

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 050**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/00** (2006.01)

**A23K 10/16** (2006.01)

**A23K 10/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2013 PCT/EP2013/072617**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14067950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2013 E 13789509 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2895006**

54 Título: **Utilización de hidrolizados de proteína y nucleótidos para mejorar la palatabilidad del alimento para peces**

30 Prioridad:

**31.10.2012 EP 12306363**

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

**27.12.2016**

73 Titular/es:

**SPECIALITES PET FOOD (100.0%)  
Z.A. du Gohélis  
56250 Elven, FR**

72 Inventor/es:

**HERAULT, MIKAËL y  
FOURNIER, VINCENT**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 595 050 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**

Utilización de hidrolizados de proteína y nucleótidos para mejorar la palatabilidad del alimento para peces.

5 La presente invención se refiere al campo de la acuicultura, más particularmente de la alimentación para peces en acuicultura.

Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para preparar gránulos ("pellets") de alimento para peces carnívoros que presentan una palatabilidad mejorada, en el que un hidrolizado de proteínas con un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% se combina con uno o más nucleótidos y se aplica a gránulos de alimento para peces carnívoros.

**Antecedentes de la invención**

15 Los productores y fabricantes en el campo de la acuicultura se enfrentan al reto de que la disponibilidad de las materias primas marinas se espera que se reduzca en los próximos años, mientras que la acuicultura sigue su expansión.

20 En particular, la disponibilidad en el mercado mundial de harina de pescado y aceite de pescado, los cuales han sido utilizados como la fuente dominante de proteína en los alimentos secos para peces, se está reduciendo drásticamente y los precios de estas materias primas se han incrementado considerablemente. En consecuencia, la industria de la acuicultura, especialmente la industria de alimentos para peces, ha predicho una escasez de tanto harina de pescado como aceite de pescado en el futuro. Pueden utilizarse fuentes alternativas de proteínas animales para los alimentos secos para peces. Por ejemplo, es conocida la utilización de materias primas terrestres (por ejemplo harina de sangre, harina de huesos, harina de plumas y otros tipos de harina producidas a partir de otros residuos de matadero, por ejemplo harinas avícolas), así como materias primas vegetales (por ejemplo harina de soja, harina de trigo, harina de colza, harina de arroz y similares). Éstas típicamente resultan más económicas y presentan mejor disponibilidad que la harina de pescado y el aceite de pescado. Sin embargo, en algunas regiones geográficas, incluyendo Europa, se prohíbe utilizar materias primas terrestres para la producción de alimentos para animales y peces productores de alimentos.

De esta manera, durante los últimos 20 años, ha crecido el interés de la industria de la alimentación acuícola en encontrar alternativas satisfactorias a las harinas de pescado y aceites de pescado destinados a la utilización en la preparación de alimentos para la industria piscícola. Sin embargo, el nivel dietético de la harina de pescado sigue resultando crucial para alcanzar el rendimiento de la alimentación, afectando tanto a la palatabilidad del alimento como a la utilización del mismo. Año tras años el contenido de harina de pescado en el alimento diseñado para las especies de peces carnívoros ha tendido a disminuir y actualmente está próximo a alcanzar un umbral crítico para el crecimiento de los peces y para la utilización del alimento. Los productos alimenticios vegetales y de origen terrestre actualmente se proponen de manera habitual para las formulaciones de alimento piscícola como alternativa a las harinas de pescado. Sin embargo, el equilibrado del perfil de aminoácidos en la dieta de las dietas ricas en vegetales para satisfacer los requisitos de aminoácidos de los peces no resulta suficientemente eficiente para satisfacer el rendimiento de pescado y de alimento.

45 En primer lugar resulta afectada la palatabilidad del alimento al sustituir la harina de pescado por harinas de origen vegetal y terrestre.

Desafortunadamente, los ingredientes comestibles dedicados a la palatabilidad del alimento piscícola son escasos. Centrándose en la palatabilidad para los peces y camarones, han podido identificarse muchas moléculas atractivas que es probable que participen en el olfato y el gusto. En particular, los aminoácidos y nucleótidos libres se encuentran entre los compuestos mejoradores de la palatabilidad más potentes, y los hidrolizados o extractos de peces y calamares aparentemente presentan un efecto positivo sobre el atractivo y palatabilidad del alimento. En el caso de que dichas materias primas o ingredientes especiales puedan utilizarse para mejorar la palatabilidad de las formulaciones alimentarias, también presentarán un interés nutricional. De esta manera, se preparan comúnmente mediante inclusión y se mezclan con las demás materias primas para preparar alimento piscícola de sabor agradable.

60 Existe una necesidad en la técnica de mejorar adicionalmente las propiedades mejoradoras de la palatabilidad de los mejoradores de palatabilidad estándares utilizados comúnmente en los alimentos piscícolas, tales como los aminoácidos y los nucleótidos, de manera que alcancen un resultado de mayor palatabilidad a dosis bajas y, de esta manera, a bajo coste.

Los documentos US 7.687.091 B2 y Aquaculture 148:191-200, 1997, de Kubitza et al., dan a conocer composiciones que comprenden aminoácidos y nucleótidos como agentes de palatabilidad o mejoradores alimentarios.

65 El comportamiento de alimentación de los peces se caracteriza porque no pican del alimento e ingieren rápidamente los gránulos. El tiempo de tránsito de los gránulos en el agua es muy corto, ya que son ingeridos muy rápidamente

por los peces al distribuirlos. Los gránulos no son fragmentados nunca (o raramente) en la boca del pez. De esta manera, un mejorador de palatabilidad satisfactorio debe presentar un contacto elevado con el agua para estimular los receptores olfativos y gustativos de los peces y resulte fácilmente detectado por los mismos.

5 Con respecto a la percepción del gusto, los peces son diferentes de otros animales en cierta especificidad. En cuanto a la fisiología, en los mamíferos las papilas gustativas se localizan en la boca y en el tracto digestivo, mientras que en peces las papilas gustativas se distribuyen en labios, espinas branquiales, faringe, cavidad oral y también sobre la superficie corporal, con algunas variaciones según especie (Ishimaru et al., 2005). Las especies de peces responden a los compuestos químicos solubles en agua, tales como los aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, nucleótidos y ácidos biliares, con mayor sensibilidad que los mamíferos (Hara, 1994). en el caso de los receptores gustativos de aminoácidos y del dulzor (T1R), al contrario que los mamíferos, los peces se caracterizan porque presentan múltiples T1R2, la totalidad de los cuales actúa como receptores de los aminoácidos, aunque dicho receptor está especializado en la percepción del dulzor en la mayoría de otros vertebrados. Los T1R2 de vertebrado probablemente han evolucionado para adaptarse a los nutrientes necesarios según la especie: los peces a los aminoácidos y los mamíferos a los azúcares (Oike et al., 2007).

Además, con respecto al receptor T2R sensible al sabor amargo, Dong et al. (2009) sugieren que se ha producido una divergencia mayor entre los genes de T2R intactos de los peces teleósteos y los tetrápodos. Estos genes del gusto se han clasificado como el 'grupo de los tetrápodos' y otros genes en los peces teleósteos como el 'grupo de los peces' (Dong et al., 2009). Éstas son pruebas de la diferencia de sensibilidad al gusto amargo entre los vertebrados terrestres y los peces. Una buena ilustración es la respuesta a la arginina, que se considera amarga en el ser humano y es un estimulante del sabor en los peces (Grosvenor et al., 1998).

De esta manera, los peces se consideran diferentes de los vertebrados terrestres, tales como los mamíferos, en su percepción del sabor.

De esta manera, los presentes inventores han llevado a cabo muchos ensayos, tal como se informa en la sección de Ejemplos, a continuación, con el fin de proporcionar mejoradores de palatabilidad (MP) muy potentes que comprenden aminoácidos y nucleótidos. De esta manera, los inventores han podido demostrar que los MP comprenden hidrolizados específicos de proteínas que resultan particularmente interesantes para la utilización en alimento piscícola y que además las propiedades de mejora de la palatabilidad pueden mejorarse significativamente mediante la combinación con nucleótidos.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar gránulos de alimento para peces carnívoros que presentan una palatabilidad mejorada.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para mejorar la palatabilidad de los gránulos de alimento para peces carnívoros.

La presente invención proporciona además un procedimiento para mejorar la palatabilidad de los gránulos de alimento para peces carnívoros, que contienen un hidrolizado de proteínas.

Asimismo, la invención se refiere a un procedimiento para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteínas para la aplicación en gránulos de alimento para peces carnívoros.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la alimentación de peces carnívoros.

La presente invención se refiere además a la utilización de uno o más nucleótidos para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteínas contenido en gránulos de alimento para peces carnívoros.

La presente invención proporciona además la utilización de uno o más nucleótidos para incrementar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteínas contenido en una composición mejoradora de la palatabilidad (CMP) destinada a la aplicación en gránulos de alimento para peces carnívoros.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto sobre la palatabilidad de alimento piscícola de una mezcla de 17 aminoácidos libres al utilizarlo en un alimento de base vegetal para lubinas (nivel de aplicación: 2%).

Figura 2. Comparación entre el efecto de mejora de la palatabilidad de una mezcla de 17 aminoácidos libres y de 6 aminoácidos libres y derivados al añadirlas a un alimento de base vegetal para lubinas (nivel de aplicación: 2%).

Figura 3. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de una CMP que comprendía 4 aminoácidos y

derivados añadidos a una mezcla de 17 aminoácidos libres, en el que dicha CMP se utilizó como capa externa de un alimento de base vegetal para lubinas (nivel de aplicación: 2%).

- 5      Figura 4. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de tres hidrolizados de diferente origen al utilizarlos como capa externa de un alimento de base vegetal para lubinas (nivel de aplicación: 2%).
- 10     Figura 5. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de CMP que comprendían nucleótidos (IMP/GMP 50/50) mezclados a diferentes niveles con un hidrolizado de levadura, aplicando dichas CMP como capa externa sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción de "hidrolizado/nucleótidos": 99/1, 97,5/2,5, 95/5 y 90/10 - nivel de aplicación: 2%).
- 15     Figura 6. Efecto sobre la palatabilidad de CMP que comprendían nucleótidos (IMP/GMP 50/50) mezcladas con un hidrolizado de atún, en el que dichas CMP se aplicaron como capas externas sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción de "hidrolizado/nucleótidos": 99/1, 98/2 y 97/3 - nivel de aplicación: 2%).
- 20     Figura 7a. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de una CMP que comprendía nucleótidos (IMP/GMP 50/50) añadida a una mezcla de aminoácidos libres, en la que dicha CMP se aplicó como capa externa sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 25     Figura 7b. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de una CMP que comprendía nucleótidos (IMP/GMP 50/50) añadida a un hidrolizado de calamar, en el que dicha CMP se aplicó como capa externa sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 30     Figura 7c. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de una CMP que comprendía nucleótidos (IMP/GMP 50/50) añadida a un hidrolizado de Tilapia, en el que dicha CMP se aplicó como capa externa sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 35     Figura 7d. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de una CMP que comprendía nucleótidos (IMP/GMP 50/50) añadida a un hidrolizado de atún, en el que dicha CMP se aplicó como capa externa sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 40     Figura 8. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de una CMP que comprendía nucleótidos (IMP/GMP 50/50) añadida a productos que presentaban diferentes grados de hidrólisis de las proteínas, en la que dichas CMP se aplicaron como capa externa sobre un alimento de base vegetal para lubinas (proporción "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 45     Figura 9. Influencia del grado de hidrólisis de CMP que contienen un hidrolizado mezclado con nucleótidos (IMP/GMP 50/50) sobre su efecto sobre la palatabilidad del alimento en lubinas alimentadas con un alimento de base vegetal (proporción de "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 50     Figura 10a. Efecto de IMP y GMP solos o conjuntamente sobre el efecto mejorador de la palatabilidad de un hidrolizado al añadirlo a un alimento de base vegetal en lubinas (proporción de "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 55     Figura 10b. Efecto de diferentes naturalezas de nucleótidos (IMP, AMP, UMP, CMP y GMP) y de algunas combinaciones de los mismos sobre el efecto mejorador de la palatabilidad de un hidrolizado al añadirlo a un alimento de base vegetal en lubinas (proporción de "hidrolizado/nucleótidos": 97,5/2,5 - nivel de aplicación: 2%).
- 60     Figura 11. Efecto sobre la palatabilidad del alimento piscícola de CMP que comprendían una combinación de hidrolizados de proteínas y nucleótidos (IMP/GMP 50/50) aplicada como capa externa sobre un alimento de base vegetal en Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (proporción de "hidrolizado/nucleótidos": 99,93/0,07 y 99,3/0,7 - nivel de aplicación: 2%).

60      **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

65      A menos que se indique específicamente lo contrario, los porcentajes expresados en la presente memoria son en peso.

