

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 829**

51 Int. Cl.:

A23K 1/00 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2010 E 10719037 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2427200**

54 Título: **Composición de pienso para el tratamiento o la prevención de enteritis en peces**

30 Prioridad:

08.05.2009 GB 0907963

09.11.2009 GB 0919586

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

17.06.2014

73 Titular/es:

**BIOPROTEIN AS (100.0%)
Professor Olav Hanssens vei 15
4021 Stavanger, NO**

72 Inventor/es:

**ROMARHEIM, ODD HELGE;
ØVERLAND, MARGARETH;
MYDLAND, LIV TORUNN;
SKREDE, ANDERS y
LANDSVERK, THOR**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 468 829 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

Composición de pienso para el tratamiento o la prevención de enteritis en peces

Esta invención se refiere al uso de un material proteínico de célula individual obtenido a partir de un cultivo de bacterias metanotróficas para el tratamiento y/o la prevención de enteritis en peces, en particular para la prevención o el alivio de la enteritis inducida por soja en peces carnívoros, p.ej. salmónidos tales como el salmón atlántico.

Los componentes de los piensos representan aproximadamente un tercio del coste total de la cría de peces tales como el salmón y la trucha. Tradicionalmente la principal fuente de proteínas para peces carnívoros ha sido la harina de pescado. Sin embargo, el precio de la harina de pescado aumenta de forma sostenida y la predicción de aumento en la producción de la acuicultura sugiere que el suministro mundial de harina de pescado no será suficiente para cubrir la demanda futura. Por tanto, se requieren fuentes alternativas de nutrientes para sustituir al menos parte de la fracción de harina de pescado de los piensos acuáticos.

Recientemente la atención de la industria acuícola se ha centrado en ingredientes vegetales, en particular fuentes proteínicas vegetales, debido a su fácil disponibilidad y bajo precio. Sin embargo, dichas materias presentan una serie de problemas que limitan el uso extendido en acuicultura.

El producto proteínico vegetal más ampliamente disponible, la harina de soja, se comercializa como alimento de elevado valor nutricional para animales de granja, incluyendo el salmón y la trucha, y está disponible en forma de harina de soja de contenido graso completo (es decir, sin reducir su contenido de aceite) y de harina de soja desgrasada (con un contenido de aceite reducido). Sin embargo, en el salmón atlántico y en la trucha arcoiris, incluso niveles bajos en la dieta, la harina de soja produce enteritis (una reacción inflamatoria dañina del intestino distal), lo cual supone un reto ético importante y a su vez genera problemas de crecimiento y aprovechamiento de los piensos (Baeverfjord y Krogdahl, *Journal of Fish Diseases* (1996), 19: 375-387). Esta afección a menudo se denomina "enteritis inducida por harina de soja" y es la principal razón para una baja o nula inclusión de harina de soja en dietas para salmón y trucha. La afección también puede ser inducida por otras materias vegetales, tales como concentrado de proteína de guisante (Penn *et al.*, XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Florianopolis, Brasil (2008), Book of Abstracts, pág. 86).

Aunque los efectos específicos de fuentes de proteínas alternativas sobre la fisiología digestiva de los peces han sido estudiados con mucho detalle para el caso de los productos de soja en piensos para cría de salmónidos, un informe reciente del Comité Científico Noruego sugiere que podría haber respuestas similares a otras fuentes proteínicas vegetales usadas por la industria de los piensos para peces. Por lo tanto, se anticipa que otras materias vegetales, como el concentrado proteínico de guisantes, tanto solo como en combinación, mostrarán los mismos efectos dañinos que la harina de soja cuando se suministren a peces en sustitución de la harina de pescado u otros ingredientes no causantes de enteritis.

La gravedad de los cambios morfológicos observados al dar como alimento a peces productos derivados de vegetales, como la harina de soja, depende del nivel de su inclusión en la dieta. Por ejemplo, se puede detectar enteritis del intestino distal en salmones alimentados con una dieta que contiene únicamente un 10% en peso de harina de soja, dando lugar dietas que comprenden un 15% o más de harina de soja (valores en base a proteína de dieta total) a cambios morfológicos graves (Krogdahl *et al.*, *Aquaculture Nutrition* (2003), 9: 361-371). La harina de soja desgrasada induce cambios morfológicos graves en el intestino distal del salmón atlántico y de la trucha arcoiris. Se observaron cambios similares al suministrar harina de soja a otros peces, tal como la dorada, el besugo, la carpa común, el róbalo asiático y el pez gato de canal, aunque estos casos fueron algo menos graves.

La afección de "enteritis inducida por harina de soja" no está causada por las proteínas del pienso, sino más bien por uno o más componentes solubles en alcohol de la fracción no proteínica. Por lo tanto, se pueden usar concentrados de proteínas y productos de proteínas aisladas producidos a partir de materias vegetales (p.ej. soja) después de una extracción con alcohol sin producir enteritis. Sin embargo, dichos productos son muy caros.

Por lo tanto, aunque las fuentes de proteínas vegetales alternativas como la harina de soja son candidatos prometedores para la sustitución parcial de harina de pescado en los piensos acuícolas, actualmente no pueden usarse en cantidades significativas en los piensos para peces debido al problema de la enteritis. La presente invención pretende abordar este problema.

Los inventores de la presente han descubierto sorprendentemente que la adición de una harina de proteína bacteriana o "biomasa" derivada de un cultivo que comprende bacterias metanotróficas (también denominada en la presente memoria simplemente "harina de proteína bacteriana") a la dieta de peces puede evitar o aliviar la enteritis inducida por vegetales. En particular, se ha descubierto que la adición de niveles entre bajos y moderados de harina de proteína bacteriana a las dietas para peces que incluyen materias de base vegetal en niveles que de otro modo provocarían enteritis convierte a dichas materias en seguras para su uso como pienso para peces.

Se conocen composiciones proteínicas bacterianas, p.ej. aquellas que comprenden proteínas unicelulares de bacterias metanotróficas, para uso como piensos para animales. Por ejemplo, la solicitud de patente WO 03/015534

describe el uso de una proteína unicelular derivada de *Methylococcus capsulatus* como pienso para peces y moluscos. Sin embargo, no se ha propuesto previamente que se pueda usar una harina de proteínas bacterianas metanotróficas para prevenir o aliviar la enteritis inducida por vegetales en peces, p.ej. enteritis inducida por soja.

5 Por tanto, en un primer aspecto la invención proporciona una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas para la prevención o alivio de enteritis inducida por vegetales en peces.

10 Típicamente, la biomasa se incorporará directamente en un pienso para peces convencional, por ejemplo un pienso para peces formulado, que también comprenderá la materia de base vegetal responsable de causar enteritis. En un aspecto adicional, la invención proporciona de este modo un pienso para peces que comprende una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas en combinación con un material vegetal causante de enteritis. Tal como se usa en la presente memoria, el término “pienso para peces” se entenderá de forma general como un alimento completo para peces, es decir, uno que comprende todos los componentes necesarios para una dieta para peces.

15 En un aspecto relacionado la invención proporciona un componente de pienso para peces que comprende (p.ej., que consta esencialmente de) una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas en combinación con un material vegetal causante de enteritis. Dicho componente de pienso puede proporcionarse, por ejemplo, como una mezcla de dicha biomasa y dicho material vegetal para uso como ingrediente (p.ej., un ingrediente que contiene proteínas) en la preparación de un pienso para peces.

20 En un aspecto relacionado, la invención proporciona además un pienso para peces o un componente de pienso para peces que comprende una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas para la prevención o alivio de enteritis inducida por vegetales en peces.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una biomasa como el descrito en la presente memoria para la fabricación de un agente (p.ej. en la fabricación de un pienso para peces o de un componente de pienso para peces) para la prevención o alivio de enteritis inducida por vegetales en peces.

25 En otro aspecto adicional la invención proporciona un método para prevenir o aliviar enteritis inducida por vegetales en peces, comprendiendo dicho método la administración a dichos peces de una biomasa, un pienso para peces o un componente de pienso para peces como los descritos en la presente memoria.

30 Con el término “enteritis inducida por vegetales” se pretende indicar una afección inflamatoria subaguda de la mucosa intestinal distal que tiene su origen en la ingestión de un material vegetal. Más específicamente, el término pretende referirse a una afección asociada a uno o más de los siguientes cambios del intestino distal: (1) ensanchamiento y acortamiento de los pliegues intestinales; (2) pérdida de la vacuolización supranuclear normal en células absortivas (enterocitos) de la mucosa intestinal; (3) ensanchamiento de la lámina propia central de los pliegues intestinales, con aumento de la cantidad de tejido conectivo; y (4) infiltración de una población de leucocitos mixta (células inflamatorias) en la lámina propia y en la submucosa. Estos cambios morfológicos están asociados a una funcionalidad afectada del intestino distal y son característicos de los cambios inducidos en peces (especialmente en salmón y trucha) por efecto del uso de harina de soja en la dieta. El especialista en la técnica puede identificar fácilmente dichos cambios a partir de un estudio histológico de secciones intestinales distales. La Figura 1B es un ejemplo de las características morfológicas de los intestinos distales de salmón atlántico cuando se alimenta con una dieta que comprende harina de soja.

