso de la reivindicación 2, en el que dicho artrópodo marino se selecciona del grupo que consiste en
15 camarón, cangrejo y kril.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho animal marino es un pez.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que dicha fermentación es por
20 fermentación aeróbica facultativa.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicha separación es por
centrifugación.
- 25 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que dicha fermentación es a una
temperatura de aproximadamente 30 °C a 40 °C.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que dicha fermentación se realiza a
un pH entre aproximadamente 4,3 y 5,0.
- 30 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que dicha fermentación se realiza
durante aproximadamente 24-96 horas.
11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que dicha fracción acuosa
35 comprende aminoácidos, quitosana y glucosamina.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha fracción acuosa comprende adicionalmente
elementos traza.
- 40 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que dicha fracción sólida
comprende quitina.

Figura 1

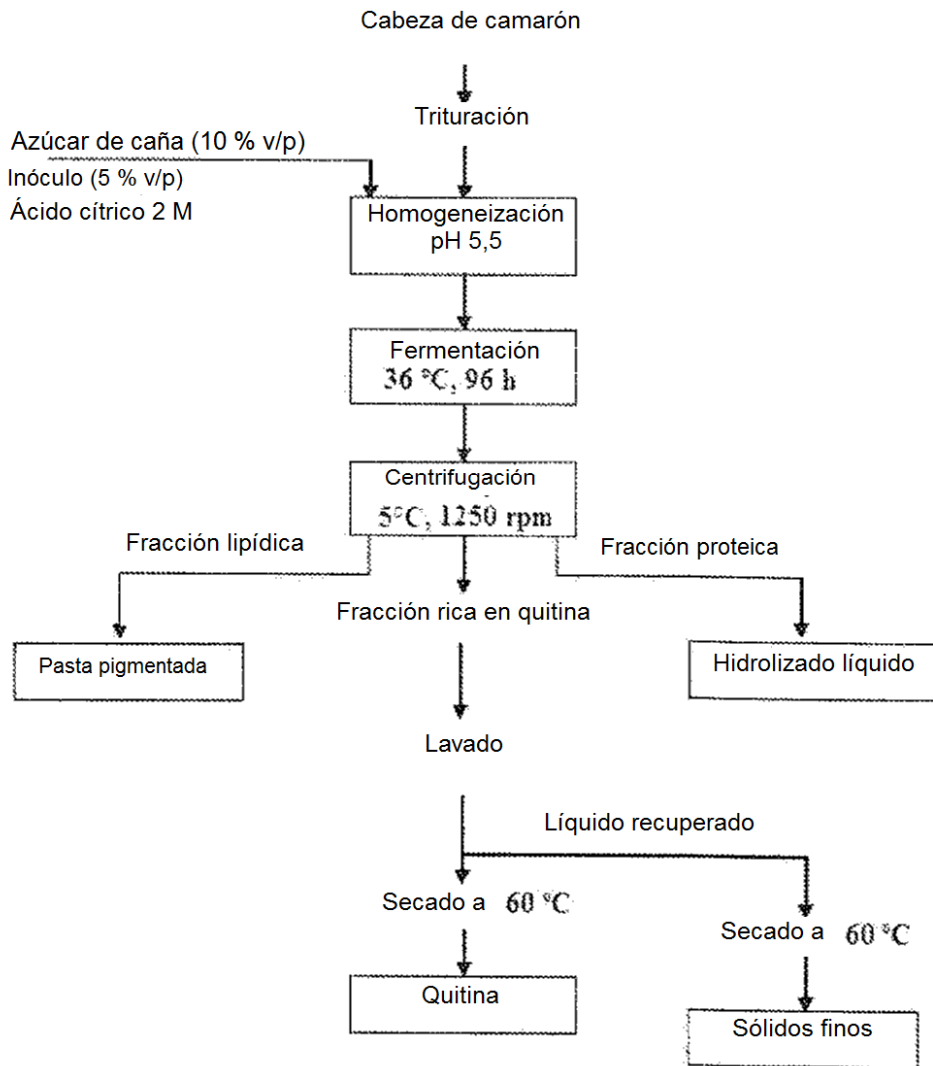


Figura 2