En la presente exposición, los intervalos se indican abreviadamente, de manera que se evite tener que indicar extensamente e indicar todos y cada uno de los valores comprendidos en el intervalo. Puede seleccionarse cualquier valor apropiado comprendido en el intervalo, en caso apropiado, como el valor superior, el valor inferior o el extremo del intervalo. Por ejemplo, un intervalo de entre 0,1 y 1,0 representa los valores terminales de 0,1 y 1,0, así como los valores intermedios de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y todos los intervalos intermedios comprendidos dentro del intervalo de entre 0,1 y 1,0, tales como 0,2 a 0,5, 0,2 a 0,8, 0,7 a 1,0, etc.

Tal como se utiliza en toda la presente memoria, la forma singular de un término incluye el plural, y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, las referencias "un" o "una" y "el" o "la" son generalmente inclusivas de los plurales de los términos respectivos. Por ejemplo, la referencia a "un procedimiento" o "un alimento" incluye una pluralidad de dichos "procedimientos" o "alimentos". De manera similar, los términos "comprende" o "comprenden" y "que comprende" deben interpretarse inclusivamente. De manera similar, los términos "incluye" o "que incluye" y "o" deben interpretarse todos ellos como inclusivos. Sin embargo, debe considerarse que la totalidad de dichos términos comprende formas de realización limitativas a las que también puede hacerse referencia utilizando expresiones tales como "consiste en".

Los procedimientos y composiciones y otras formas de realización ejemplificadas en la presente memoria no se encuentran limitadas a las metodologías, protocolos y reactivos particulares que se indican en la presente memoria debido a que, tal como apreciará el experto en la materia, pueden variar.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos, términos artísticos y acrónimos utilizados en la presente memoria presentan los significados entendidos comúnmente por el experto en el campo o campos de la invención, o en el campo o campos en los que se utiliza el término. Aunque pueden utilizarse cualesquiera composiciones, métodos, artículos fabricados u otros medios o materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria en la práctica de la presente invención, se indican en la presente memoria las composiciones, métodos y artículos fabricados, u otros medios o materiales preferidos.

El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria haciendo referencia a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal y similar, pretende comprender variaciones de  $\pm 20\%$ , más preferentemente de  $\pm 10\%$ , todavía más preferentemente de  $\pm 5\%$  respecto al valor especificado, ya que dichas variaciones resultan apropiadas para reproducir los procedimientos y productos dados a conocer.

Las expresiones "acuicultura", "piscicultura", "cultivo de peces" y "cría de peces" son sinónimos y en la presente memoria se utilizan según su significado equivalente habitual. Los peces generalmente se crían en "corrales", "estanques", "tanques" o "jaulas" de diferentes tamaños, volúmenes y capacidades, dependiendo de la especie de pez que debe criarse, la situación de la piscifactoría, los medios económicos del piscicultor, etc.

El término "corral" se utiliza posteriormente para hacer referencia a cualquiera de entre corral, estanque, tanque y jaula.

En el contexto de la presente invención, el término "peces" se refiere a cualquier especie de pez que puede criarse para los fines de suministrar peces comestibles a la población (seres humanos y animales, en particular animales de compañía).

Existen 3 "grupos de peces" diferentes que se definen a partir de los requisitos nutricionales y hábitos de alimentación de los peces: el grupo de los peces carnívoros, el grupo de los peces omnívoros y el grupo de los peces herbívoros.

En particular, los peces según la invención son peces carnívoros o peces omnívoros, más particularmente peces carnívoros.

A título de ejemplos de especies de peces carnívoros, pueden citarse el salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*), el salmón rojo (*Oncorhynchus keta*), el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), el salmón masu (*Oncorhynchus masou*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón del Pacífico (*Oncorhynchus nerka*), el salmón común (*Salmo salar*), la trucha de mar (*Salmo trutta*), la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la trucha de lago (*Salvelinus namaycush*), la anguila japonesa (*Anguilla japonica*), la anguila americana (*Anguilla rostrata*), la anguila europea (*Anguilla anguilla*), la perca americana (*Micropterus salmoides*), el pez limón (*Seriola dumerili*), "buri" (*Seriola quinqueradiata*), el jurel japonés (*Trachurus japonicus*), el besugo negro (*Acanthopagrus schlegelii*), el sargo (*Diplodus sargus*), la dorada japonesa (*Evynnis japonica*), la dorada del Japón (*Pagrus major*), el bocinero (*Pagrus pagrus*), el sargo dorado (*Rhabdosargus sarba*), la dorada (*Sparus aurata*), la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), el atún de aleta azul del sur (*Thunnus maccoyii*), el atún de aleta azul del norte (*Thunnus thynnus*), la perca trepadora (*Anabas testudineus*), el rodaballo (*Psetta maxima*), el falso hálibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), el lenguado común (*Solea vulgaris*), el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), el fletán (*Hippoglossus hippoglossus*), la lubina rayada (*Morone saxatilis*), el barramundi (*Lates calcarifer*), la perca del Nilo (*Lates niloticus*), el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el mero (*Epinephelus* sp.), el mero moteado del coral (*Plectropomus maculatus*), la perca de río (*Perca fluviatilis*), la perca regia (*Argyrosomus regius*) y la cobia

(*Rachycentron canadum*).

A título de ejemplos de especies de peces omnívoros, pueden citarse las especies de barbo (*Puntius* spp.), la carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*), la carpa de fango (*Cirrhinus molitorella*), la perca trepadora (*Anabas testudineus*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), el carpín (*Carassius carassius*), la pirapatinga (*Piaractus brachypomus*), el barbo plateado (*Barbonymus gonionotus*), la carpa Mrigale (*Cirrhinus mrigala*), el pacu (*Piaractus mesopotamicus*), especies de Tilapia [*Oreochromis* spp. (niloticus y mossambicus e híbridos), *Sarotherodon* spp., *Tilapia* spp.], catfish species [*Clarias* spp. (*gariepinus*, *macrocephalus*, híbridos), *Pangasius* spp. (*Pangasius hypophthalmus*, *Pangasius pangasius*), el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), el bagre común japonés (*Silurus asotus*), el siluro chino de hocico largo (*Leiocassis longirostris*) y el bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*]).

A título de ejemplos de especies de peces herbívoros, pueden citarse la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpa catla (*Catla catla*), el labeo rojo (*Labeo rohita*), el chano (*Chanos chanos*), el pardete (*Mugil cephalus*), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), carpa de Wuchang (*Megalobrama amblycephala*), el gurami grande (*Osphronemus goramy*), el gurami piel de serpiente (*Trichigaster pectoralis*), algunas especies de Tilapia (*Tilapia rendalli* y *Tilapia zillii*), el gurami gigante (*Osphronemus goramy*) y la carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis* (filtrador)).

El término "alimento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un producto o composición que está destinado a la ingestión por peces y que proporciona por lo menos un nutriente a los peces. La composición del alimento depende del grupo de peces que se alimentarán con dicho alimento. Un alimento para peces carnívoros es diferente de un alimento para peces omnívoros y de un alimento para peces herbívoros, siendo estos dos últimos alimentos, diferentes entre sí. Típicamente, los peces, especialmente los carnívoros, requieren proteínas, grasas, minerales y vitaminas para crecer y mantener un buen estado de salud. El término "alimento" según la presente invención excluye "cebos" que sólo se utilizan para atraer peces.

Originalmente, en la piscicultura de peces carnívoros, se utilizaban peces enteros o pescado molido para cubrir los requisitos nutricionales de los peces en cría. El pescado molido mezclado con materias primas secas de diverso tipo, tales como harinas de pescado y almidón, se denominaba "alimento blando". Gradualmente, la piscicultura se ha industrializado y el alimento blando ha sido sustituido por alimento seco del tipo alimento comprimido. El alimento comprimido ha sido sustituido gradualmente por alimento seco del tipo extrudido. Actualmente el alimento extrudido es prácticamente universal en la piscicultura de un gran número de especies de peces, tales como varias especies de salmónidos, bacalao, corvina y dorada.

En su sentido original y más amplio, el término "extrusión" se refiere a la creación de un objeto que presenta un perfil fijo en sección transversal. Lo anterior se lleva a cabo tirando o forzando un material conformable a través de la abertura de una matriz que presenta la sección transversal deseada. En las industrias alimentaria y de piensos, especialmente en la industria de la alimentación piscícola, el término "extrusión" se utiliza comúnmente en un sentido más estrecho. En estas industrias, se utilizan extrusores de tipo un solo husillo o de doble husillo. El material extrudido es una mezcla de materias primas proteicas, materias primas que contienen almidón, grasas y agua. El agua puede añadirse a la mezcla en forma de agua o vapor. Además, la mezcla puede comprender minerales y vitaminas y posiblemente pigmento. La mezcla puede precalentarse en un precondicionador, en donde el calentamiento tiene lugar mediante la adición de vapor a la mezcla. También puede añadirse vapor y agua a la sustancia en el interior del extrusor. En el extrusor mismo, la sustancia de tipo masa se fuerza mediante los husillos hacia una constricción en el extremo de salida del extrusor y seguidamente a través de una placa de matriz en donde la sustancia adopta la forma en sección transversal que se desea. En el exterior de la placa de matriz normalmente se encuentra una cuchilla giratoria que corta la hebra que sale de los orificios de la matriz a la longitud deseada. Normalmente, la presión en el exterior de la placa de la matriz será igual a la presión circundante. El producto extrusionado generalmente se denomina "extrudido". Debido a la presión creada en el interior del extrusor y la adición de vapor a la sustancia, la temperatura puede ser superior a aproximadamente 100°C y la presión puede ser superior a la presión atmosférica en la sustancia antes de ser forzada a través de las aberturas de la matriz. Este procedimiento de extrusión también se denomina "cocción por extrusión". De esta manera, el término "extrusión" se refiere en la presente memoria a la cocción por extrusión mediante un extrusor de un solo husillo o un extrusor de doble husillo. La expresión "alimento extrudido" se refiere al alimento producido mediante cocción por extrusión mediante un extrusor de un solo husillo o un extrusor de doble husillo. El alimento piscícola extrudido típicamente se presenta en forma de gránulos. La mayor parte, si no la totalidad, del "alimento extrudido" disponible actualmente contiene menos de aproximadamente 10% de agua y presenta un recubrimiento de aceite.

La expresión "alimento comprimido" se refiere a un alimento producido mediante una prensa alimentaria. Este procedimiento difiere de la extrusión de varias maneras. Se utiliza menos agua y vapor durante el procedimiento. Se fuerza el paso de la mezcla de alimento por el anillo de la matriz desde el interior hacia el exterior mediante la utilización de rodillos que giran en el interior del anillo de la matriz. La temperatura y la presión son más bajas que en la extrusión y el producto no es poroso. El procedimiento implica que el almidón no es tan digerible como después de la extrusión. Un "alimento comprimido" normalmente contiene menos de aproximadamente 10% de agua tras el prensado y cualquier recubrimiento con aceite. No resulta necesario secar un alimento comprimido. El alimento se enfría antes del envasado opcional.

La expresión "alimento piscícola formulado" se refiere a un alimento compuesto de una o más fuentes de proteína, tales como, aunque sin limitación, proteínas marinas, incluyendo, entre otros, harina de pescado y harina de krill, proteínas vegetales (por ejemplo harina de soja, harina de colza, gluten de trigo, gluten de maíz, harina de altramuz, 5 harina de guisante, harina de semillas de girasol y harina de arroz) y residuos de matadero, tales como harina de sangre, harina de huesos, harina de plumas y harina de aves. Mediante la mezcla de diferentes fuentes de proteínas, cada una con su propio perfil de aminoácidos, resulta posible dentro de determinados límites alcanzar un perfil de aminoácidos deseado en el alimento adaptado al grupo de peces, y incluso a la especie de pez para la que está destinado el alimento.

Un "alimento formulado" contiene además grasas, tales como aceite de pescado y/o aceites de origen vegetal (por ejemplo aceite de colza y aceite de soja) y/o grasas de origen terrestre (en particular grasa de ave) como fuentes de energía. Un alimento formulado contiene además un ligante, habitualmente en forma de una materia prima que contiene almidón, tal como trigo o harina de trigo, harina de patata, arroz, harina de arroz, harina de guisante, judías 15 o harina de tapioca, para proporcionar al alimento la resistencia y estabilidad de forma deseadas.

Un "alimento formulado" típico contiene además minerales y vitaminas que procuren un buen crecimiento y buena salud de los peces. El alimento puede contener además aditivos adicionales, tales como pigmentos.

De esta manera, un "alimento piscícola formulado" es un alimento compuesto en el que las cantidades relativas de proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y cualesquiera otros aditivos se calculan para que estén adaptados óptimamente a las necesidades nutricionales del grupo de peces y de la especie de pez basándose en la edad de los peces, el procedimiento de cría y las condiciones ambientales. Es común que la alimentación se lleve a cabo con únicamente un tipo de alimento en cada ocasión y de manera que cada trozo de alimento sea 25 nutricionalmente adecuado. De esta manera, un "alimento piscícola formulado" presenta una composición aproximadamente de 25% a 60% en peso de proteínas, 5% a 40% en peso de lípidos y 3% a 15% en peso de humedad.

La expresión "alimento formulado seco" se refiere a un alimento del tipo comprimido o extrudido.