40 Las materias vegetales que pueden producir enteritis incluyen productos vegetales enteros, procesados o extraídos, en particular materias proteínicas vegetales. Dichas materias pueden derivar, por ejemplo, de cualquiera de las siguientes fuentes: soja, girasol, altramuz, colza, canola, semilla de algodón, cacahuete, guisante (p.ej. guisante de campo), judía (p.ej., haba), cereal, cebada, maíz y mijo.

45 Las materias vegetales adecuadas para uso en la invención son aquellas que proporcionan un valor nutricional a los piensos para peces y que son adecuadas para uso como ingrediente en piensos para peces, p.ej. adecuadas para la sustitución parcial de ingredientes convencionales de los piensos, tal como la harina de pescado. Dichos productos son aquellos que producen enteritis en peces. Los ejemplos específicos de materias que pueden dar como resultado enteritis o afecciones similares a la enteritis en peces (dependiendo de su nivel de inclusión en la dieta) incluyen la soja (de contenido normal en aceite, desgrasada, pelada o sin pelar), girasol (p.ej. girasol desgrasado), altramuz (p.ej. altramuz pelado), colza (p.ej. colza doblemente desgrasada), guisante de campo entero, concentrado de proteína de guisante, habas (p.ej. habas enteras o peladas), co-productos derivados de la producción de biocombustibles y de la industria cervecera, concentrado de proteína de cebada, gluten de trigo y gluten de maíz. Estos ingredientes pueden proporcionarse sin tratamiento con calor, o pueden ser pre-tratados con métodos tales como asado, tostado, microondas, expansión, trituration, extrusión u otros tratamientos con calor conocidos.

55 Los productos de soja son un ejemplo de material de base vegetal conocido por originar enteritis en peces. Dichos productos se encuentran ampliamente disponibles en una serie de formas diferentes y todas ellas se consideran adecuadas para uso en la invención. Éstas incluyen la harina de soja extraída con disolvente, que se refiere al producto de soja tras extracción de parte del aceite mediante disolventes tales como el hexano; la torta de soja

derivada de un procesado con prensa mecánica o virutas de soja; harina de soja que son copos de soja extraídos con disolvente y molidos o torta de soja molida, virutas de soja molidas, o copos de soja molidos; pienso de molino de soja que es subproducto resultante de la fabricación de harina de soja o de arenilla de soja y que está compuesto por cáscaras de soja y despojos de cola del molino (un análisis típico en peso sería 13% de proteína sin purificar, 32% de fibra sin purificar y 13% de humedad); carrera de molino de soja que es el producto resultante de la fabricación de harina de soja pelada y que está compuesto por cáscaras de soja y trozos de judías de soja que se adhieren a la cáscara en las operaciones de molienda normales (un análisis típico en peso sería 11% de proteína sin purificar, 35% de fibra sin purificar y 13% de humedad); cáscaras de soja que es el producto que consiste principalmente en la cobertura exterior de la soja; y copos de soja extraídos con disolvente que es el producto obtenido tras extraer parte del aceite de las semillas de soja mediante el uso de hexano o disolventes hidrocarbonados homólogos.

La harina de soja está disponible comercialmente en las formas de contenido graso completo (es decir, sin reducción del contenido de aceite) y desgrasada (contenido de aceite reducido). La harina de soja se desgrasa típicamente mediante extracción con disolvente de los aceites usando hexano o disolventes hidrocarbonados homólogos (p.ej. n-hexano o 2,3-dimetil-pentano) que son destilados posteriormente durante el proceso de tostado. La harina de soja desgrasada (también conocida como harina de soja "extraída") típicamente presenta la siguiente composición (% en peso):

	Proteína (N x 6,25)	mín. 42%
	Grasa	mín. 0,2%
20	Fibra sin purificar	máx. 8,0%
	Ceniza	máx. 7,0%
	Agua	máx. 12% ó máx. 13,5%

Los carbohidratos totales representan el resto, es decir, aprox. 30% (de los cuales, aproximadamente el 10% son oligosacáridos, y el resto principalmente polisacáridos no almidón (p.ej. galactanos, arabinano)).

El análisis de los productos de soja se puede llevar a cabo según los métodos de ensayo normalizados adoptados por la "American Oil Chemist Society" (AOCS), p.ej. el Método AOCS Ba 2a-38 (para humedad), el Método AOCS Ba 4e-93 (proteínas), el Método AOCS Ba 6-84 (fibra sin purificar) y el Método AOCS Ba 3-38 (aceite). La harina de soja puede estar descascarillada (es decir, que tenga un bajo contenido en fibra y un mayor contenido en proteína sin purificar) o no.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "harina de soja" se refiere generalmente a cualquier material derivado de soja y que sea adecuado para uso como ingrediente de pienso para peces (con o sin procesamiento adicional). La harina de soja adecuada para uso según la invención puede obtenerse de Denofa AS, Noruega. Preferiblemente, la harina de soja comprende una fracción soluble en alcohol que provoca enteritis, es decir la harina de soja es capaz de provocar enteritis en los peces receptores.

Estudios recientes han sugerido que las saponinas vegetales pueden ser uno de los factores responsables causantes de los síntomas de enteritis en peces. Las saponinas son moléculas anfífilas naturales que constan de un resto azúcar unido a un esteroide o una aglicona triterpenoide. Están ampliamente distribuidas en las plantas naturales y también están presentes en muchos cultivos, que incluyen la soja y las semillas de altramuz. Los niveles típicos de saponina en la harina de soja desgrasada son de 5-7 g/kg.

El material vegetal o la fuente vegetal para uso en la invención, por tanto, preferiblemente es una que comprende una proporción de saponinas. Preferiblemente, el material vegetal es un material que contiene proteínas vegetales, p.ej. harina de soja sin desgrasar, harina de soja desgrasada o concentrado de proteína de guisante (p.ej., concentrado de proteína de guisante que tiene un contenido de proteínas de al menos el 20%). Lo más preferiblemente, el material es harina de soja. En una realización preferida, el material vegetal comprende proteínas y saponinas vegetales.

En una realización preferida de la invención, la enteritis es inducida por uno de los materiales vegetales descritos en la presente memoria. En una realización especialmente preferida, la enteritis inducida por vegetales es enteritis inducida por soja.

La biomasa para uso según la invención deriva de, o comprende, un cultivo de bacterias metanotróficas, preferiblemente un cultivo que contenga *Methylococcus capsulatus*, especialmente *Methylococcus capsulatus* (Bath). En una realización preferida, la biomasa deriva de, o comprende, una proporción principal de bacterias metanotróficas y una proporción menor de bacterias heterotróficas, preferiblemente *Methylococcus capsulatus* además de *Ralstonia* sp., *Brevibacillus agri* y *Aneurinibacillus* sp.

Las bacterias preferidas para uso en el material de biomasa incluyen *Methylococcus capsulatus* (Bath), una bacteria termófila aislada originalmente de manantiales termales en Bath, Inglaterra, y depositada como NCIMB 41526 (anteriormente NCIMB 11132) en "The National Collections of Industrial and Marine Bacteria", Aberdeen, Escocia. Otras bacterias adecuadas para uso en la invención incluyen la bacteria heterotrófica DB3, cepa NCIMB 41527 (*Ralstonia* sp. conocida anteriormente como *Alcaligenes acidovorans* DB3; anteriormente NCIMB 13287), DB5, cepa NCIMB 41525 (*Brevibacillus agri*, anteriormente conocida como *Bacillus firmus* DB5; anteriormente NCIMB 13289) y DB4, cepa NCIMB 41528 (*Aneurinibacillus* sp. conocida anteriormente como *Bacillus brevis* DB4; anteriormente NCIMB 13288) que tienen todas un crecimiento óptimo a una temperatura de aproximadamente 45°C. Los detalles relativos a las características de estas cepas bacterianas se proporcionan en la solicitud de patente WO 03/072133, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente memoria. Una biomasa especialmente preferida para uso de acuerdo a la invención es la preparada a partir de un cultivo microbiano de las anteriores cepas y está disponible en Norferm AS, Noruega, bajo el nombre comercial de BioProtein®.

La biomasa para uso en la invención deriva de un cultivo microbiano que comprende una cepa bacteriana metanotrófica, opcionalmente en combinación con una o más especies de bacterias heterotróficas, especialmente preferiblemente una combinación de cepas bacterianas metanotróficas y heterotróficas. Tal como se usa en la presente memoria, el término "metanotrófico" abarca cualquier bacteria que utiliza metano, metanol o formaldehído para su crecimiento. El término "heterotrófico" se usa para bacterias que utilizan sustratos orgánicos diferentes del metano, el metanol o el formaldehído para su crecimiento.

La biomasa bacteriana para uso en los métodos descritos en la presente memoria puede formarse por crecimiento de las bacterias en un medio o sustrato adecuado. La naturaleza exacta del medio de crecimiento usado para producir la biomasa no es crítica y se puede usar una variedad de sustratos adecuados. De forma conveniente, la biomasa puede producirse mediante un proceso de fermentación en el que se alimenta oxígeno y un sustrato adecuado tal como un hidrocarburo, un alcohol o un carbohidrato, líquido o gaseoso, p.ej. metano, metanol o gas natural, junto con una fuente de nitrógeno (preferiblemente amoníaco) y una disolución de nutrientes minerales, a un reactor tubular que contiene los microorganismos. En la técnica se conocen bien y se describen varios de dichos procesos, por ejemplo en los documentos WO 01/60974, DK-B-170824, EP-A-418187 y EP-A-306466, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria a modo de referencia.

El material de biomasa para uso en la invención derivará preferiblemente de la fermentación de fracciones de hidrocarburos o de gas natural. Especialmente preferidos son los materiales de biomasa derivados de la fermentación de gas natural. Generalmente, en dichos procesos, según va aumentando la concentración de microorganismos en el fermentador, una porción del contenido del reactor o caldo es retirada y los microorganismos pueden ser separados mediante técnicas bien conocidas en la técnica, p.ej., centrifugación y/o ultrafiltración. De forma conveniente, en un proceso de fermentación como éste, el caldo será retirado continuamente del fermentador y tendrá una concentración celular de entre 1 y 5% en peso, p.ej. aproximadamente 3% en peso.

Especialmente preferido para uso en la invención es un cultivo microbiano que comprende una combinación de la bacteria metanotrófica *Methylococcus capsulatus* (Bath) (cepa NCIMB 41526), y la bacteria heterotrófica DB3 (cepa NCIMB 41527) y DB5 (cepa NCIMB 41525), opcionalmente en combinación con DB4 (cepa NCIMB 41528). El papel de DB3 es utilizar el acetato y el propionato producidos por la *M. capsulatus* (Bath) a partir del etano y el propano del gas natural. La DB3 puede suponer hasta el 10%, p.ej. aproximadamente del 6 al 8%, del recuento celular total de la biomasa resultante. El papel de la DB4 y la DB5 es el de utilizar los productos de lisis y los metabolitos del medio. Típicamente, la DB4 y la DB5 supondrán cada una menos del 1% del recuento celular total durante la fermentación en continuo.

Los fermentadores adecuados para uso en la preparación de la biomasa son aquellos de tipo lazo, tal como los descritos en los documentos DK 1404/92, EP-A-418187 y EP A 306466 de Dansk Bioprotein, o reactores de arrastre neumático. Se pueden usar otros fermentadores para preparar la biomasa y éstos incluyen fermentadores tubulares y de tanque agitado.

Típicamente, la biomasa producida a partir de la fermentación de gas natural puede comprender entre un 60 y un 80% en peso seco de proteína sin purificar; entre un 5 y un 20% en peso de grasa sin purificar; entre un 3 y un 10% en peso de ceniza; entre un 3 y un 15% en peso de ácidos nucleicos (ARN y ADN); entre 10 y 30 g/kg de fósforo; hasta 350 mg/kg de hierro; y hasta 120 mg/kg de cobre. De forma particularmente preferida, la biomasa comprenderá entre un 68 y un 73%, p.ej. aproximadamente un 70%, en peso de proteína sin purificar; entre un 9 y un 11%, p.ej. aproximadamente un 10%, en peso de grasa sin purificar; entre un 5 y un 10%, p.ej. aproximadamente un 7%, en peso de ceniza; entre un 8 y un 12%, p.ej. aproximadamente un 10%, en peso de ácidos nucleicos (ARN y ADN); entre 10 y 25 g/kg de fósforo; hasta 310 mg/kg de hierro; y hasta 110 mg/kg de cobre. Puede esperarse que el perfil de aminoácidos del contenido proteínico sea nutricionalmente favorable con una elevada proporción de los aminoácidos más importantes, metionina, cisteína, treonina, lisina, triptófano y arginina. Típicamente, éstos pueden estar presentes en cantidades de aproximadamente 3,1%, 0,7%, 5,2%, 7,2%, 2,5% y 6,9%, respectivamente (expresado como porcentaje de la cantidad total de aminoácidos). Generalmente, los ácidos grasos comprenderán principalmente el ácido saturado palmítico (aprox. 50%) y el ácido monoinsaturado palmitoleico (aprox. 36%). El contenido mineral del producto comprenderá típicamente cantidades elevadas de fósforo (aproximadamente 1,5% en peso), potasio (aproximadamente 0,8% en peso) y magnesio (aproximadamente 0,2% en peso).

Típicamente, la biomasa resultante se producirá en la forma de una pasta o suspensión acuosa con fluidez. Generalmente ésta consistirá esencialmente en material celular entero, aunque también puede haber presente una fracción de material celular lisado.

5 El producto del fermentador puede usarse directamente (es decir, sin un procesado adicional) o puede someterse a etapas de procesamiento adicionales antes de ser usado como componente de biomasa de la invención. Las etapas de procesamiento adicionales incluyen procesos de homogeneización, además de centrifugación y/o filtración (p.ej. ultrafiltración), mediante los cuales se reduce el contenido de agua antes del uso. Los métodos de homogeneización adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/60974, cuyo contenido queda incorporado a la presente memoria a modo de referencia.

10 Después de la producción de la biomasa, generalmente ésta se concentra a partir del medio de fermentación, por ejemplo mediante métodos convencionales de centrifugación y/o filtración, p.ej. microfiltración o ultrafiltración. Preferiblemente, la filtración se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 50 a 70°C. La exclusión por tamaño usada durante la ultrafiltración generalmente estará en el rango de aproximadamente 100 kD. Sin embargo, se pueden usar filtros que tengan un corte de PM en el rango de 10 a 100 kD, p.ej. aproximadamente 20 kD. La
15 microfiltración se llevará a cabo generalmente usando filtros en el rango de 0,2 µm a 0,4 µm.

La concentración de la biomasa puede efectuarse solamente por centrifugación. Durante la centrifugación, el contenido en materia seca de la biomasa aumenta típicamente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 15% en peso, particularmente hasta aproximadamente de 5 a 18% en peso, preferiblemente de 8 a 15%, p.ej. aproximadamente 14% en peso. Si es necesario, o incluso deseable, se pueden usar métodos de filtración (p.ej. ultrafiltración) para aumentar aún más el contenido en sólidos de la biomasa. La ultrafiltración, que puede llevarse a cabo de forma ventajosa a una temperatura de entre 40 y 50°C, p.ej. entre 42 y 46°C, además concentra la biomasa en un producto que contiene entre un 10 y un 30%, preferiblemente entre 15 y 25%, p.ej. entre 18 y 22%, en peso de material unicelular. La biomasa resultante estará en la forma de una suspensión acuosa y típicamente tendrá un contenido en sólidos en el intervalo de entre 10 y 30%, preferiblemente entre 15 y 25%, p.ej. aproximadamente 20%,
20 en peso.

La biomasa para uso en la invención también puede ser un hidrolisato o un autolisato de un cultivo microbiano. Las solicitudes de patente WO 03/068002 y WO 03/068003 describen procesos para preparar hidrolisatos y autolisatos bacterianos, respectivamente, y su contenido se incorpora al completo a la presente memoria. Las etapas de hidrólisis y/o autólisis se pueden llevar a cabo antes o después de cualquier etapa de centrifugación y/o filtración. El orden exacto de las etapas de procesado dependerá de la naturaleza deseada para el producto y el especialista en la técnica lo puede determinar.
30

Los hidrolisatos bacterianos pueden producirse mediante la acción de una o más enzimas capaces de hidrolizar (p.ej. degradar hidrolíticamente) la estructura celular y/o los componentes intracelulares del cultivo bacteriano, preferiblemente una enzima o sistema de enzimas capaz de hidrolizar el contenido de ácidos nucleicos de las células. Los autolisatos bacterianos pueden prepararse mediante incubación del cultivo bacteriano en condiciones controladas cuidadosamente para permitir que las enzimas endógenas contenidas dentro de las células bacterianas, tal como nucleasas y proteasas, digieran los componentes de la célula. Este proceso de "autodigestión" da como resultado la producción de varios productos de degradación de la célula que pueden incluir péptidos, aminoácidos, nucleótidos, fosfolípidos, ácidos grasos, etc. Las condiciones de reacción adecuadas para la hidrólisis y la autólisis del cultivo bacteriano pueden ser determinadas por el especialista en la técnica.
35
40

La biomasa para uso en la invención también puede ser un permeado, es decir, la fracción soluble obtenida después de una filtración, p.ej. microfiltración o ultrafiltración. Un permeado preferido se obtiene por homogeneización, autólisis y después ultrafiltración de la biomasa bacteriana. Otro permeado preferido se obtiene por homogeneización y después microfiltración de la biomasa bacteriana. Para mejorar el rendimiento de producto, el hidrolisato o autolisato puede lavarse repetidamente (p.ej. hasta 5 veces, p.ej. hasta 3 veces) con agua seguido de etapas de ultrafiltración. Después de la separación del permeado de la fracción sólida retenida por el filtro (denominada en la presente memoria retentato), puede esperarse que el contenido de sólidos del permeado sea aproximadamente de 1 a 8% en peso, p.ej. en el rango de entre 1 y 3,5% en peso, especialmente alrededor de 2% en peso, o en el rango de entre 3 y 8% en peso, especialmente alrededor de 4,5% en peso.
45

50 Después de la centrifugación y/o la ultrafiltración, el material de biomasa será una suspensión o pasta proteínica relativamente viscosa. Aunque éste puede usarse directamente en los productos y métodos descritos en la presente memoria, normalmente seguirá siendo procesado para eliminar el exceso de agua del producto. La selección de cualquier etapa o etapas adicionales de secado dependerá del contenido de agua del material y del contenido en humedad deseado para el producto final, y el especialista en la técnica podría determinarlo. Típicamente, el producto
55 será procesado adicionalmente de acuerdo a técnicas de secado por pulverización bien conocidas en la técnica.