En la presente memoria tanto un "alimento piscícola formulado" como un "alimento piscícola formulado seco" pueden denominarse "alimento piscícola" o, más simplemente, como un "alimento". Evidentemente el significado de estas expresiones resultará evidente para el lector a la luz del contexto.

El término "gránulo" utilizado en la presente memoria se refiere a pedazos o trozos constituidos de partículas formados mediante un procedimiento de compresión o extrusión. Los trozos pueden variar en tamaño y/o forma, dependiendo del procedimiento o de los equipos. La mayoría de gránulos de alimento piscícola presentan una forma cilíndrica. Debido a que los peces se crían utilizando un producto alimentario piscícola, desde alevines (con un peso de aproximadamente 1 g) hasta peces grandes con un peso de varios kilogramos (por ejemplo 4 a 5 kg), se requieren y se utilizan diversos tamaños de gránulo para la alimentación en diferentes etapas del crecimiento de los peces. De esta manera, durante un ciclo de cría de los peces, se utilizan gránulos de tamaño creciente a medida que crecen los peces. Por ejemplo, en la cría del salmón, típicamente se requieren 6 o 7 tamaños de gránulo diferentes al utilizar los alimentos piscícolas existentes. Además, en la cría de la corvina, comúnmente se utilizan gránulos de 5 tamaños diferentes para satisfacer el crecimiento de los peces. El tamaño del gránulo que debe utilizarse está determinado por el tamaño de los peces según la práctica anterior.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "gránulos de alimento" cumple ambas definiciones de "alimento" y "gránulo" anteriormente indicadas. De esta manera, la expresión "gránulos de alimento" se refiere no sólo a la composición y formulación del alimento sino también a la estructura física, forma, tamaño y densidad de los gránulos.

El término "palatabilidad" se refiere a una preferencia de unos peces por un alimento frente a otro. La palatabilidad se refiere a la disposición global de unos peces a comer un determinado alimento. Ventajosamente, aunque no necesariamente, la palatabilidad se refiere además a la capacidad del alimento ingerido de satisfacer a los peces. En el caso de que unos peces muestren una preferencia, por ejemplo para uno de los dos o más alimentos, el alimento preferente presenta "mejor palatabilidad" y presenta una "palatabilidad incrementada". La palatabilidad de un alimento en comparación con otro u otros alimentos puede determinarse, por ejemplo, sometiendo a ensayo el consumo de los alimentos por parte de los peces. Dicha preferencia puede resultar de cualquiera de los sentidos de los peces, aunque típicamente se relaciona, entre otros, con el gusto, el olor, el aroma, el sabor, la textura y/o la sensación en boca.

Un alimento piscícola tal como se indica en la presente memoria presenta una "palatabilidad incrementada" en el caso de que unos peces muestren preferencia frente a una composición de alimento de control.

Las expresiones "mejoradores de palatabilidad" (PP), "saborizantes", "aromas", "agentes de palatabilidad", "factores saborizantes", "composiciones saborizantes", "composiciones mejoradoras de la palatabilidad" (CPP), "mejoradores

del sabor", "atraymentes" (excluyendo los cebos) y cualesquiera otros términos similares se refieren a cualquier material que mejore la palatabilidad de una composición de alimento para unos peces. Un MP puede ser un único material o una mezcla de materiales, y puede ser natural, procesado o no procesado, sintético o parte de materiales naturales y parte de materiales sintéticos. Típicamente, un MP útil en un alimento piscícola es una composición comestible que proporciona un gusto, olor, aroma, sabor, textura, sensación en boca y/o sensación organoléptica que resulta atractiva o agradable para los peces.

Son ejemplos de MP disponibles comercialmente que resultan útiles en los alimentos piscícolas, la línea de productos ACTIPAL™ (Aquativ, SPF, Francia).

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "ingrediente de composición mejoradora de la palatabilidad" es cualquier compuesto, composición o material que resulta adecuado para el consumo de los peces. Son ejemplos no limitativos de ingredientes de composición mejoradora de la palatabilidad, hidrolizados de proteínas (incluyendo harinas y/o hidrolizados animales, harinas y/o hidrolizados de pescado, harinas y/o hidrolizados de krill, harinas y/o hidrolizados de crustáceos, harinas y/o hidrolizados de moluscos (incluyendo larvas), harinas y/o hidrolizados de plumas, levaduras y/o hidrolizados y/o extractos, hidrolizados vegetales, harinas y/o hidrolizados y/o extractos de algas), compuestos de nitrógeno [por ejemplo proteínas, hidrolizados de proteínas, péptidos y aminoácidos (en particular, aminoácidos libres), derivados de aminoácidos (betaína, taurina)], nucleósidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos o grasas, ácidos orgánicos y similares. También se encuentran comprendidos en la expresión "ingrediente de composición mejoradora de la palatabilidad" cualquier ingrediente comestible funcional activo o bioactivo que no puede extrudirse y, de esta manera, debe añadirse mediante recubrimiento (por ejemplo vitaminas, enzimas, pigmentos, aromas, hormonas, etc.).

Pueden obtenerse hidrolizados de proteínas mediante técnicas convencionales, directa o indirectamente (a partir de extractos de proteínas que pueden pretratarse o no), a partir de materias primas que puede ser la totalidad o una parte de uno o más de entre animales, plantas, algas y microorganismos, y que pueden haberse congelado o no. Por ejemplo, puede conseguirse la hidrólisis de las proteínas mediante uno o más de entre medios físicos (por ejemplo calor y/o cizalla), medios químicos (utilizando ácidos o bases), medios enzimáticos (utilizando enzimas endógenos, particularmente proteasas, obteniendo de esta manera autolisados o ensilados, y/o enzimas exógenos, particularmente proteasas).

El término "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. En algunas formas de realización, los aminoácidos son  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - o  $\delta$ -aminoácidos, incluyendo los estereoisómeros y racematos de los mismos.

El término "péptido" se refiere en la presente memoria a una cadena corta de aminoácidos. La expresión "cadena corta de aminoácidos" típicamente se refiere a una cadena que presenta entre 2 y aproximadamente 6 aminoácidos. En particular, un "péptido" en el presente contexto presenta un peso molecular (PM) igual o inferior a aproximadamente 1.000 Da.

En el contexto de la presente invención, la expresión "aminoácidos libres" se refiere a aminoácidos en forma no peptídica (es decir, que no forman parte de una molécula que comprende dos o más residuos aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "aminoácidos naturales" se refiere a aminoácidos observados *in vivo* y que son producidos por como mínimo un organismo natural, aunque también pueden ser producidos por diversos medios químicos y/o bioquímicos. Los aminoácidos naturales comparten una estereoquímica común, siendo todos L-aminoácidos. A título de ejemplos de aminoácidos naturales pueden citarse histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, ácido glutámico, glutamina, glicina, ornitina, prolina, selenocisteína, serina y tirosina.

La expresión "aminoácidos no naturales" se refiere a aminoácidos que no son producidos *in vivo*.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "azúcares reductores" se refiere a cualquier monosacárido o disacárido que presenta un grupo aldehído o un grupo cetona o que es capaz de formar uno en solución mediante isomerismo. El grupo funcional permite que el azúcar actúe como agente reductor, por ejemplo en la prueba de Tollens o en la prueba de Benedict, o en la reacción de Maillard. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen ribosa, xilosa, arabinosa, manosa, glucosa, fructosa, ramnosa, lactosa, maltosa, fucosa, galactosa y similares.

Debido a que resulta difícil, o incluso imposible, determinar la composición exacta de los hidrolizados de proteínas, los fabricantes utilizan bastante comúnmente información indirecta, tal como el perfil de PM (utilizando métodos que típicamente se basan en la cromatografía de exclusión por tamaño) y/o el grado de hidrólisis (GH) de los enlaces peptídicos de las proteínas. El GH está representado por: (i) la proporción de nitrógeno de amino respecto al nitrógeno total (proporción NA/NT) en el hidrolizado resultante, (ii) la presencia de aminos en el hidrolizado, e (iii) la osmolaridad del hidrolizado. Pueden utilizarse muchos métodos convencionales para determinar el GH. Estos

métodos pueden ser absolutos (por ejemplo los métodos OPA y TNBS) o estimativos (por ejemplo el procedimiento de TCA) o relativos (por ejemplo el procedimiento de "pH stat"). Más exactamente, los procedimientos utilizados en las industrias alimentarias y de los piensos, y más concretamente en la industria de los alimentos piscícolas, para cuantificar el GH típicamente se basan en uno de los principios siguientes: (1) determinación de nitrógeno soluble en presencia de un agente precipitante, tal como ácido tricloroacético (TCA), o (2) determinación de los grupos alfa-amino mediante procedimientos colorimétricos (por ejemplo la titulación con ácido trinitrobencenosulfónico, TNBS), o la titulación del pH de los protones liberados ("pH stat"). El GH puede determinarse ventajosamente mediante un procedimiento basado en OPA (o-ftaldialdehído), tal como se indica en Nielsen (2001). Alternativamente, el nitrógeno soluble en TCA puede determinarse mediante el ensayo de Kjeldhal (A.O.A.C. 1995) o la reacción de Biuret (Hung et al., 1984). Dichos procedimientos se describen en detalle en Silvestre (1997).

Un "nucleósido" es un compuesto que contiene una base purina o pirimidina unida a un azúcar (habitualmente ribosa o desoxirribosa), tal como adenosina, inosina, uridina, guanosina, citidina, ribotimidina, desoxiadenosina, desoxiinosina, desoxitimidina, desoxiuridina, desoxiguanosina, desoxicitidina y similares.

Un "nucleótido" es cualquier compuesto que consiste de un nucleósido combinado con un grupo fosfato, tal como adenosín-monofosfato, monofosfato de inosina, timidín-monofosfato, uridín-monofosfato, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina, adenosín-difosfato, inosín-difosfato, timidín-difosfato, uridín-difosfato, difosfato de guanosina, citidín-difosfato, adenosín-trifosfato, inosín-trifosfato, timidín-trifosfato, uridín-trifosfato, trifosfato de guanosina, citidín-trifosfato, desoxiadenosina-monofosfato, desoxiinosín-monofosfato, desoxitimidín-monofosfato, desoxiuridín-monofosfato, monofosfato de desoxiguanosina, desoxicitidín-monofosfato, desoxiadenosín-difosfato, desoxiinosín-difosfato, desoxitimidín-difosfato, desoxiuridín-difosfato, difosfato de desoxiguanosina, desoxicitidín-difosfato, desoxiadenosín-trifosfato, desoxiinosín-trifosfato, desoxitimidín-trifosfato, desoxiuridín-trifosfato, trifosfato de desoxiguanosina, desoxicitidín-trifosfato y similares.

Entre los ejemplos de lípidos se incluyen el sebo, los aceites, las grasas de cualquier origen, tales como los aceites animales, vegetales (incluyendo de verduras), lácteos o marinos, siendo la totalidad de ellos denominados intercambiablemente "lípidos", "grasas" o "aceites". Los aceites vegetales que se encuentran disponibles en grandes cantidades típicamente son el aceite de canola, el aceite de soja, el aceite de maíz, el aceite de oliva, el aceite de girasol, el aceite de colza, el aceite de linaza, aceite de palma, aceite de cártamo y similares, así como productos secundarios de los mismos. Las grasas animales típicos son el sebo, la manteca, la grasa de ave, la grasa de vaca y similares, así como los productos secundarios de los mismos. Los aceites marinos típicamente son aceite de atún, aceite de sardina, aceite de salmón, aceite de anchoa, aceite de otros peces pelágicos, y similares, así como productos secundarios de los mismos. También se encuentran comprendidos en la presente memoria las grasas que se derivan de fuentes animales, vegetales o marinas, o que son producidos por peces, animales y plantas. Preferentemente, el alimento piscícola contiene aceites marinos.

Tal como reflejan las definiciones proporcionadas anteriormente, entre los ingredientes de la composición mejoradora de la palatabilidad se incluyen más particularmente "nutrientes" o "macronutrientes", y "micronutrientes".

Son ejemplos de "nutrientes" o "macronutrientes", aunque sin limitación, materias primas de origen en pescado, plantas y terrestres, compuestos del nitrógeno (por ejemplo proteínas, péptidos, aminoácidos, especialmente aminoácidos libres y derivados de aminoácidos), carbohidratos, grasas y similares.

Entre los ejemplos de "micronutrientes" se incluyen, aunque sin limitación, vitaminas, minerales y oligoelementos, tales como las vitaminas A, C, E, B12, D3, ácido fólico, D-biotina, cianocobalamina, niacinamida, tiamina, riboflavina, piridoxina, menadiona, beta-caroteno, pantotenato de calcio, colina, inositol, calcio, fósforo, potasio, sodio, cinc, hierro, manganeso, cobre, yodo y similares.

En la presente memoria, el término "nutrientes" puede utilizarse para referirse a nutrientes o a micronutrientes, o a ambos. Evidentemente el significado exacto de este término se pondrá de manifiesto para el experto en la materia a partir del contexto.