La biomasa bacteriana o la biomasa procesada descrita en la presente memoria puede ser tratada para reducir el contenido de ácidos nucleicos de la biomasa. Los métodos para la reducción del contenido de ácidos nucleicos de la biomasa bacteriana son conocidos en la técnica e incluyen tratamientos de choque térmico, p.ej. según el método descrito en Larsen y Joergensen (*Applied Microbiology and Biotechnology* (1996) 45, pág. 137-140). Una biomasa

- bacteriana, o una fracción de la misma, tratada para reducir el contenido de ácido nucleico se denomina en la presente memoria biomasa, o fracción de biomasa, "con ácidos nucleicos reducidos", respectivamente. Una biomasa bacteriana con ácidos nucleicos reducidos comprende preferiblemente ácidos nucleicos (medidos como el contenido de ADN y ARN en el material de biomasa respecto a otros componentes que no sean el disolvente) a un nivel inferior al 40%, preferiblemente inferior al 30% y de forma especialmente preferible inferior al 20%, p.ej. a un nivel de entre 5 y 25%, del contenido de ácidos nucleicos de la biomasa bacteriana antes del tratamiento de reducción de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una biomasa con ácidos nucleicos reducidos según la invención preferiblemente comprende un contenido de ácido nucleico de entre 1 y 4% en peso, especialmente entre 2 y 3% en peso, especialmente alrededor del 2,2% en peso.
- Por tanto, los derivados adecuados del material de biomasa para uso según la invención incluyen una biomasa derivada de un cultivo que comprende bacterias metanotróficas mediante uno o más de los siguientes procesos: centrifugación, filtración (p.ej. ultrafiltración), homogenización, hidrólisis y/o autólisis. Otros derivados adecuados incluyen concentrados de biomasa (p.ej. una fracción de biomasa enriquecida tras centrifugación y/o ultrafiltración), permeados de biomasa (es decir, la fracción soluble obtenida tras filtración de la biomasa o de las fracciones de biomasa) y fracciones de biomasa con ácidos nucleicos reducidos. Otros derivados adecuados incluyen biomasa y derivados de biomasa cultivados en metanol, especialmente derivados de biomasa con ácidos nucleicos reducidos cultivados en metanol.
- En una realización preferida, por lo tanto, la invención proporciona una biomasa, pienso para peces o componente de pienso para peces como se ha definido en la presente memoria, donde la biomasa es como se ha descrito en la presente memoria, p.ej. derivada de un cultivo que comprende bacterias metanotróficas mediante uno o más de los siguientes procesos: centrifugación, filtración (p.ej. ultrafiltración), homogenización, hidrólisis y/o autólisis, o donde la biomasa es un concentrado de biomasa, un permeado de biomasa o una fracción de biomasa con ácidos nucleicos reducidos.
- Con el término "biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas" se pretende indicar un cultivo con propiedades nutritivas de bacterias metanotróficas como se ha definido anteriormente, o un extracto o fracción procesada de dicho cultivo con propiedades nutritivas. Con "propiedades nutritivas" se pretende indicar que la biomasa es adecuada para uso como ingrediente en piensos para peces, p.ej. es adecuada para la sustitución parcial de ingredientes convencionales de los piensos, tal como la harina de pescado. La biomasa o el pienso para peces de la invención es adecuada para la prevención o el alivio de la enteritis inducida por vegetales en peces que padecen dicha afección.
- Típicamente, la biomasa descrita en la presente memoria se administrará a los peces en combinación con el material vegetal que induce la enteritis, p.ej. en un pienso para peces formulado, y por tanto preferiblemente se incorpora a un pienso convencional que contenga una fuente de proteínas vegetales, p.ej. harina de soja. Los métodos para mezclar componentes de piensos y producir piensos para peces (p.ej. en forma extruida o de partículas) son bien conocidos en la técnica. Las formas preferidas para los piensos para peces de la invención incluyen las formas particuladas en seco, expandidas y extruidas, y también incluyen formas húmedas o semi-húmedas. Alternativamente, la biomasa se puede administrar a los peces por separado del material vegetal que induce enteritis, como un suplemento a la dieta.
- Un proceso para preparar un pienso para peces o un componente del pienso para peces según la invención, p.ej. como se ha descrito antes, generalmente incluirá el mezclado de la harina proteínica bacteriana con un material vegetal que causa enteritis (p.ej. harina de soja) y, opcionalmente, con uno o más ingredientes de piensos para peces. A continuación, dicha mezcla puede seguir siendo procesada. Los ingredientes y métodos convencionales adecuados para preparar piensos para peces y componentes de piensos son bien conocidos en la técnica (véase también la Tabla 2 y el Ejemplo 4).
- Por tanto, vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona un proceso para preparar un pienso para peces o un componente de pienso según la invención, proceso que comprende el mezclado de una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas y un material vegetal causante de enteritis (p.ej. harina de soja). En una realización preferida, el proceso comprende el mezclado de dicha biomasa con uno o más ingredientes de pienso convencionales.
- Los peces que pueden padecer enteritis inducida por vegetales incluyen peces tanto carnívoros como omnívoros (aunque el grado en el que padecen la afección dependerá de varios factores, que incluyen la especie de pez, el nivel de inclusión y la duración de la administración del material vegetal, etc.). La afección se observa típicamente después de entre 1 día y 4 semanas de la administración al pez de alimentos derivados de vegetales. Los niveles típicos de inclusión dietaria de materiales de base vegetal que dan lugar a enteritis en peces son de al menos el 5% en peso, especialmente al menos 8% en peso y particularmente al menos 10% en peso (en base al peso total de la dieta). Dichos valores también pueden darse en base al peso total de proteína dietaria y pueden ser de al menos el 5% en peso, preferiblemente al menos 8% en peso, p.ej. en el rango de 8 a 40%, preferiblemente de 10 a 25%. Los alimentos derivados de vegetales que pueden inducir enteritis son los definidos en la presente memoria, pero incluyen harina de soja (de contenido graso completo y desgrasada), así como concentrados proteínicos de guisante y otras materias causantes de enteritis, p.ej. semillas de altramuz.

El nivel máximo tolerable de proteína vegetal en el pienso según la invención dependerá de la especie de pez y del nivel de otros componentes del pienso, especialmente del nivel de biomasa en el pienso, pero puede ser determinado fácilmente por los especialistas en la técnica.

5 Un pienso convencional (p.ej. para salmónidos) puede comprender (en peso), por ejemplo: 10-60%, p.ej. aproximadamente 30%, de harina de pescado; 5-35%, p.ej. aproximadamente 20%, de aceite de pescado; 0-35%, p.ej. aproximadamente 20%, de ingredientes proteínicos vegetales no causantes de enteritis; 5-20%, p.ej. aproximadamente 10%, de aceites vegetales; 5-15%, p.ej. aproximadamente 10%, de ingredientes de almidón (p.ej. trigo); y aproximadamente un 1% de otros componentes (p.ej. minerales, vitaminas, agentes colorantes, etc.). Los ejemplos de dichos piensos se muestran en el Ejemplo 2.

10 En una realización, el pienso para peces de acuerdo a la invención puede comprender (respecto al peso total de pienso): 0-25%, p.ej. 5-15%, preferiblemente aproximadamente 12% de harina de pescado; 1-50%, preferiblemente 5-40%, especialmente 10-25%, p.ej. aproximadamente 15%, de biomasa bacteriana como la definida en la presente memoria; y 5-50%, p.ej. 10-40% ó 15-30%, preferiblemente aproximadamente 20%, de material vegetal causante de enteritis (p.ej. harina de soja). En una realización adicional, el pienso para peces según la invención puede comprender (respecto al peso total de pienso): 0-25%, p.ej. 5-15%, preferiblemente aproximadamente 10% de harina de pescado; 2,5-30%, preferiblemente 5-20%, especialmente 10-15%, de biomasa bacteriana como la definida en la presente memoria; y 5-20%, preferiblemente 10-15%, de material vegetal causante de enteritis (p.ej. harina de soja). El pienso para peces de la invención comprenderá típicamente otros componentes para la salud y la nutrición de peces, tal como los enumerados anteriormente. El especialista en la técnica puede determinar las cantidades de dichos componentes adicionales.

25 Cuando el pienso para peces piensa destinarse a la alimentación de salmones, éste puede contener al menos un 5% en peso de harina de soja, p.ej. al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20% o al menos un 25% en peso (en base al peso total de la dieta). Cuando el pienso para peces está destinado a la alimentación de truchas, el pienso puede contener al menos un 10% en peso de harina de soja, p.ej. al menos un 20%, al menos un 30% o al menos un 35% en peso (en base al peso total de la dieta).

30 Como se apreciará, cuando hay presentes otros ingredientes en el pienso final y no se pretende que la biomasa bacteriana suponga una contribución significativa al contenido proteínico de la dieta para peces, es preferible que ésta se use en cantidades relativamente bajas siempre que sea capaz de lograr los efectos necesarios de reducción de la enteritis. Por otro lado, cuando se pretende que la biomasa contribuya al contenido proteínico de la dieta, ésta puede usarse en cantidades mayores. La cantidad real de biomasa que puede usarse dependerá naturalmente de varios factores, que incluyen la naturaleza del material vegetal causante de enteritis (es decir, hasta qué punto es responsable de la enteritis) y de la cantidad en que está presente en el pienso, de la naturaleza de la especie de pez, etc. Teniendo en cuenta estos factores, el especialista en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades de biomasa adecuadas.

35 En una realización, un pienso para peces de la presente invención puede comprender al menos un 0,5% en peso de biomasa bacteriana (tal como se define en la presente memoria), preferiblemente al menos un 0,75% en peso, p.ej. al menos 1, 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 ó 5% en peso. Es particularmente preferido un pienso para peces que comprende entre 1,5 y 2,5% en peso de biomasa bacteriana. Alternativamente, también se prefiere un pienso para peces que comprende entre 1 y 50% en peso, especialmente entre 2 y 40% en peso, p.ej. entre 2,5 y 30%, entre 5 y 20% o entre 10 y 15% en peso. También se prefiere un pienso para peces que comprende entre 20 y 50% en peso, especialmente entre 30 y 40% en peso, de biomasa bacteriana. En una realización adicional, el pienso para peces de la presente invención puede comprender hasta un 40% en peso de materia vegetal causante de enteritis como se ha definido en la presente memoria (p.ej. harina de soja), preferiblemente hasta un 30% en peso. Se prefiere un pienso para peces que comprende entre 5 y 40% en peso de materia vegetal, especialmente entre 10 y 35%, p.ej. entre 10 y 15%, en peso o 20 y 30% en peso de materia vegetal. Especialmente se prefiere un pienso para peces que comprende entre 2,5 y 15% en peso de biomasa bacteriana y entre 10 y 15% en peso de materia vegetal causante de enteritis como se ha definido en la presente memoria (p.ej. harina de soja).

50 La proporción de materia vegetal (p.ej. harina de soja) respecto a biomasa bacteriana en los piensos descritos se encuentra preferiblemente entre 1:10 y 10:1, preferiblemente entre 1:5 y 5:1, entre 1:3 y 3:1 ó entre 1:2 y 2:1, especialmente preferido aproximadamente 1:1. En una realización alternativa, la proporción de materia vegetal respecto a biomasa en los piensos descritos en la presente memoria puede ser inferior a 80:1, preferiblemente inferior a 40:1, p.ej. menos de 16:1. Por ejemplo, las proporciones adecuadas pueden ser de 8:1 a 1:4, preferiblemente de 4:1 a 1:3, especialmente de 3:2 a 2:5. En una realización alternativa, la proporción de materia vegetal a biomasa en los piensos descritos en la presente memoria puede ser de 25:1 a 2:1, especialmente alrededor de 4:1. Una proporción preferida de materia vegetal (p.ej. harina de soja) respecto a biomasa en los piensos descritos en la presente memoria es inferior a 8:1, especialmente inferior a 4:1, p.ej. entre 4:1 y 1:1, especialmente aproximadamente 2:1.

60 En la realización de la invención en la que se proporciona la biomasa bacteriana como parte de un componente del pienso, las cantidades relativas de biomasa y materia vegetal causante de enteritis pueden ser las mismas fijadas antes con respecto a los piensos anteriores, es decir, cuando no se proporcione biomasa o materia vegetal adicional

- en el pienso final (y por tanto la proporción de dichos componentes en el pienso final será la misma que en el componente para pienso). Alternativamente, las cantidades relativas de biomasa y materia vegetal en el componente para pienso pueden ser tales que la incorporación de dicho componente al pienso final dé como resultado las proporciones descritas antes. En una realización particularmente preferida, la proporción de materia vegetal (p.ej. harina de soja) respecto a biomasa en el componente para pienso está entre 20:1 y 1:4, preferiblemente entre 8:1 y 1:3. El componente para pienso preferido puede comprender una proporción de materia vegetal causante de enteritis a biomasa de alrededor de 10:1 a alrededor de 4:1, siendo particularmente preferida una proporción de 10:1. En una realización alternativa, un componente para pienso preferido comprende una proporción de materia vegetal causante de enteritis a biomasa entre 4:1 y 1:1, p.ej. alrededor de 4:1, alrededor de 2:1 o alrededor de 3:2.
- 10 Particularmente preferido de acuerdo con la invención es un componente para pienso que comprenda aproximadamente un 10% en peso de biomasa bacteriana y aproximadamente un 90% en peso de materia vegetal causante de enteritis. También se prefiere de acuerdo con la invención un componente de pienso que comprenda aproximadamente un 20% en peso de biomasa bacteriana y aproximadamente un 80% en peso de materia vegetal causante de enteritis (p.ej. harina de soja), o que comprende aproximadamente 35% en peso de biomasa bacteriana y aproximadamente 65% en peso de materia vegetal causante de enteritis.

Se contempla que el material de base vegetal descrito en la presente memoria se use como sustituto de harina de pescado o de otras fuentes proteínicas causantes de enteritis en piensos para peces. Por consiguiente, la invención proporciona además un pienso para peces que tiene un contenido en harina de pescado reducido, que se caracteriza porque parte o toda la harina de pescado es sustituida por una materia vegetal causante de enteritis y una biomasa bacteriana como la definida en la presente memoria. Preferiblemente, el material vegetal es como se ha definido aquí anteriormente y de forma especialmente preferible es harina de soja. Preferiblemente, se puede sustituir al menos el 50% de la harina de pescado, p.ej. al menos el 75%, al menos el 85% o al menos el 95%.

Aunque los métodos descritos en la presente memoria son aplicables a cualquier pez susceptible a enteritis inducida por vegetales, la presente invención está dirigida particularmente a peces carnívoros, especialmente salmónidos (de la familia *Salmonidae*) y particularmente salmón, p.ej. salmón atlántico (*Salmo salar*), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) o salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*); trucha, p.ej. trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); salvelino, p.ej. trucha ártica (*Salvelinus alpinus*); lavareto, p.ej. lavareto común (*Coregonus lavaretus*); timalo, p.ej. *Thymallus thymallus*; y seriola, p.ej. *Seriola dumerili*. La invención también es aplicable a besugos, p.ej. dorada (*Sparus aurata* Linn.) y besugo; carpas, p.ej. carpa común (*Cyprinus carpio*); bacalao, p.ej. bacalao atlántico (*Gadus morhua*); fletán, p.ej. fletán atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*); rodaballo, p.ej. rodaballo europeo (*Psetta maxima*); róbalo (p.ej. róbalo asiático); tilapia, p.ej. del género *Oreochromis*; y pez gato, p.ej. pez gato de canal (*Ictalurus punctatus*) y miembros de la familia *Pangasiidae* (p.ej. *Pangasius bocourti*).

La invención se describirá ahora en más detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes y en referencia a las Figuras anexas, en las que:

35 Figura 1: muestra secciones transversales de las paredes del intestino distal de un salmón atlántico alimentado según el procedimiento del Ejemplo 4. La Figura 1A es una muestra procedente de un pez alimentado con una dieta que comprende un 13% en peso de harina proteínica bacteriana (y que no muestra signos de enteritis). La Figura 1B es una muestra procedente de un pez alimentado con una dieta de harina de pescado que comprende un 41% en peso de harina de pescado y un 20% en peso de harina de soja (y sin harina proteínica bacteriana), que presenta una morfología altamente característica de enteritis inducida por soja.

Figura 2: muestra una puntuación de acumulación de leucocitos en la lámina propia de las paredes del intestino distal de un salmón atlántico alimentado según el procedimiento del Ejemplo 5.

Figura 3: muestra una puntuación de epitelios de las paredes del intestino distal de un salmón atlántico alimentado según el procedimiento del Ejemplo 5.

45 Figura 4: muestra una puntuación de pliegues intestinales (atrofia reducida) de las paredes del intestino distal de un salmón atlántico alimentado según el procedimiento del Ejemplo 5.

Figura 5: muestra una puntuación de los niveles de edema en el intestino distal de un salmón atlántico alimentado según el procedimiento del Ejemplo 5.

Ejemplo 1 – Componentes del pienso para peces

50 La Tabla 1 muestra composiciones típicas de los diversos ingredientes que pueden ser formulados para producir piensos para peces:

Tabla 1

	Harina de pescado	Trigo	Harina de soja	Harina proteínica bacteriana
Ingredientes, g·kg ⁻¹				
Proteína sin purificar	677,50	134,63	454,56	656,25
Materia seca	913,24	861,95	881,36	921,27
Cenizas	127,48	13,18	58,02	65,00
Lípidos sin purificar	80,48	13,43	9,30	109,65
Almidón	5,80	598,00	4,00	20,00

Ejemplo 2 – Piensos para peces completos

5 La Tabla 2 muestra la formulación de varias dietas para peces. La dieta 1 es una dieta de harina de pescado (HP); la dieta 2 es una dieta de harina de soja desgrasada al 20% (HS); y la dieta 3 es una combinación de un 13% de harina de pescado, un 20% de harina de soja desgrasada y un 30% de harina proteínica bacteriana (HPB) (los % son en peso referidos a la dieta total). La dieta 3 está de acuerdo con la invención.

Tabla 2

	Dieta HP	Dieta HS	Dieta HPB-HS
Ingredientes principales, g·kg ⁻¹			
Harina de pescado ¹	591,4	412,4	127,4
Harina proteínica bacteriana ²	-	-	300,0
Harina de soja desgrasada ³	-	200,0	200,0
Aceite de pescado ⁴	233,0	224,0	216,0
Trigo	170,0	158,0	151,0
Mezcla de vitaminas, minerales, marcador y astaxantina ⁵	5,6	5,6	5,6

¹ Norse LT-94®, harina de pescado seca a baja temperatura (Norsildmel, Bergen, Noruega).

10 ² BioProtein® (Norfem AS, Stavanger, Noruega).