Los "conservantes" se utilizan en particular para garantizar una larga vida útil del alimento, en particular del alimento piscícola. Los conservantes comprenden antioxidantes naturales o sintéticos (tales como etoxiquina, BHA, BHT, galato de propilo, galato de octilo, tocoferoles, extractos de romero y similares), quelantes (por ejemplo el ácido cítrico), así como el ácido sórbico o las sales sórbicas (por ejemplo el sorbato de potasio) y otros ácidos como el ácido fosfórico y similares.

Un "pigmento" se refiere en la presente memoria a cualquier sustancia de origen natural o cualquier color sintético que resulte adecuado (preferentemente autorizado o certificado) para la utilización como alimento piscícola. Los pigmentos resultan útiles para, entre otros, proporcionar un color atractivo a un alimento piscícola y/o para proporcionar un color atractivo a los peces destinados a consumo por parte animales y/o seres humanos. Son ejemplos de pigmentos utilizados comúnmente en acuicultura, los carotenoides (tales como la cantaxantina, la astaxantina, etc.) y similares.

Una "reacción térmica" es, según la presente invención, una reacción obtenida mediante la combinación a una temperatura elevada, de por lo menos un carbohidrato, preferentemente un azúcar reductor, y por lo menos un compuesto de nitrógeno. Dicha reacción de hecho puede incluir diversas reacciones concomitantes y/o sucesivas, incluyendo, por ejemplo, una o más reacciones de Maillard.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "reacción de Maillard" se refiere a una reacción de calentamiento que se produce entre los ingredientes, incluyendo una fuente de nitrógeno, preferentemente nitrógeno de amino, y una fuente de carbohidrato, preferentemente un azúcar reductor, siendo dicha reacción una de las rutas más importantes para saborizar compuestos en los alimentos cocinados. Dicha reacción es completa y proporciona un gran número de compuestos que contribuyen al sabor.

La expresión "producto de reacción de Maillard" se refiere en la presente memoria a cualquier compuesto producido mediante una reacción de Maillard. En particular, un producto de reacción de Maillard es un compuesto que proporciona sabor y/o color y/o olor y/o gusto y/o regusto.

En el contexto de la presente invención, al experto en la materia le resultarán familiares los "parámetros zootécnicos", entre los que se incluyen la tasa de supervivencia, el alimento ingerido o el alimento consumido (Ac), la tasa de crecimiento específico (TCE) y la proporción de conversión de alimento (PCA). Estos parámetros se utilizan comúnmente en acuicultura para evaluar, por ejemplo, cómo/qué comen o prefieren comer los peces, cómo crecen, cómo utilizan los alimentos ingeridos, etc. Se determinan utilizando mediciones experimentales convencionales y ecuaciones matemáticas que son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, el manual de Guillaume et al., publicado en septiembre de 2001).

El parámetro de "tasa de supervivencia" puede definirse como la proporción entre el número inicial de peces (es decir, el número total de peces inicialmente contenidos en un corral) y el número final de peces (es decir, el número total de peces vivos que se encuentran finalmente contenidos en el corral).

El parámetro de "tasa de crecimiento específico" (TCE) se expresa como el porcentaje de incremento de la biomasa de peces entre un día y el siguiente. La TCE (expresada en, por ejemplo, "%/día") no considera la cantidad de alimento proporcionado para obtener crecimiento. Es una medida únicamente de la tasa de crecimiento. La TCE depende de la digestibilidad del alimento piscícola y de su perfil en términos de proporción de proteínas y grasas, así como de las composiciones de aminoácidos y ácidos grasos.

El parámetro de "consumo de alimento" o "ingesta de alimento" (Ca) se define como el peso de alimento realmente consumido por los peces en el corral durante un periodo dado de tiempo. El Ca puede calcularse utilizando la Ecuación (1):

$$Ac = As - An$$

en la que As es el peso seco del alimento total que se distribuye en exceso en el corral durante dicho periodo de tiempo, y An es el peso seco del alimento total no consumido que se recupera diariamente del corral durante dicho periodo de tiempo.

Ac puede expresarse en g de alimento / kg de biomasa media de peces / día.

El parámetro de "proporción de conversión de alimento" (PCA) es un parámetro económico que indica el grado de eficiencia con el que crecen los peces con el alimento. El crecimiento de los peces de hecho corresponde a la deposición de proteínas, grasas y agua en el músculo. De esta manera, la PCA refleja la "utilización del alimento" por los peces o la "eficiencia de alimentación". La PCA varía entre especies de peces y también con el tamaño de los peces. A título de ejemplo, en el salmón atlántico, la PCA típicamente puede ser de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 2. Los alimentos piscícolas industriales en forma de alimento comprimido y alimento extrudido contienen cantidades pequeñas de agua, típicamente de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%. El cuerpo de los peces presenta un contenido de agua más alto. Por ello la PCA de diferentes alimentos en teoría debería considerar el contenido de agua de los alimentos ya que el agua no contribuye al crecimiento. Más exactamente, la PCA en teoría debería calcularse en peso seco. Sin embargo, debido a que el contenido de agua se encuentra comprendido dentro de un intervalo estrecho y resulta engorroso para el piscicultor calcular la PCA en peso seco, la PCA habitualmente se calcula sobre la base de alimento que incluye el contenido de agua.

Debe apreciarse que la determinación de los parámetros zootécnicos es importante en acuicultura, como mínimo por los motivos siguientes. Típicamente existen numerosos peces individuales en un corral o estanque (por ejemplo 10.000 a 30.000 individuos), de manera que la alimentación no puede observarse al nivel de individuo. Además, algo de alimento comúnmente se pierde porque los gránulos de alimento se fragmentan en el sistema de alimentación y los fragmentos son excesivamente pequeños para ser ingeridos o son tan pequeños que son reconocidos como polvo. Además, algunos gránulos de alimento no resultan ingeridos por los peces sino que sólo sedimentan por la columna de agua. Además, se pierde algo de alimento porque los peces son alimentados hasta saciarlos, mientras que la alimentación continúa (lo que se conoce como "sobrealimentación" o alimentación "en exceso").

Alternativamente, puede producirse la infraalimentación, en cuyo caso la PCA se incrementa debido a que se utiliza con fines metabólicos una proporción más elevada de nutrientes del alimento (materias primas basadas en pescado, vegetales o de origen terrestre, compuestos del nitrógeno, grasas, carbohidratos y similares) en lugar de utilizarse para la deposición de músculo.

5 A menos que se indique lo contrario, los pesos en la presente memoria se expresan en gramos.

10 El término "recubrimiento" o "recubrimiento con una capa externa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la deposición tópica de una composición mejoradora de la palatabilidad sobre la superficie de un alimento piscícola, tal como mediante pulverización, espolvoreado y similares.

15 El término "inclusión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la adición de una composición mejoradora de la palatabilidad internamente en una preparación de alimento piscícola, mediante la mezcla de la misma con la preparación de alimento piscícola, antes de las etapas adicionales de procesamiento para obtener el alimento piscícola final.

20 En referencia a un kit, la expresión "paquete individual" se refiere a que los componentes de dicho kit se encuentran físicamente asociados dentro o con uno o más recipientes y se consideran como una unidad para la preparación, distribución, comercialización o utilización. Entre los recipientes se incluyen, aunque sin limitación, bolsas, cajas, botellas, sacos, paquetes de cualquier tipo o diseño o material, recubrimiento, retractilado, grapado o componentes fijados de otro modo, o combinaciones de los mismos. Un paquete individual pueden ser recipientes de componentes individuales asociados físicamente de manera que se considera que forman una unidad para la fabricación, distribución, comercialización o utilización.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, los "medios para comunicar información o instrucciones" son un componente de un kit para cualquier forma adecuada para proporcionar información, instrucciones, recomendaciones y/o garantías, etc. Dichos medios pueden comprender un documento, medios de almacenamiento digital, medios de almacenamiento óptico, presentación de audio e información que contiene representaciones visuales. Los medios de comunicación pueden ser un sitio de internet visualizado, un folleto, una etiqueta de producto, un impreso insertado en el paquete, un anuncio, una representación visual, etc.

### Descripción de algunas formas de realización de la invención

35 Los resultados experimentales obtenidos por los inventores y de los que informa en los Ejemplos, a continuación, demuestran que resulta posible utilizar nucleótidos como refuerzos o estimulantes de las propiedades de mejora de la palatabilidad de los hidrolizados de proteínas en los gránulos de alimento para peces carnívoros. Estos resultados muestran adicionalmente que dicho efecto de refuerzo o estimulante de los nucleótidos es más alto en el caso de que los hidrolizados de proteínas presenten un grado específico de hidrólisis.

40 De esta manera, los nucleótidos permiten mejorar las propiedades de mejora de la palatabilidad de los hidrolizados de proteínas en los gránulos de alimento para peces carnívoros. De hecho, los nucleótidos por sí solos no son mejoradores de la palatabilidad tan eficientes como los hidrolizados de proteínas por sí solos. Sin embargo, en combinación con los hidrolizados de proteínas, los nucleótidos permiten incrementar o mejorar o mejorar significativa y eficientemente la palatabilidad de los gránulos de alimento para peces carnívoros.

45 De esta manera, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar gránulos de alimento para peces carnívoros que presentan una palatabilidad mejorada, que comprende:

- 50 a) proporcionar una composición mejoradora de la palatabilidad (CPP), que comprende:
- un hidrolizados de proteínas que presenta un grado de hidrólisis (GH) de entre 14,5% y 100%, en combinación con:
  - uno o más nucleótidos, y
  - opcionalmente, en presencia de uno o más ingredientes adicionales de la composición mejoradora de la palatabilidad,
- 60 b) añadir dicha CMP a gránulos de alimento para peces carnívoros, y
- c) recuperar dichos gránulos de alimento para peces carnívoros con una palatabilidad mejorada.

65 Dicho hidrolizado de proteínas contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, particularmente 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

Preferentemente, todos los valores de GH dados a conocer en la presente memoria se determinaron utilizando un procedimiento absoluto, más preferentemente el procedimiento OPA indicado en las Definiciones, anteriormente, y nuevamente referenciado en los Ejemplos, posteriormente.

Preferentemente, dicha CMP preferentemente presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

Preferentemente, el valor o valores de GH del hidrolizado de proteínas y/o de la CMP son de entre aproximadamente 20% y 100%, más preferentemente de entre aproximadamente 30% y 100%, y todavía más preferentemente de entre aproximadamente 40% y 100%. El valor de GH del hidrolizado de proteínas puede ser igual o diferente del de la CMP resultante, aunque ambos valores de GH se encuentran comprendidos dentro de los intervalos indicados anteriormente.

Preferentemente, el hidrolizado de proteínas se encuentra presente en una cantidad de entre 14,5% y 100% en peso de dicha CPP. Aunque preferentemente dicha cantidad de hidrolizado de proteínas es de entre aproximadamente 20% y 100%, todavía más preferentemente de entre aproximadamente 30% y 100%, y todavía más preferentemente de entre aproximadamente 40% y 100%, en peso de dicha CPP.

Los hidrolizados de proteínas pueden obtenerse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, la hidrólisis de proteínas puede llevarse a cabo mediante uno o más medios físicos (por ejemplo calor y/o cizalla), medios químicos (utilizando ácidos o bases), medios enzimáticos (utilizando enzimas endógenas, obteniendo de esta manera autolisados o ensilados y/o enzimas exógenas).

En particular, dicho hidrolizado de proteínas presentan una digestibilidad in vitro, determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

Dicho nucleótido o nucleótidos preferentemente se encuentran presentes en una cantidad de entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25% en peso de la composición mejoradora de la palatabilidad (CPP). El límite inferior de dicho intervalo de cantidades de nucleótidos preferentemente es de aproximadamente 0,5% en peso, todavía más preferentemente de aproximadamente 1% en peso de la CPP. El límite superior de dicho intervalo de cantidades de nucleótidos preferentemente es de aproximadamente 20% en peso, más preferentemente de aproximadamente 15% en peso, todavía más preferentemente de aproximadamente 10% en peso, y todavía más preferentemente de aproximadamente 5% en peso de la CPP. Por ejemplo, la cantidad de nucleótidos puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1% en peso de la CPP. Preferentemente se encuentra comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% en peso de la CPP.

En el contexto de la presente invención se seleccionan nucleótidos de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos. En particular, los nucleótidos según la invención no comprenden monofosfato de adenosina (AMP) y monofosfato de uridina (UMP).

En particular, en el caso de que se encuentre presente IMP entre el nucleótido o nucleótidos que se utilizan en combinación con el hidrolizado de proteínas, se encuentra presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25% en peso en dicha CPP. El límite inferior de dicho intervalo de cantidades de IMP preferentemente es de aproximadamente 0,5% en peso, más preferentemente de aproximadamente 1% en peso. El límite superior de dicho intervalo de cantidades de IMP preferentemente es de aproximadamente 20% en peso, más preferentemente de aproximadamente 15% en peso, todavía más preferentemente de aproximadamente 10% en peso y todavía más preferentemente de aproximadamente 5% en peso. Por ejemplo, la cantidad de IMP puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1% en peso. Preferentemente se encuentra comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% en peso.

Más en particular, en el caso de que se encuentre presente GMP entre el nucleótido o nucleótidos que se utilizan en combinación con el hidrolizado de proteínas, se encuentra presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25% en peso en dicha CPP. El límite inferior de dicho intervalo de cantidades de GMP preferentemente es de aproximadamente 0,5% en peso, más preferentemente de aproximadamente 1% en peso. El límite superior de dicho intervalo de cantidades de GMP preferentemente es de aproximadamente 20% en peso, más preferentemente de aproximadamente 15% en peso, todavía más preferentemente de aproximadamente 10% en peso, y todavía más preferentemente de aproximadamente 5% en peso. Por ejemplo, la cantidad de GMP puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1% en peso. Preferentemente, se encuentra comprendida entre aproximadamente 1% y

aproximadamente 5% en peso.

5 Todavía en particular, en el caso de que se encuentre presente CMP entre el nucleótido o nucleótidos que se utilizan en combinación con el hidrolizado de proteínas, se encuentra presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25% en peso en dicha CPP. El límite inferior de dicho intervalo de cantidades de CMP preferentemente es de aproximadamente 0,5% en peso, más preferentemente de aproximadamente 1% en peso. El límite superior de dicho intervalo de cantidades de CMP preferentemente es de aproximadamente 20% en peso, más preferentemente de aproximadamente 15% en peso, todavía más preferentemente de aproximadamente 10% en peso y todavía más preferentemente de aproximadamente 5% en peso. Por ejemplo, la cantidad de CMP puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1% en peso. Preferentemente se encuentra comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% en peso.

15 Todavía en particular, en el caso de que se encuentren presentes GMP e IMP entre el nucleótido o nucleótidos que se utilizan en combinación con el hidrolizado de proteínas, la cantidad total de GMP+IMP se encuentra comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25% en peso en dicha CPP. El límite inferior de dicho intervalo de cantidades preferentemente es de aproximadamente 0,5% en peso, más preferentemente de aproximadamente 1% en peso. El límite superior de dicho intervalo de cantidades preferentemente es de aproximadamente 20% en peso, más preferentemente de aproximadamente 15% en peso, todavía más preferentemente de aproximadamente 10% en peso y todavía más preferentemente de aproximadamente 5% en peso. Por ejemplo, la cantidad de GMP+IMP puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 1% en peso. Preferentemente se encuentra comprendida entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% en peso.

25 En algunas formas de realización, dicho nucleótido o nucleótidos contenidos en la CMP son naturalmente proporcionados con dicho hidrolizado de proteínas. Lo anterior implica que el procedimiento de la presente invención utiliza un hidrolizado de proteínas que es naturalmente rico en nucleótidos. Por ejemplo, dicho hidrolizado de proteínas puede seleccionarse de entre hidrolizados de krill, camarones, calamares, sardinas y atún.

30 En formas de realización alternativas, se añaden dicho nucleótido o nucleótidos a dicho hidrolizado de proteínas.

En particular, dicho procedimiento según la invención no está destinado a producir productos de reacción de Maillard o a la realización de reacciones de Maillard. Es conocido que las reacciones de Maillard reducen la calidad nutricional de los alimentos piscícolas mediante la destrucción de aminoácidos esenciales, reduciendo la digestibilidad, finalmente mediante la producción de componentes antinutricionales y/o tóxicos (Friedman, 1989). Por este motivo, podrían observarse menores ganancias de peso y eficiencia de alimentación, así como alteraciones del metabolismo de las proteínas (Plakas et al., 1985).

40 En particular, dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de azúcares reductores en una cantidad inferior a 5%, particularmente inferior a 3%, inferior a 2%, inferior a 1,5% en peso basado en el peso total de la composición mejoradora de la palatabilidad.

45 En particular, dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de azúcares reductores en la composición mejoradora de palatabilidad en una proporción en peso de azúcares reductores a aminoácidos libres de entre 0,001 y 0,75, particularmente de entre 0,008 y 0,5 y más particularmente de entre 0,01 y 0,25, y todavía más particularmente de entre 0,015 y 0,18.

50 La CMP puede contener ingredientes adicionales de la composición mejoradora de la palatabilidad tal como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, dichos ingredientes se seleccionan de entre derivados de aminoácidos (tales como taurina y betaína), ácidos orgánicos (por ejemplo ácido láctico, ácido málico y ácido fórmico), grasas (incluyendo ácido butírico), aromas, hormonas, etc.

55 Preferentemente, la CMP se aplica a gránulos de alimento para peces carnívoros mediante inclusión o mediante recubrimiento. En particular, en el caso de que se aplique la CMP mediante recubrimiento, los gránulos de alimento para peces carnívoros se recubren con una cantidad de dicha CMP de entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 20% en peso. Resulta interesante que un procedimiento para preparar gránulos de alimento piscícola recubierto que presenta una palatabilidad estandarizada utilizando un coeficiente de mejora (Kp) se describe en la solicitud de patente europea presentada el 8 de noviembre de 2011 con el nº EP11306453.9.

60 Preferentemente, dicha cantidad de CMP es de entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 15% en peso. Más preferentemente, dicha cantidad es de entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 10% en peso. Todavía más preferentemente, dicha cantidad es de entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 5% en peso.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la palatabilidad de los gránulos de alimento para peces carnívoros, que comprende:

a) añadir a dichos gránulos de alimento piscícola una CMP que comprende:

- un hidrolizado de proteínas con un GH de entre 14,5% y 100%, en combinación con:
- uno o más nucleótidos, y
- opcionalmente, en presencia de uno o más ingredientes adicionales de la composición mejoradora de la palatabilidad.

Todos los requisitos, así como todas las formas de realización preferidas, ventajosas o particulares indicadas anteriormente en relación al procedimiento de preparación de gránulos de alimento para peces carnívoros que presentan una palatabilidad mejorada según el primer aspecto de la presente invención se aplican también al segundo aspecto de la invención referente a un procedimiento para mejorar la palatabilidad de los gránulos de alimento para peces carnívoros.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros que contienen un hidrolizado de proteínas, que comprende:

a) añadir uno o más nucleótidos de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos a dichos gránulos de alimento piscícola que contienen dicho hidrolizado de proteínas, en los que dicho hidrolizado de proteínas presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

Dicho hidrolizado de proteínas contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular, dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, particularmente 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

En particular, dicho hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad in vitro, determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

En la presente invención, los nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos se añaden a gránulos de alimento para peces carnívoros que ya contienen un hidrolizado de proteínas.

En particular, los gránulos de alimento para peces carnívoros pueden contener el hidrolizado de proteínas mediante inclusión o mediante recubrimiento. En otras palabras, el hidrolizado de proteínas se incluye en los gránulos de alimento para peces carnívoros o los gránulos se recubren con el hidrolizado de proteínas.

Todavía en particular, los nucleótidos pueden añadirse a los gránulos de alimento para peces carnívoros mediante inclusión o mediante recubrimiento. En otras palabras, los nucleótidos se incluyen en los gránulos de alimento para peces carnívoros o los gránulos se recubren con los nucleótidos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteínas que debe añadirse a los gránulos de alimento para peces carnívoros, que comprende:

a) combinar dicho hidrolizado de proteínas con uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos, en el que dicho hidrolizado de proteínas presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

Dicho hidrolizado de proteínas contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular, dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo

menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, en particular 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

5 En particular, dicho hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad *in vitro*, determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

10 Dicho hidrolizado de proteínas puede combinarse con dichos nucleótidos antes de la adición a gránulos de alimento para peces carnívoros. En este caso, la combinación del hidrolizado de proteínas y de nucleótidos se añade a gránulos de alimento para peces carnívoros mediante inclusión o mediante recubrimiento. De esta manera, el hidrolizado de proteínas y los nucleótidos se añaden a los gránulos de alimento para peces carnívoros concomitantemente.

15 Alternativamente, dicho hidrolizado de proteínas y dichos nucleótidos pueden combinarse in situ mediante la adición secuencial a dichos gránulos de alimento para peces carnívoros. Una "adición secuencial" comprende una adición del hidrolizado de proteínas seguido de la adición de los nucleótidos, o una adición de los nucleótidos seguido de una adición del hidrolizado de proteínas. Puede añadirse cada uno de entre el hidrolizado de proteínas y los nucleótidos a dichos gránulos de alimento para peces carnívoros mediante inclusión o mediante recubrimiento.

20 Ventajosamente, el contenido de tanto hidrolizado de proteínas como nucleótidos de los gránulos obtenidos tras la adición secuencial de dicho hidrolizado de proteínas y dichos nucleótidos es similar al de los gránulos obtenidos al utilizar concomitantemente el hidrolizado de proteínas y los nucleótidos.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para alimentar peces carnívoros, que comprende:

30 a) alimentar peces carnívoros con gránulos de alimento para peces carnívoros, en el que dichos gránulos comprenden un hidrolizado de proteínas en combinación con uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos, en el que dicho hidrolizado de proteínas presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

35 Dicho hidrolizado de proteínas contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular, dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

40 Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, en particular 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

45 En particular, dicho hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad *in vitro*, determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

Se da a conocer en la presente memoria una CMP para la adición a gránulos de alimento piscícola, que comprende:

- 50
- un hidrolizado de proteínas con un GH de entre 14,5% y 100%, en combinación con:
  - uno o más nucleótidos, y
  - opcionalmente, en presencia de uno o más ingredientes adicionales de la composición mejoradora de palatabilidad.
- 55

Todas las características preferidas, ventajosas o particulares indicadas anteriormente en relación al procedimiento de preparación de gránulos de alimento piscícola que presenta una palatabilidad mejorada según el primer aspecto de la presente invención también resultan de aplicación a la CMP dada a conocer en la presente memoria.

60 Dicha CMP puede ser líquida o seca.

Dicha CMP puede añadirse a gránulos de alimento para peces mediante inclusión o mediante recubrimiento.

65 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos, para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteínas contenido en

gránulos de alimento para peces carnívoros, en el que dicho hidrolizado de proteínas presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

5 Dicho hidrolizado de proteínas contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular, dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

10 Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, en particular 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

15 En particular, dicho hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad *in vitro*, determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

20 En particular, dichos gránulos de alimento para peces carnívoros contienen dicho hidrolizado de proteínas mediante inclusión o mediante recubrimiento.

Todavía en particular, los nucleótidos se utilizan mediante inclusión en dichos gránulos de alimento para peces carnívoros o mediante recubrimiento de dichos gránulos de alimento para peces carnívoros.

25 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la utilización de uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina (IMP), monofosfato de guanosina (GMP), monofosfato de citidina (CMP) y combinaciones de los mismos, para la mejora del efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteínas contenido en una CMP destinada a la adición a gránulos de alimento para peces carnívoros, en el que dicho hidrolizado de proteínas presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

30 Dicho hidrolizado de proteínas contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

35 Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, en particular 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

40 En particular, dicho hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad *in vitro*, determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

45 Preferentemente, dicha CMP presenta un GH de entre 14,5% y 100%.

50 Preferentemente, el valor o valores de GH del hidrolizado de proteínas y/o de la CMP es de entre aproximadamente 20% y 100%, más preferentemente de entre aproximadamente 30% y 100%, y todavía más preferentemente de entre aproximadamente 40% y 100%. El valor del GH del hidrolizado de proteínas puede ser igual o diferente del GH de la CMP resultante, aunque ambos valores de GH se encuentran comprendidos en los intervalos indicados anteriormente.

Dicha CMP puede añadirse a gránulos de alimento para peces carnívoros mediante inclusión o mediante recubrimiento.

55 Se da a conocer en la presente memoria un kit para mejorar la palatabilidad de gránulos de alimento piscícola, que comprende, en uno o más recipientes en un único envase:

a) uno o más hidrolizados de proteínas que presentan un GH de entre 14,5% y 100%,

60 b) uno o más nucleótidos, y

c) opcionalmente, uno o más ingredientes adicionales de la composición mejoradora de la palatabilidad.

65 Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 10, particularmente por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16 y más particularmente por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes; en particular, dichos aminoácidos son aminoácidos naturales.

Más particularmente, dicho hidrolizado de proteínas contiene 17 aminoácidos naturales libres diferentes.

5 Dicho hidrolizado de proteínas puede contener por lo menos 14,5%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 29%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, particularmente 100% de aminoácidos libres respecto a la cantidad total de aminoácidos de dicho hidrolizado de proteínas.

10 En particular, dicho hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad in vitro determinada según M150 (Boisen, 1991) de por lo menos 90%, más particularmente de por lo menos 92%, de por lo menos 94%, de por lo menos 96% y más particularmente de por lo menos 98% de nitrógeno.

15 Ventajosamente, dicho kit comprende además medios para comunicar información o instrucciones al usuario para el uso apropiado de los componentes del kit.