³ Harina de soja extraída y tostada (Denofa, Fredrikstad, Noruega).

⁴ Silfas, Karmsund, Noruega.

15 ⁵ Por kg de dieta: vitamina A: 2500 UI; vitamina D3: 1500 IU; vitamina E: 200 mg; vitamina K3: 10 mg; vitamina B1: 15 mg; vitamina B2: 25 mg; vitamina B3: 75 mg; vitamina B5: 30 mg; vitamina B6: 15 mg; vitamina B9: 5 mg; vitamina B12: 0,02 mg; vitamina C: 125 mg; biotina: 0,25 mg; Ca: 1,1g; Zn: 120 mg; Mn: 15 mg; Cu: 5 mg; Co: 1 mg; I: 3 mg; astaxantina: 175 mg (F. Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza); Óxido de Itrio 99,9% de pureza: 100 mg (Metall Rare Earth Limited, Shenzhen, Guangdong, China).

Ejemplo 3 – Piensos completos para peces

20 La Tabla 3 muestra la formulación de varias dietas para peces. La dieta HP es una dieta de harina de pescado de alta calidad. Las dietas 1-6 están de acuerdo con la invención y comprenden niveles variables de harina proteínica bacteriana y una cantidad fija de harina de soja desgrasada que se usan para sustituir, en parte, al componente de harina de pescado de la dieta HP.

Tabla 3

	Dieta HP	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
Ingredientes principales, g·kg ⁻¹							
Harina de pescado ¹	642,4	459,4	436,4	412,4	364,4	316,4	269,4
Harina proteínica bacteriana ²	0	0	25	50	100	150	200
Harina de soja desgrasada ³	0	200	200	200	200	200	200
Aceite de pescado ⁴	189	184	183	182	181	180	178
Trigo	163	151	150	150	149	148	147
Mezcla de vitaminas, minerales, marcador y astaxantina ⁵	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

¹⁻⁵ como en el Ejemplo 3.

Ejemplo 4 – Estudio de administración de piensos

5 Dietas

Se formularon tres dietas según la Tabla 2 del Ejemplo 2. Éstas comprendían: una dieta de control basada en harina de pescado de alta calidad (dieta HP), una dieta con 200 g·kg⁻¹ de harina de soja desgrasada (dieta HS) y una dieta que contenía una combinación de 300 g·kg⁻¹ de harina proteínica bacteriana (HPB) y 200 g·kg⁻¹ de HS (dieta HPB-HS). Se usó HPB y HS para sustituir HP y la cantidad de trigo y aceite de pescado de cada dieta se alteró para proporcionar dietas que tuvieran aproximadamente la misma proporción de proteína sin purificar, lípidos sin purificar y almidón. La adición de vitaminas y minerales fue constante para todas las dietas, y se usó óxido de itrio como marcador no digerible para la determinación de la digestibilidad aparente de nutrientes. Las dietas fueron producidas mediante tecnología de extrusión en el “Center for Feed Technology”, Ås, Noruega. Todos los ingredientes secos fueron molidos en un molino de martillos Münch (HM 21.115, Wuppertal, Alemania) con una pantalla de 1 mm. Las mezclas de harina fueron acondicionadas (97 ± 1,9°C; 26 ± 1,4% de humedad (media ± S.E.M.)) en un acondicionador de doble hueco (BCTC 10, Bühler, Uzwil, Suiza) antes de la extrusión (110 ± 5,9°C en el troquel) con un extrusor de tornillo gemelo Bühler de sección 5 (BCTG 62/20 D, Bühler, Uzwil, Suiza) con un troquel de 3 mm.

Peces y condiciones de cría

El ensayo con peces se llevó a cabo en AKVAFORSK, Sunndalsøra, Noruega, con salmón atlántico (*Salmo salar*) con 133,5 g de peso medio inicial. Cada dieta fue administrada a tres grupos de peces mantenidos en tanques de fibra de vidrio de 1 m³ suministrados con agua de mar (8,6°C; 32,5 g·L⁻¹ de salinidad). El ensayo de alimentación duró 80 días. Todos los tanques tenían luz 24 horas al día y las dietas fueron administradas cada 10 minutos, 24 horas al día, usando alimentadores de disco movidos eléctricamente. El pienso sobrante fue recogido con tamiz del agua de salida de cada tanque y se monitorizó la captación de pienso.

Puesto que la dieta comercial usada para criar los peces podrían haber contenido harina de soja, todos los peces fueron alimentados con la dieta HP durante al menos cuatro semanas antes del ensayo para evitar posibles interacciones con las dietas experimentales que contenían harina de soja. Se considera que cuatro semanas de pre-alimentación son suficientes para una reconstitución completa de los pliegues intestinales, en caso de que estuvieran dañados.

30 Pesada y toma de muestras para análisis

Se molieron y congelaron los piensos y muestras aleatorias de los ingredientes de pienso individuales ricos en proteínas antes del análisis químico. Los peces fueron pesados en masa al inicio del experimento, y se pesaron individualmente al final del experimento (día 80). A la finalización, se seleccionaron cinco peces de cada tanque de forma aleatoria para la toma de muestras de órganos para la evaluación histoquímica.

Se diseccionaron los tractos intestinales de cinco peces de cada tanque para realizar un examen histológico del tejido de la pared del intestino ciego pilórico y del intestino medio y distal. Se obtuvieron muestras de aproximadamente 5 x 5 mm de la parte media de las secciones intestinales y se fijaron en formaldehído tamponado con fosfato al 4% (10% de formalina). El tejido fijado con formalina fue deshidratado de forma rutinaria en etanol 48 horas antes del muestreo, equilibrado en xileno y embebido en parafina de acuerdo a las técnicas histológicas estándares. Se cortaron secciones de aproximadamente 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina antes de ser examinadas con un microscopio de luz. Se evaluó la morfología intestinal de acuerdo a los siguientes criterios

5 descritos para la enteritis inducida por harina de soja en salmón atlántico (Baeverfjord y Krogdahl, ver anterior): (1) ensanchamiento y acortamiento de los pliegues intestinales; (2) pérdida de la vacuolización supranuclear en las células de absorción (enterocitos) del epitelio intestinal; (3) ensanchamiento de la lámina propia central de los pliegues intestinales, con un aumento de la cantidad de tejido conectivo; y (4) infiltración de una población mixta de leucocitos en la lámina propia y en la submucosa.

Análisis químicos y bioquímicos

10 La materia seca, la proteína sin purificar (N de Kjeldahl x 6,25) y las cenizas fueron analizadas según procedimientos estandarizados de AOAC International, EE.UU. (AOAC, 1990), los lípidos sin purificar fueron determinados tras hidrólisis con éter de petróleo en un Extractor de Disolvente Acelerado (ASE200) de Dionex (Sunnyvale, CA, EE.UU.), y el almidón (Kit de Ensayo de Almidón Total [AA/AMG], Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda) se determinó como la glucosa total tras hidrólisis con glucosidasa.

Cálculos y análisis estadísticos

15 Se calculó la captación de pienso en un periodo de tiempo como $MS_{\text{pienso}} \times PC_0^{-1}$, donde MS_{pienso} es el consumo de materia seca de pienso y PC_0 representa el peso corporal inicial (media de los tanques) del periodo de tiempo. Se calcularon coeficientes de crecimiento térmico como $1000 \times (PC_1^{1/3} - PC_0^{1/3})/d^0$, donde PC_1 representa el peso corporal final y d^0 representa la suma térmica (temperatura diaria media x días del periodo). Se calculó la relación de conversión de pienso (RCP) como $MS_{\text{pienso}} \times (PC_1 - PC_0)^{-1}$.

20 Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando JMP de SAS Institute Inc. Se clasificaron las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las medias. Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (s.e.m., del inglés "standard error of mean").

Resultados

La Tabla 4 muestra la composición química analizada de las diversas dietas.

Tabla 4

	Dieta HP	Dieta HS	Dieta HPB-HS
Materia seca (MS), g·kg ⁻¹	951	954	949
Composición química, g·kg ⁻¹			
MS			
Proteína sin purificar	455	438	446
Grasa sin purificar	284	266	258
Almidón	110	113	122
Cenizas	83	78	56
Energía bruta, MJ·kg ⁻¹	24,2	24,5	24,6

25 La Tabla 5 muestra las medias de mínimos cuadrados para la captación de pienso, el crecimiento y la conversión de pienso (n=3).

Tabla 5

	Dieta HP	Dieta HS	Dieta HPB-HS	S.E.M. agrupada	Valor-P
Captación de pienso, g·MS (kg de peso inicial) ⁻¹	1239	1080	1075	43,1	0,060
Peso medio, g·pez ⁻¹					
Inicio	133 ^b	132 ^a	135 ^c	0,2	<0,001
Fin	362 ^b	319 ^a	328 ^a	8,0	0,020
Coefficiente de crecimiento térmico (CCT)	2,90 ^b	2,49 ^a	2,53 ^a	0,076	0,017

	Dieta HP	Dieta HS	Dieta HPB-HS	S.E.M. agrupada	Valor-P
Relación de conversión de pienso, g de captación de MS·(g de ganancia de peso corporal) ⁻¹	0,72 ^a	0,76 ^b	0,75 ^b	0,007	0,011

^{a,b,c} Los diferentes superíndices en una fila indican diferencias significativas (P<0,05) entre los tratamientos de dieta.