Un alimento piscícola deseable para la utilización en acuicultura conducirá a un SGR elevado y a un FCR bajo. Con este fin, el alimento piscícola típicamente comprende uno o más de entre:

20 - fuentes de proteínas, carbohidratos y lípidos [por ejemplo harina de pescado, aceite de pescado, harina animal (por ejemplo harina de sangre, harina de plumas, harina de ave y/o otros tipos de harina producidos a partir de otros residuos de matadero), grasas animales (por ejemplo aceite de ave), harina vegetal (por ejemplo harina de soja, harina de altramuz, harina de guisante, harina de judía, harina de colza, harina de girasol), aceite vegetal (por ejemplo aceite de semilla de colza, aceite de soja), gluten (por ejemplo gluten del trigo y gluten del maíz) y aminoácidos añadidos (por ejemplo lisina y metionina)], y/o

25 - premezcla de vitaminas, y/o  
 - premezcla de minerales, y/o  
 - fuentes de fósforo (por ejemplo fosfato de monocalcio y fosfato de dicalcio), y/o  
 - pigmentos (por ejemplo cantaxantina y astaxantina).

30 Los gránulos de alimento piscícola se obtienen comúnmente mediante un procedimiento de cocción por extrusión. La cocción por extrusión de material que contiene almidón provoca que los gránulos de almidón se hinchen de manera que el almidón cristalino en los gránulos se libera y puede desplegarse. Lo anterior se denomina gelatinización del almidón. Las moléculas de almidón formarán una red que contribuye a ligar el extrudido. En particular en el alimento para peces carnívoros, se añaden materias primas que contienen almidón debido a su capacidad de unión en el alimento piscícola final. La presa natural para los peces carnívoros no contiene almidón. De esta manera, los peces carnívoros presentan cantidades reducidas de enzimas capaces de modificar el almidón en azúcar digerible. La cocción del almidón lo convierte en más digestible. Lo anterior se debe en parte a que el almidón ya no se encuentra en una forma cristalina en bruto, y en parte porque el procedimiento de cocción inicia una descomposición del almidón en unidades sacáridas más pequeñas, las cuales resultan más fáciles de digerir.

35 Otro efecto de la cocción por extrusión sobre la mezcla de proteínas, carbohidratos y grasas es que estos formarán complejos y uniones, posiblemente presentando ambos efectos positivos sobre la digestibilidad de la mezcla. Un efecto adicional de la cocción por extrusión es que el extrudido se convierte en poroso. Ello se debe a la caída de presión y a la caída de temperatura en la abertura de la matriz. El agua en el extrudido se expande inmediatamente y se libera en forma de vapor, dejando una estructura porosa en el extrudido. Esta estructura porosa puede llenarse con aceite en una etapa posterior del procedimiento. Un alimento extrudido típicamente contiene entre 18% y 30% de agua tras la extrusión. Tras la extrusión, dicho alimento habitualmente se somete a una etapa de secado y, ventajosamente, una etapa a continuación de recubrimiento con aceite. El producto final generalmente contiene aproximadamente 10% de agua o menos y, de esta manera, presentará una vida útil prolongada ya que la actividad acuosa es muy baja en dichos alimentos, se evita el crecimiento de hongos y mohos y también porque se evita la degradación bacteriana. En particular, antes o después del recubrimiento con hielo se enfría el alimento y puede envasarse.

Los Ejemplos a continuación ilustran algunas formas de realización y ventajas de la presente invención.

55 **Ejemplos**

I. Materiales y métodos

60 1.1. Especies de peces

A título ilustrativo de la presente invención, se seleccionó la lubina (*Dicentrarchus labrax*) como especie modelo de peces carnívoros con una elevada exigencia de palatabilidad del alimento (Altan et al., 2011).

65 Para la aplicación a otras especies, se seleccionó tilapia (*Oreochromis niloticus*) como modelo apropiado de especies omnívoras (González-Félix et al., 2009).

## 1.2. Composición y preparación del alimento

Se formuló un alimento experimental libre de harina de pescado (HP), en adelante denominado alimento de base vegetal o BV (Tabla 1, posteriormente). Este tipo de fórmula aparentemente presenta un muy baja palatabilidad para los peces carnívoros y omnívoros y, de esta manera, se considera un buen control negativo para el cribado de MP debido a su neutralidad respecto al olfato y el gusto.

El alimento formulado cumplía los requisitos nutricionales teóricos de la lubina y la tilapia, a excepción de la palatabilidad. La composición nutricional del alimento era la siguiente: proteína en bruto: 45%; grasas en bruto: 16%; cenizas: 7%; energía en bruto: 4.950 Kcal/kg. Tamaño de los gránulos: 2 mm.

Tabla 1. Composición del alimento de base vegetal utilizado en los ensayos

Materias primas e ingredientes	Alimento de base vegetal (BV)
Mezcla de harinas vegetales	80,07
DL-metionina	0,69
Lisina-HCl	1,78
Arginina-HCl	0,00
Fosfato monosódico	2,62
Aceite de pescado	12,55
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	

## 1.3. Ensayos con peces

Para la lubina, los ensayos se llevaron a cabo en las instalaciones de flujo experimental del IFREMER (Centre de Brest, Francia). Se filtró agua marina (salinidad: 35 g/l) (filtro de arena de alta presión) y se termorreguló (temperatura del agua:  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Se criaron grupos por triplicado de 40 lubinas (*D. labrax*), cada uno con un peso corporal medio inicial de entre 5,0 y 20,0 g (dependiendo del ensayo) en tanques de 80 l de capacidad (caudal: 3 l/min., fotoperiodo: 12 h de luz/12 h de oscuridad). Se asignaron tres tanques aleatoriamente a cada alimento.

Los alimentos se distribuyeron en exceso a los peces durante 15 días con un alimentador automático (Arvotech, Finlandia), 10 distribuciones de alimento al día. El alimento no ingerido se recogió cada día utilizando recolectores de residuos de alimento fabricados por los propios inventores, se agrupó y se conservó bajo congelación hasta el final del ensayo. Al final, el alimento no ingerido congelado se secó mediante evaporación y se pesó.

Para las tilapias, el ensayo se llevó a cabo en las instalaciones experimentales de Aqua-Erf (Bélgica) en un sistema de recirculación de agua dulce. Se criaron grupos por triplicado de 30 tilapias, presentando cada uno un peso corporal medio inicial de 21,7 g, en un tanque de fibra de 100 l (caudal: 3 l/min.; fotoperiodo: 12 h de luz/12 h de oscuridad). Se asignaron tres tanques aleatoriamente a cada alimento.

Se distribuyó alimento en exceso a los peces durante 105 días utilizando alimentadores de cinta automáticos. Se recogió el alimento no ingerido cada día utilizando recolectores de residuos de alimento fabricados por los propios inventores, se agrupó y se conservó congelado hasta el final del ensayo. Al final, el alimento no ingerido congelado se secó mediante evaporación y se pesó.

En ambos ensayos se contaron los peces y se pesaron al inicio y al final del ensayo. Antes de las pesadas los peces fueron sometidos a ayuno durante 24 h.

Se comprobó diariamente la supervivencia de los peces. Los peces muertos fueron contados y pesados.

Durante el periodo de ensayo se calcularon los parámetros zootécnicos siguientes: tasa de crecimiento específico (TCE), proporción de alimento consumido (Ac) y de conversión de alimento (PCA).

Sólo se informa en la presente memoria de los resultados de TCE, estando la tasa de crecimiento de los peces altamente correlacionada con la proporción de alimento consumido y de conversión de alimento, directamente influidos por la palatabilidad del alimento.

Todos los datos se analizaron mediante análisis de la varianza univariante (ANOVA), seguido de pruebas de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$ .

## 1.4. Aplicación de los MP

### 1.4.1. procedimiento de preparación de los MP

Se prepararon MP (por ejemplo mezcla de aminoácidos libres y mezcla de nucleótidos e hidrolizados) utilizando los métodos clásicos de mezcla de laboratorio para líquidos y polvos, que resultarán evidentes para el experto en la

materia.

#### 1.4.2. Procedimiento para la aplicación de los MP

5 Todos los MP evaluados en los ensayos de los que se informa en la presente memoria se aplicaron mediante recubrimiento de capa externa al 2%. El recubrimiento de capa externa (o recubrimiento) se llevó a cabo en un mezclador Forberg 2 kg (Forberg International, Larvik, Noruega) a una velocidad de aproximadamente 50 rpm. En primer lugar se aplicó aceite de pescado a un nivel de 1% (duración de la aplicación: aproximadamente 30 s). A continuación, el MP seco se espolvoreó (PP en polvo) o se pulverizó (PP líquido) durante aproximadamente 60 s bajo agitación y después el mezclador se mantuvo activado durante aproximadamente 60 s para la retención.

#### 1.5. Procedimiento de medición del GH (método OPA descrito en Nielsen et al., 2001)

15 Todas las mediciones de GH se llevaron a cabo utilizando el procedimiento OPA detallado posteriormente en la presente memoria.

En hidrolizados de proteínas, el parámetro clave para el seguimiento de la reacción es el grado de hidrólisis (GH). Se define GH como el porcentaje de enlaces peptídicos cortados:

$$20 \quad GH = h/h_{\text{tot}} \times 100\%$$

en donde  $h_{\text{tot}}$  es el número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteína y  $h$  es el número de enlaces hidrolizados.  $h$  se expresa en equivalentes de serina-NH<sub>2</sub>, ya que la serina muestra una respuesta próxima a la media de todos los aminoácidos según la fórmula:

$$25 \quad h = (\text{serina-NH}_2\text{-}\beta) / \alpha \text{ meq/g de proteína}$$

La mayoría de proteínas de los alimentos presentan un valor medio de 125 g/mol de peso molecular de aminoácido, que proporciona un  $h_{\text{tot}}=8$ , pueden adaptarse al valor de 7,6 para carne y de 8,6 para pescado. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  se fijaron en 1,00 y 0,40 para carne y pescado, respectivamente.

##### 1.5.1. Principio

35 Cada enlace peptídico hidrolizado condujo a un grupo amino libre. Dichos grupos amino reaccionan con OPA formando un complejo amarillo que seguidamente se medirá espectrofotométricamente a 340 nm. La densidad óptica es una función de los datos del complejo.

40 El procedimiento consiste en la medición del valor  $h$ , seguido del valor de equivalentes de serina del hidrolizado y la comparación del complejo de color formado en los hidrolizados informados con el nivel de complejo formado en un estándar de serina (con la corrección de un blanco).

##### 1.5.2. Aparato

45 Matraces Erlenmeyer, balanza analítica de 4 decimales. Pipetas: adaptadas al volumen. Agitador magnético, vórtex, espectrofotómetro a 340 nm.

##### 1.5.3. Reactivos

50 Se preparó el reactivo OPA de la manera siguiente, en un matraz de 200 ml: se disolvieron 7,620 g de decahidrato de di-Na-tetraborato y 200 mg de dodecilsulfato sódico (SDS) en 150 ml de agua desionizada. Los reactivos deben disolverse por completo antes de continuar. Se disolvieron 160 mg de OPA al 97% en 4 ml de etanol. A continuación, la solución de OPA se transfirió cuantitativamente a la solución anteriormente indicada mediante enjuague con agua desionizada. Se añadieron 176 mg de ditioneitol al 99% (DTT) a la solución mediante enjuague con agua desionizada. La solución se enrasó a 200 ml con agua desionizada.

55 Se preparó el estándar de serina mediante la disolución de 50 mg de serina en 500 ml de agua desionizada (0,9516 meq/l).

60 La solución de muestra se preparó mediante la disolución de 200 mg en 100 ml de agua desionizada.

##### 1.5.4. Mediciones

65 Se introdujeron 3 ml de OPA en cada uno de los 6 tubos de microespectrometría. A continuación, se añadieron 400  $\mu$ l de agua (blanco), se añadió estándar de serina o muestra y se realizaron las mediciones en ambos +2 minutos tiempo de reacción. Para cada muestra, se realizó una medición de un blanco, después 2 mediciones de estándar, seguido de 3 mediciones de muestra.

Se realizaron ensayos a 20°C.

Las lecturas de absorbancia típicas para los estándares y blancos de agua fueron de 0,8 y 0,07, respectivamente.

5

1.5.5. Determinación de h y GH

Serina-NH<sub>2</sub>=(DO<sub>muestra</sub> - DO<sub>blanco</sub>/DO<sub>estándar</sub> - DO<sub>blanco</sub>) x 0,9516 meqv/l x 0,1 x 100/ X x P

10 en la que serina-NH<sub>2</sub>=meqv serina NH<sub>2</sub>/g de proteína; X=g de muestra; P=% de proteína en muestra; 0,1 era el volumen de muestra, en litros (l).

h es: h=(serina-NH<sub>2</sub>-β) / α meqv/g de proteína, en la que α y β se proporcionan anteriormente.

15 Cálculo del GH: GH= h /h<sub>tot</sub> X 100%.

II. Resultados

2.1. Los hidrolizados de proteínas mejoran la palatabilidad al añadirlos a gránulos de alimento piscícola

20

2.1.1. a) El objetivo del primer ensayo fue evaluar el efecto de mejora de la palatabilidad de una mezcla de aminoácidos libres como mejoradora de la palatabilidad de alimento para peces. La mezcla de aminoácidos libres se produjo mediante hidrólisis ácida de plumas, seguido de neutralización con sosa cáustica y contenía todos los aminoácidos esenciales y no esenciales, excepto triptófano (Tabla 2).

25

Tabla 2. Composición de la mezcla de aminoácidos libres

Aminoácidos	g/100 g de producto
Lisina	1,00
Histidina	0,77
Arginina	3,76
Ácido aspártico	4,02
Treonina	2,74
Serina	7,25
Ácido glutámico	5,79
Prolina	6,03
Glicina	4,44
Alanina	2,70
Cistina	0,84
Valina	3,09
Metionina	0,29
Isoleucina	2,03
Leucina	3,76
Tirosina	0,61
Fenilalanina	2,87
(+ NaCl: csp 100 g)	

30 Tal como se ilustra en la figura 1, al final del ensayo, la tasa de crecimiento de los peces se incrementó significativamente mediante la aplicación de la mezcla de 17 aminoácidos libres mediante recubrimiento con una capa externa.

35 b) El objetivo del segundo ensayo fue comparar el efecto de mejora de la palatabilidad de una mezcla de seis aminoácidos libres y derivados referenciados clásicamente en la literatura (Tabla 3; Mackie y Mitchell, 1982, 1983; Dias et al., 1997; Tiril et al., 2008) con la de una mezcla de los 17 aminoácidos libres evaluados en el primer ensayo informado anteriormente.

Tabla 3. Composición de la mezcla de aminoácidos libres y derivados

40

Aminoácidos y derivados	%
Prolina	20
Lisina	10
Histidina	10
Glicina	20
Taurina	30
Betaína	30

Tal como se ilustra en la figura 2, la mezcla de 17 aminoácidos libres mostró resultados de mejora de la palatabilidad significativamente superiores que la mezcla de aminoácidos libres y derivados referenciados en la literatura como mejoradora de la palatabilidad de alimento.

- 5 c) Para completar el presente estudio, se llevó a cabo un ensayo complementario para evaluar el efecto de complementación de una mezcla de 17 aminoácidos libres con otros aminoácidos y derivados (Tabla 4) referenciados en la literatura (Mackie et al., 1980) como mejoradora de palatabilidad del alimento en peces.

10 Tabla 4. Composición de la mezcla de 17 aminoácidos libres complementados con 4 aminoácidos y derivados

Aminoácidos y derivados	g/100 g de producto
Lisina	0,70
Histidina	0,54
Arginina	2,64
Ácido aspártico	2,82
Treonina	1,91
Serina	5,07
Ácido glutámico	4,05
Prolina	4,22
Glicina	3,11
Alanina	1,89
Cistina	0,59
Valina	2,16
Metionina	0,20
Isoleucina	1,42
Leucina	2,64
Tirosina	0,43
Fenilalanina	2,01
Taurina	3,50
Betaína	13,00
Glicina	5,00
Alanina	8,50

(+ NaCl: csp 100 g)

15 Tal como se ilustra en la figura 3, la adición de glicina, betaína, taurina y alanina no incrementó la palatabilidad del alimento al mezclar los 17 aminoácidos libres.

- 20 d) Los presentes resultados demostraron que la aplicación mediante recubrimiento externo de una mezcla de 17 aminoácidos libres resulta eficiente para mejorar la palatabilidad del alimento a un nivel más alto que los aminoácidos clásicos y derivados ya identificados en la literatura como mejoradores de palatabilidad del alimento.

Los presentes resultados tienden a demostrar que, más que la naturaleza de los aminoácidos o derivados, su estado (libre o no) en la formulación del MP es el controlador principal de la mejora de palatabilidad del alimento.

25 2.1.2. El objetivo del ensayo fue demostrar que algunos hidrolizados fabricados con diferentes orígenes de materia prima (tal como levadura, camarones, calamares) y que presentaban un grado diferente de hidrólisis (Tabla 5) podía incrementar la palatabilidad de un alimento de base vegetal, así como la mezcla de aminoácidos libres evaluada anteriormente.

30 Tabla 5. Grado de hidrólisis de los tres hidrolizados evaluados como mejoradores de la palatabilidad del alimento en la lubina

Origen de materia prima del hidrolizado	Grado de hidrólisis (%)	Nivel de aminoácidos libres (% respecto a la cantidad total de aminoácidos)
Levadura	61,1	48
Calamar	20,7	29
Camaron	52,5	52

35 Tal como se ilustra en la figura 4, con independencia del origen y el grado de hidrólisis, los tres hidrolizados aplicados mediante recubrimiento de capa externa sobre el alimento de base vegetal resultó en un incremento significativo de la tasa de crecimiento. Estos resultados validan claramente que los hidrolizados que contienen aminoácidos libres y péptidos pueden incrementar significativamente la palatabilidad del alimento al aplicarlos en forma de recubrimiento externo.

2.2. Los hidrolizados de proteínas en combinación con nucleótidos conducen a un efecto incrementado de mejora de la palatabilidad al añadirlos a gránulos de alimento piscícola

5 2.2.1. Con el fin de evaluar el rendimiento de una combinación de hidrolizados de proteínas y nucleótidos, se mezcló una mezcla comercial de IMP/GMP (50/50) en un hidrolizado de proteínas a diferentes dosis (0%, 1%, 2,5%, 5% y 10%) y el candidato a mejorador de palatabilidad resultante se aplicó a modo de recubrimiento externo sobre un alimento de base vegetal.

10 Tal como se muestra en la figura 5, al final del ensayo, la aplicación de un hidrolizado solo permitió incrementar significativamente la palatabilidad del alimento de base vegetal. El efecto del hidrolizado sobre la palatabilidad del alimento se incrementó significativamente mediante la adición de los nucleótidos IMP/GMP 50/50, un nivel de inclusión de IMP/GMP de 2,5% en el hidrolizado, proporcionando el mejor resultado.

15 El efecto de "refuerzo" de los nucleótidos IMP/GMP (misma mezcla comercial de IMP/GMP 50/50 indicada anteriormente) se confirmó al añadir a un hidrolizado basado en atún a diferentes niveles (1%, 2% y 3% en el hidrolizado) (figura 6).

20 En conclusión, la adición de IMP/GMP a una fuente de proteínas hidrolizadas incrementó eficientemente la palatabilidad del alimento piscícola. La dosis de 2,5% de IMP/GMP en el hidrolizado aparentemente resultó ser la más eficiente y, de esta manera, se consideró para otros ensayos informados posteriormente en la presente memoria.

25 2.2.2. Se llevaron a cabo diferentes ensayos para evaluar el efecto de mejora de la palatabilidad de los nucleótidos (IMP/GMP 50/50) al mezclarlos en una proporción de 2,5% con hidrolizados de diferente origen: una mezcla de 17 aminoácidos libres o un hidrolizado marino de diferentes especies: atún, tilapia y calamar (Tabla 6; figura 7a, b, c, d).

Tabla 6. Grado de hidrólisis de los cuatro hidrolizados evaluados en combinación con nucleótidos

Origen de materia prima del hidrolizado	Grado de hidrólisis (%)	Nivel de aminoácidos libres (% respecto a la cantidad total de aminoácidos)
Mezcla de 17 aminoácidos libres	100	100
Hidrolizado de calamar	20,7	29
Hidrolizado de atún	53,0	55
Hidrolizado de tilapia	21,9	21

30 Tal como se muestra en la figura 7a a d, con independencia de la naturaleza de las materias primas utilizadas y el grado de hidrólisis de los hidrolizados, todas las combinaciones "hidrolizado + nucleótidos (IMP/GMP 50/50)" incrementaron eficientemente de manera significativa la palatabilidad del alimento de base vegetal.

35 2.3. Una fuente de proteínas hidrolizadas resulta indispensable para obtener una mejora de la palatabilidad del alimento al añadir nucleótidos

40 El objetivo del presente ensayo fue evaluar el efecto de mejora de la palatabilidad de los nucleótidos (IMP/GMP 50/50) al añadirlos mediante recubrimiento externo mezclados con una materia prima no hidrolizada (harina de levadura) o una materia prima hidrolizada (hidrolizado de levadura) o una mezcla de ambas. El grado de hidrólisis de los diferentes productos se indica en la Tabla 7. El nivel de nucleótidos (IMP/GMP 50/50) en el mejorador de palatabilidad era de 2,5% en todos los productos.

45 Tabla 7. Grado de hidrólisis de los tres hidrolizados evaluados como MP

Producto	Grado de hidrólisis del MP (%)	Nivel de aminoácidos libres (% respecto a la cantidad total de aminoácidos)
Harina de levadura/nucleótidos	7,8	5
Hidrolizado de levadura/nucleótidos	59,6	48
Hidrolizado de levadura/harina de levadura/nucleótidos	33,6	26

50 Tal como se muestra en la figura 8, la complementación con nucleótidos de una harina de levadura, con un nivel bajo de hidrólisis de las proteínas, no incrementó la palatabilidad del alimento. Por el contrario, la inclusión de un hidrolizado en la fórmula de MP, incrementó significativamente la palatabilidad del alimento piscícola al complementarla con los nucleótidos IMP/GMP.

Estos resultados proporcionan evidencia de que la presencia de una fuente de proteínas hidrolizadas en una

formulación mejoradora de la palatabilidad resulta indispensable para obtener una mejora significativa del crecimiento de los peces al añadir los nucleótidos IMP/GMP.

5 2.4. Importancia del grado de hidrólisis de los hidrolizados de proteínas en la mejora del efecto de mejora de la palatabilidad de los hidrolizados de proteínas en combinación con nucleótidos al añadirlos a gránulos de alimento piscícola

10 Con el fin de definir el nivel mínimo de hidrólisis necesario para obtener un incremento significativo de la palatabilidad del alimento piscícola al mezclar 2,5% de nucleótidos (IMP/GMP) con un hidrolizado, se diseñó un ensayo con algunos hidrolizados, producidos a partir de las mismas materias primas y con un intervalo de grados de hidrólisis de 8% a 100%, proporcionando un grado de hidrólisis del MP final de entre 7,8% y 97,5% (figura 9).

15 Se produjo un incremento significativo de la palatabilidad del alimento, incrementando simultáneamente el grado de hidrólisis del hidrolizado contenido en el MP.

Tal como se ilustra en la figura 9, dicha mejora significativa se registró a partir de un grado de hidrólisis de 14,5% en la comparación con el control negativo. De esta manera, dicho valor de grado de hidrólisis se considera el mínimo requerido para conseguir un efecto de mejora de la palatabilidad de los nucleótidos al mezclarlos con un hidrolizado.

20 2.5. Impacto de la naturaleza de los nucleótidos sobre el efecto mejorado de mejora de la palatabilidad de los hidrolizados de proteínas en combinación con nucleótidos al añadirlos a gránulos de alimento piscícola

25 Los resultados de los que se informa anteriormente demostraron que una mezcla de IMP/GMP (50/50) incrementó significativamente ("reforzó") el efecto de mejora de la palatabilidad de los MP, al combinarla con un hidrolizado que presentaba un grado de hidrólisis de por lo menos 14,5%.

30 Se llevaron a cabo ensayos complementarios para estudiar el efecto de IMP y GMP por sí solos (figura 10a) y otras fuentes de nucleótidos (AMP, UMP, CMP) (figura 10b), al mezclarlos con un hidrolizado de levadura, aplicando seguidamente el MP obtenido de esta manera mediante recubrimiento externo sobre un alimento de base vegetal en la lubina.

35 Los resultados ilustran en la figura 10a demostraron que la inclusión de IMP por sí sola o una mezcla de IMP/GMP mejoró significativamente la palatabilidad del alimento de base vegetal. Esta mejora resultó inferior con GMP pero no significativamente diferente de la de otras fuentes de nucleótidos.

Los presentes resultados confirmaron que IMP y GMP proporcionan los mejores resultados al añadirlos a un hidrolizado. Además, el CMP permitió observar el mismo nivel de mejora de la palatabilidad que IMP y GMP (figura 10b).

40 La inclusión de UMP o AMP al hidrolizado no resultó eficiente para incrementar la palatabilidad del alimento en comparación la adición del hidrolizado solo (figura 10b). Además, en combinación con IMP, AMP no resultó en una reducción del efecto de "refuerzo" en comparación con IMP solo, proporcionando evidencia de un efecto neutro de AMP sobre la mejora de la palatabilidad por los hidrolizados (figura 10b).

45 En conclusión, IMP, GMP y CMP son los nucleótidos preferentes para mejora ("reforzar") el efecto de mejora de la palatabilidad de los hidrolizados. Resulta interesante que dichos tres nucleótidos podrían combinarse de manera que podría esperarse un efecto aditivo de mejora de la palatabilidad.