La Tabla 6 muestra los resultados de una clasificación visual a partir de la histología de secciones de intestino distal.

5 Tabla 6

	Dieta HP	Dieta HS	Dieta HPB-HS
Clasificación de intestino distal (Nº de peces por cada 15)			
Intestino normal	15	0	15
Inflamación menor	0	0	0
Inflamación moderada a grave	0	15	0

10 Las Figuras 1A y 1B muestran secciones transversales de paredes de intestino de peces alimentados con la dieta HPB-HS (Figura 1A) y de peces alimentados con la dieta HS (Figura 1B). Cabe destacar los pliegues intestinales ensanchados con una celularidad incrementada en los tejidos subepiteliales en peces alimentados con la dieta HS con respecto a los peces alimentados con la dieta HPB-HS.

Conclusiones

Los estudios morfológicos del intestino distal muestran que la harina proteínica bacteriana (HPB) previene la enteritis inducida por la harina de soja.

Ejemplo 5 – Estudio de alimentación

15 *Dietas*

Se formularon siete dietas como se describe en la Tabla 3; un dieta de control basada en harina de pesado (HP) y seis dietas con inclusión de 200 g de harina de soja (HS) por kg de pienso, y cantidades crecientes de harina proteínica bacteriana (HPB).

20 Las dietas fueron producidas usando tecnología de extrusión como se ha descrito previamente y fueron recubiertas a vacío con aceite de pescado. Las partículas de pienso resultantes tenían un diámetro de aproximadamente 3,5 mm.

Peces y condiciones de cría

25 Salmones atlánticos (*Salmo salar*) con un peso inicial medio de aproximadamente 273 g fueron distribuidos aleatoriamente en 14 tanques de 50 peces por tanque. Se suministró agua marina a los tanques y el experimento de alimentación duró 6 semanas. Se suministró pienso a todos los tanques cada 30 minutos, y el exceso de pienso se recuperó del agua de salida. Los peces fueron alimentados con aproximadamente un 20% de exceso para asegurar la máxima captación de pienso. El pienso de exceso, el oxígeno, la temperatura y los incidentes inusuales se registraron diariamente según las rutinas estandarizadas. Todos los peces fueron alimentados con la dieta de control basada en HS durante las tres semanas anteriores al experimento para evitar posibles interacciones entre las dietas experimentales y las dietas comerciales usadas en la estación de investigación.

30 *Pesada y muestro para análisis*

Los peces fueron pesados al inicio y al término del experimento de alimentación. Todos los peces fueron anestesiados con MS222 y sacrificados mediante un golpe afilado en la cabeza antes de la toma de muestras al término del experimento.

35 Se tomaron muestras de órganos de seis peces de cada tanque para realizar estudios morfológicos e inmunohistoquímicos. Se pesó el tracto gastrointestinal y el hígado de diez peces por tanque, y se dividió el tracto

gastrointestinal en las siguientes secciones: estómago, región pilórica, intestino medio e intestino distal. Se recogieron heces de 50 peces por tanque y se agruparon para la determinación de la digestibilidad de nutrientes.

La evaluación morfológica del intestino distal se llevó a cabo según un método basado en el descrito por Baeverfjord y Krogdahl (ver arriba) que incluye la evaluación de los siguientes cuatro parámetros:

- 5 1) Acumulación de leucocitos (linfocitos, granulocitos y células granulares) en la lámina propia;
 - 2) Cambios en el epitelio que incluyen a) reducción de la vacuolización; b) vasofilia citoplásmica (indicativa de aumento de ARN); y c) reducción de altura celular;
 - 3) Atrofia, es decir, reducción de la altura de los pliegues intestinales; y
 - 4) Edema, es decir, acumulación fluido rico en proteínas en la lámina propia.
- 10 Se evaluaron secciones histológicas individuales con una clasificación entre 0 (sin signos de cambios intestinales) y 2 (signos marcados de cambios intestinales). Los peces con una clasificación de 1 o menos generalmente se consideraron dentro de la variación normal esperada en peces sanos.

Resultados

- 15 Los resultados de los exámenes morfológicos e histológicos de los intestinos distales se muestran en las Figuras 2 a 5. Los datos incluidos en dichas figuras son valores medios de dos tanques de peces independientes, es decir, se usaron tanques duplicados para cada dieta. La Figura 2 muestra la reducción de la acumulación de leucocitos en la lámina propia al administrar la HPB. La Figura 3 muestra el efecto protector de la HPB sobre el epitelio. La Figura 4 muestra los cambios en los pliegues intestinales (atrofia reducida) al aumentar la HPB en la dieta. La Figura 5 muestra la reducción de edema al aumentar los niveles de HPB en la dieta.

- 20 Los resultados también sugieren que no hay efectos significativos sobre el crecimiento, la digestibilidad de lípidos y almidón o la eficacia del pienso entre las diferentes dietas.

La inclusión de HPB en las dietas aumentó significativamente ($P < 0,001$) el peso del intestino distal, en base al peso de intestino distal como proporción del peso corporal total, mientras que el peso de las demás secciones del tracto gastrointestinal o del hígado no se vio afectado significativamente por la dieta.

25 *Conclusiones*

- Estos datos sugieren que el efecto protector de la HPB viene determinado por el nivel de inclusión en el pienso. No se observaron signos morfológicos indicativos de enteritis (clasificado como un grado de cambios intestinales superior a 1) en los intestinos distales de salmones atlánticos alimentados con un 10% o más de HPB en su dieta (dietas 3-7) y sólo se observaron signos indicativos de enteritis en los epitelios (Figura 3) de peces alimentados con un 5% de HPB en la dieta. Los datos sugieren que la inclusión de harina proteínica bacteriana en la dieta en una proporción a partir de 4:1 de HS:HPB tiene efectos protectores frente a la enteritis inducida por harina de soja en el salmón atlántico.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas para uso en la prevención o el alivio de enteritis inducida por vegetales en peces.
- 5 2. Un pienso para peces para uso en la prevención o alivio de enteritis inducida por vegetales en peces, comprendiendo dicho pienso para peces una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas.
3. La biomasa o el pienso para peces para uso según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, donde la enteritis inducida por vegetales es enteritis inducida por soja.
- 10 4. La biomasa o el pienso para peces para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha biomasa deriva de un cultivo microbiano que comprende una combinación de bacterias metanotróficas y heterotróficas.
- 5 15 5. La biomasa o el pienso para peces para uso según la reivindicación 4, donde la biomasa deriva de un cultivo microbiano que comprende una combinación de *Methylococcus capsulatus* (Bath) (cepa NCIMB 41526) y la bacteria heterotrófica DB3 (cepa NCIMB 41527) y DB5 (cepa NCIMB 41525), opcionalmente en combinación con DB4 (cepa NCIMB 41528).
6. La biomasa o el pienso para peces según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la biomasa deriva de uno o más de los siguientes procesos: fermentación, centrifugación, filtración (p.ej. ultrafiltración), homogenización, hidrólisis y/o autólisis.
7. La biomasa o el pienso para peces para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la biomasa es un concentrado de biomasa.
- 20 8. La biomasa o el pienso para peces para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para alimentar peces salmónidos, p.ej. salmón o trucha.
9. Un componente de pienso que consiste esencialmente en una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas en combinación con una materia vegetal causante de enteritis.
- 25 10. El componente de pienso de la reivindicación 9, donde el material vegetal causante de enteritis es harina de soja.
11. El componente de pienso de la reivindicación 9 ó de la reivindicación 10, donde la proporción de dicha materia vegetal respecto a dicha biomasa es inferior a 8:1, preferiblemente está entre 4:1 y 1:1, especialmente aproximadamente 2:1.
- 30 12. El componente de pienso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde dicha biomasa es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
13. El uso de una biomasa como la definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la fabricación de un agente para la prevención o el alivio de enteritis inducida por vegetales en peces.
- 35 14. Un proceso para preparar el componente de pienso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, proceso que comprende el mezclado de una biomasa derivada de un cultivo de bacterias metanotróficas y una materia vegetal causante de enteritis.

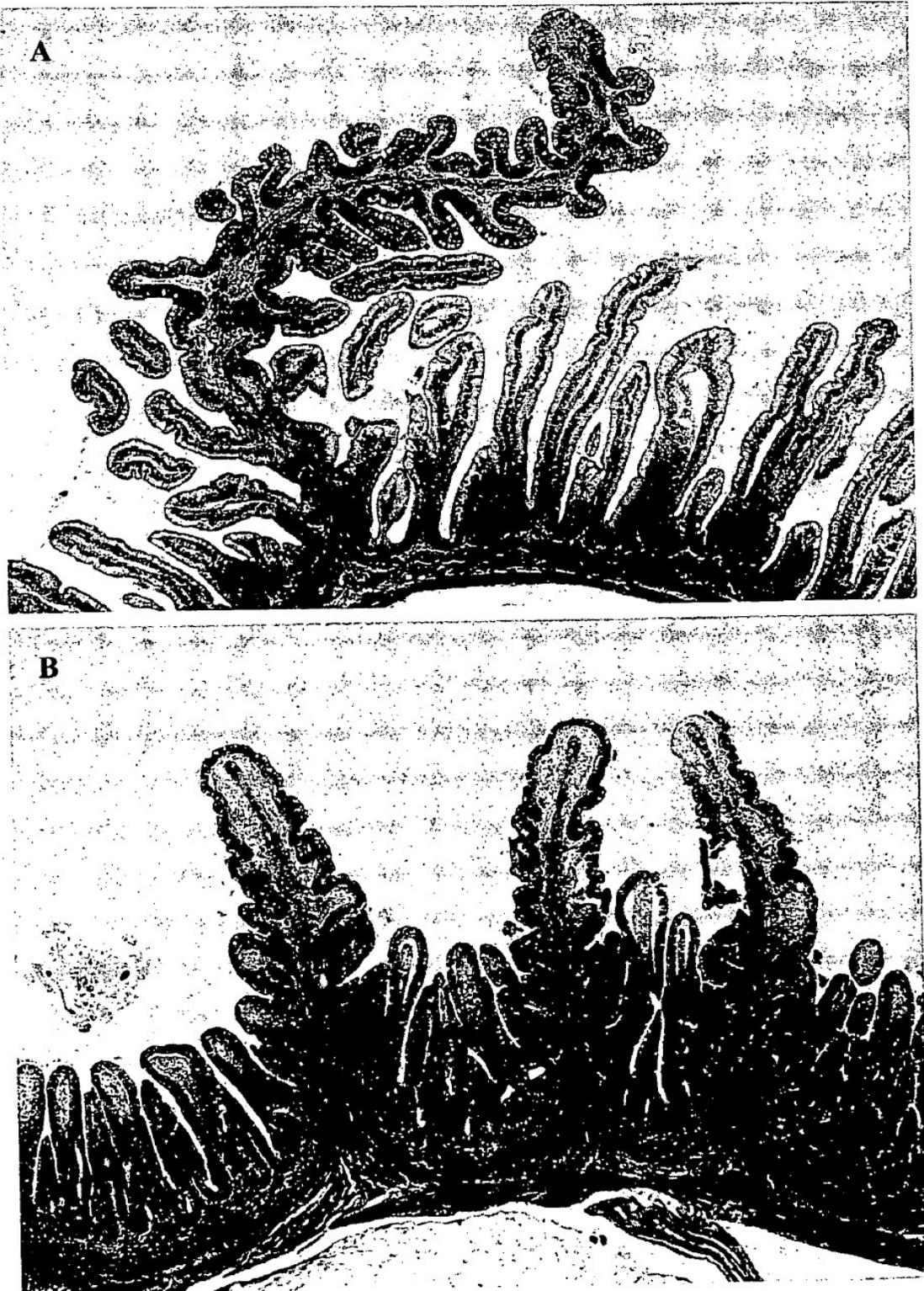


FIG. 1

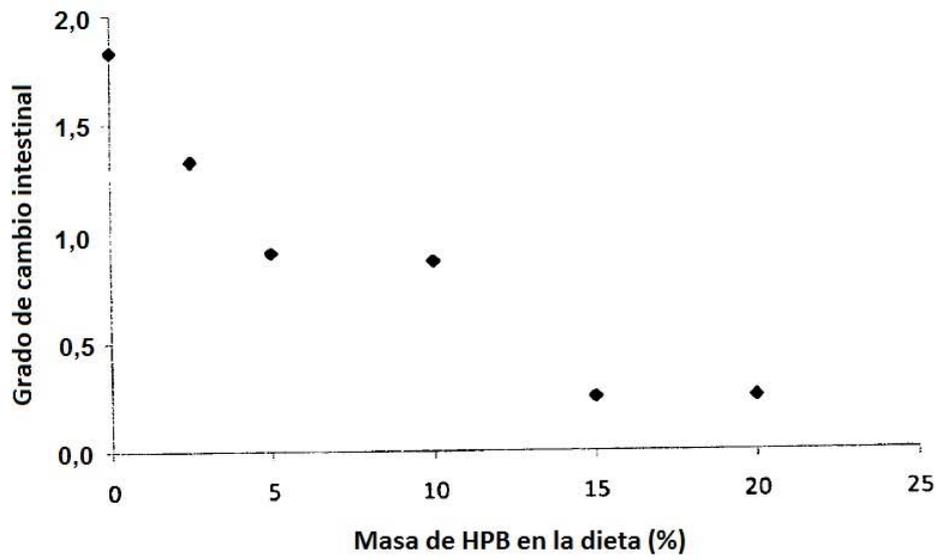


FIG. 2

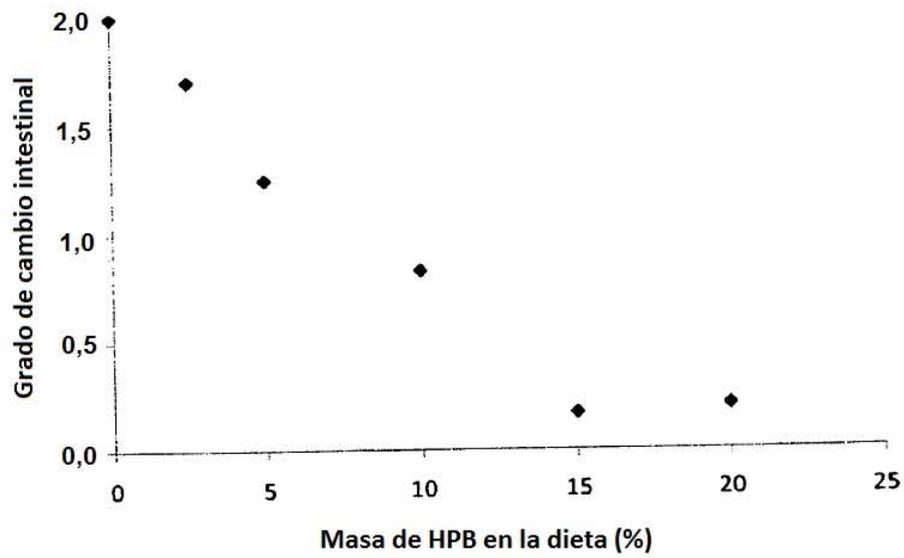


FIG. 3

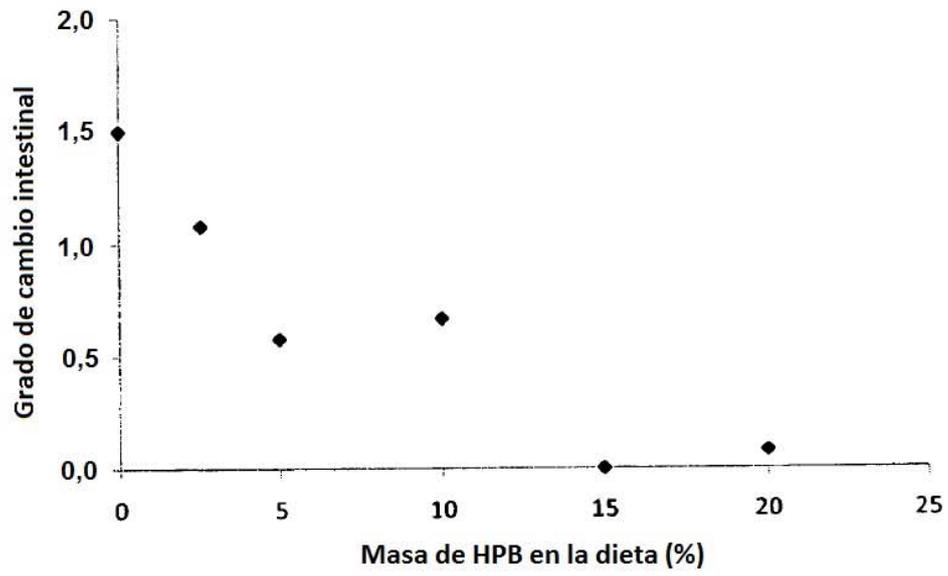


FIG. 4

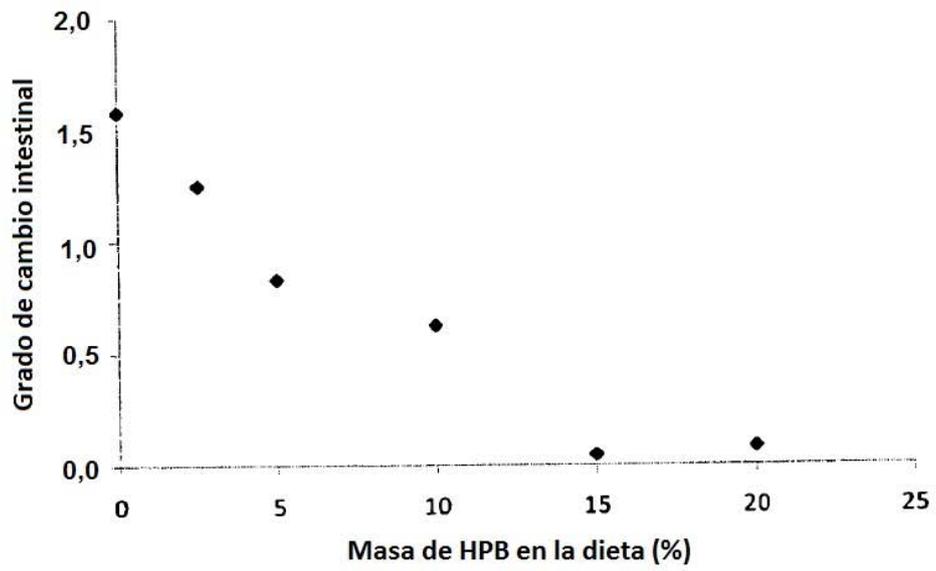


FIG. 5