50 2.6. Las combinaciones de hidrolizados de proteínas y nucleótidos condujeron a un efecto mejorado de mejora de la palatabilidad al añadirlos a gránulos de alimento piscícola para especies omnívoras

55 Se consideraron dos combinaciones de hidrolizados de proteínas y nucleótidos (a diferentes niveles: 0,07% y 0,7% de IMP/GMP) para evaluar sus rendimientos en un alimento de bajo contenido en harina de pescado formulado para la especie omnívora tilapia (*Oreochromis niloticus*).

60 Tal como se demostró para la especie piscívora lubina, las combinaciones de hidrolizados de proteínas y nucleótidos eficientemente mejoraron de manera significativa la palatabilidad del alimento d base vegetal para las tilapias omnívoras ( $p < 0,05$ ) (figura 11). Sin embargo, la diferencia de rendimiento entre los dos alimentos fue menos importante que para la lubina, subrayando la elevada tolerancia de la tilapia, que es omnívora, hacia la inclusión de proporciones elevadas de materia vegetal en la dieta.

**Referencias**

65 Altan et al., 2011. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 11:87-92.

A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis. 16th ed., Ch. 12 Horowitz, Washington, DC, pp 7-9

- Boisen, CAB International, 1991, p.135-145,
- 5 Dias J, Gomes E. and S.J. Kaushik, 1997. Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European sea bass fed plant protein rich feeds. *Aquat. Living Resour.*, 10:385-389.
- Dong D, Jones G, Zhang S. 2009. Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evol Biol.* 9:12.
- 10 Friedman M. 1989 . *Absorption and Utilization of Amino Acids*, Vol 3. Taylor & Francis 336p.
- Grosvenor W, Feigin AM, Spielman AI, Finger TE, Wood MR, Hansen A, Kalinoski DL, Teeter JH, Brand JG. 1998. The arginine taste receptor. *Physiology, biochemistry, and immunohistochemistry.* *Ann N Y Acad Sci.* 855:134-42.
- 15 González-Félix ML, Castillo-Yañez FJOcaño-Higuera VM, Perez-Velazquez M, Cota-Moreno V, Lozano-Taylor J. 2009. Effect of dietary protein source and time on alkaline proteolytic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol Biochem.* 36 (3):779-85
- Guillaume et al. September 2001. *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans.* Springer Praxis (UK).
- 20 Hung et al. 1984. *J. Food Sci.* 49:1535-1542
- Hara TJ. 1994 Olfaction and gustation in fish: an overview. *Acta Physiol Scand.*152(2):207-17.
- 25 Ishimaru Y, Okada S, Naito H, Nagai T, Yasuoka A, Matsumoto I, Abe K. 2005. Two families of candidate taste receptors in fishes. *Mech Dev.* 122(12):1310-21. Kasumyan A.O., Døving K.B. 2003. Taste preferences in fishes. *Fish and Fisheries* 4, 289-347.
- Mackie, A. M., J. W. Adron, and P. T. Grant. 1980. Chemical nature of feeding stimulants for the juvenile sole, *Solea solea* (L.). *J. Fish Biol.* 16: 701-708.
- 30 Mackie, A.M. and Mitchell, A.I. 1982. Chemical ecology and chemoreception in the marine environment. In "Indices Biochimique et milieux marins" (Journées du GABIN, Brest, 18-20 Nov. 1981). Publ. CMEXO (Actes Collon.) 14, 11-24.
- 35 Mackie, A.M. and Mitchell, A.I. 1983. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for the juvenile European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *J. Fish Biol.* 22, 425-430.
- Nielsen et al. 2001. *J. Food Sci.* 66:642-646
- 40 Oike H, Nagai T, Furuyama A, Okada S, Aihara Y, Ishimaru Y, Marui T, Matsumoto I, Misaka T, Abe K. 2007. Characterization of ligands for fish taste receptors. *J Neurosci.* 27(21):5584-92.
- Plakas SM, Lee TC, Wolke RE, Meade TL. 1985. Effect of Maillard browning reaction on protein utilization and plasma amino acid response by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Nutr.* 115(12):1589-99.
- 45 Silvestre. 1997. *Food Chem.* 60:263-273 Tiril, S.U., Alagil F., Yagci F. B., and Aral O. 2008. Effects of Betaine Supplementation in Plant Protein Based Diets on Feed Intake and Growth Performance in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Israeli Journal of Aquaculture* 60(1), 57-64.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para preparar gránulos de alimento para peces carnívoros que presenta una palatabilidad mejorada, que comprende:
- 5
- a) proporcionar una composición mejoradora de la palatabilidad que comprende:
    - un hidrolizado de proteína que presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y que contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes, combinado con:
    - 10 - uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, y
    - 15 - opcionalmente, en presencia de uno o más ingredientes de la composición mejoradora de la palatabilidad adicionales;
  - b) aplicar dicha composición mejoradora de la palatabilidad a los gránulos de alimento para peces carnívoros; y
  - c) recuperar dichos gránulos de alimento para peces carnívoros que presentan una palatabilidad mejorada.
- 20
2. Procedimiento para mejorar la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros, que comprende:
- a) aplicar a dichos gránulos de alimento para peces carnívoros una composición mejoradora de la palatabilidad que comprende:
  - 25 - un hidrolizado de proteína que presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y que contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes, combinado con:
  - 30 - uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, y
  - opcionalmente, en presencia de uno o más ingredientes de la composición mejoradora de la palatabilidad adicionales.
- 35
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha composición mejoradora de la palatabilidad presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100%.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes son aminoácidos naturales.
- 40
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho hidrolizado de proteína se encuentra presente en una cantidad desde 14,5 a 100% en peso en dicha composición mejoradora de la palatabilidad.
- 45
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos uno o más nucleótidos se encuentran presentes en una cantidad desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25% en peso en dicha composición mejoradora de la palatabilidad.
- 50
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha composición mejoradora de la palatabilidad se aplica a los gránulos de alimento para peces carnívoros mediante inclusión o mediante recubrimiento.
8. Procedimiento para mejorar la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros que contienen un hidrolizado de proteína, que comprende:
- 55
- a) aplicar uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, a dichos gránulos de alimento para peces carnívoros que contienen dicho hidrolizado de proteína, en el que dicho hidrolizado de proteína presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes.
- 60
9. Procedimiento para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteína que debe aplicarse a unos gránulos de alimento para peces carnívoros, que comprende:
- 65
- a) combinar dicho hidrolizado de proteína con uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, en el que dicho hidrolizado de proteína presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y contiene por lo menos 17

aminoácidos libres diferentes.

10. Procedimiento para alimentar peces carnívoros, que comprende:

- 5 a) alimentar con gránulos de alimento para peces carnívoros a peces carnívoros, en el que dichos gránulos comprenden un hidrolizado de proteína combinado con uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, en el que dicho hidrolizado de proteína presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes.
- 10 11. Utilización de uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteína contenido en gránulos de alimento para peces carnívoros, en la que dicho hidrolizado de proteína presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes.
- 15 12. Utilización de uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos, para mejorar el efecto de palatabilidad de un hidrolizado de proteína contenido en una composición mejoradora de la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros, en la que dicho hidrolizado de proteína presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y contiene por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes.
- 20 13. Utilización según la reivindicación 12, en la que dicha composición mejoradora de la palatabilidad presenta un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100%.
- 25 14. Procedimiento para preparar una composición mejoradora de la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros, que comprende:
- 30 a) proporcionar uno o más hidrolizados de proteína que presentan un grado de hidrólisis (GH) desde 14,5 a 100% y que contienen por lo menos 17 aminoácidos libres diferentes;
- 35 b) proporcionar uno o más nucleótidos seleccionados de entre monofosfato de inosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de citidina y combinaciones de los mismos;
- c) opcionalmente, proporcionar uno o más ingredientes adicionales de la composición mejoradora de la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros;
- d) combinar dichos uno o más hidrolizados de proteína y dichos uno o más nucleótidos y, opcionalmente, dichos uno o más ingredientes adicionales; y
- 40 e) obtener dicha composición mejoradora de la palatabilidad de gránulos de alimento para peces carnívoros.

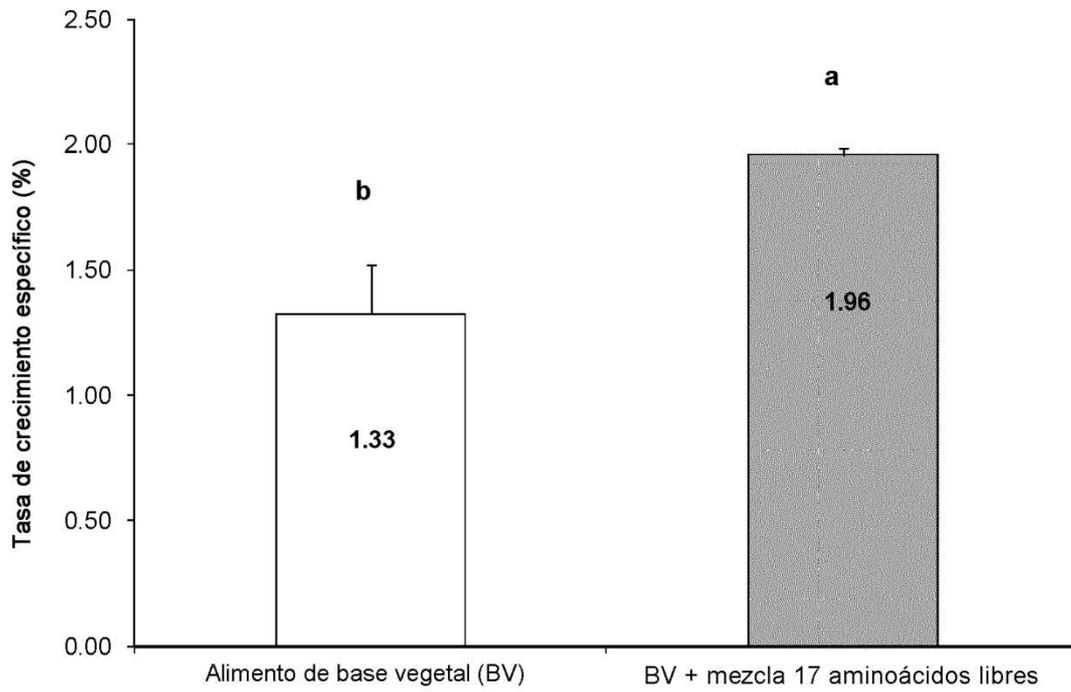


Fig. 1

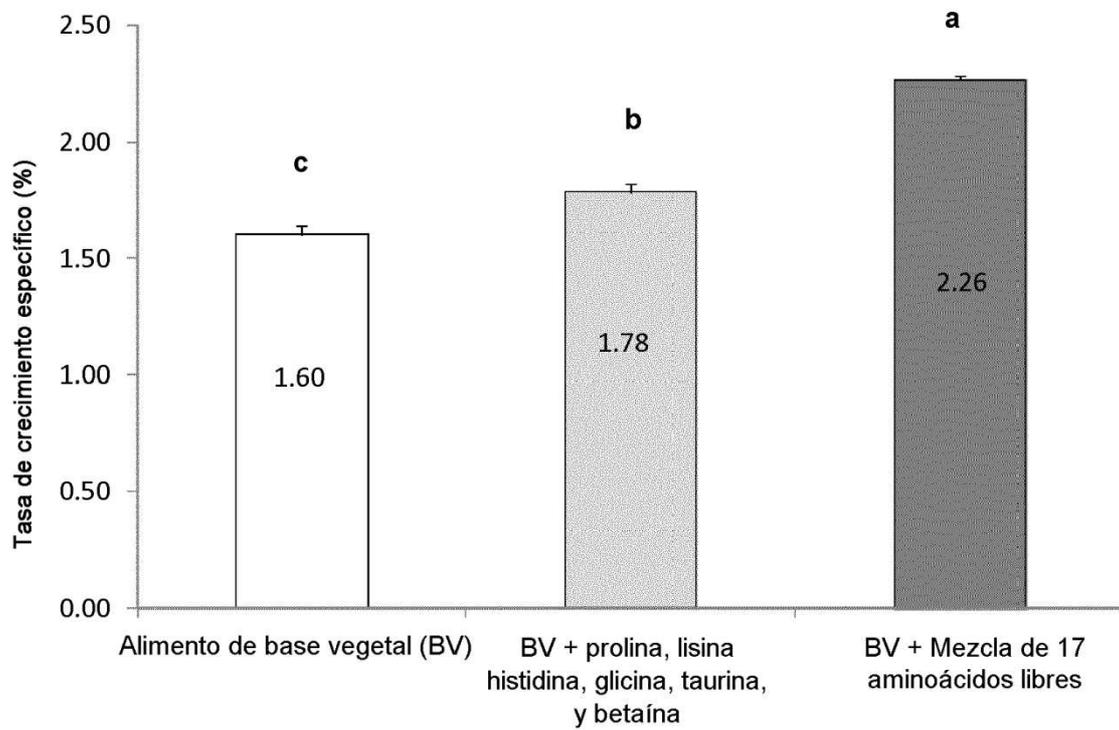


Fig.2

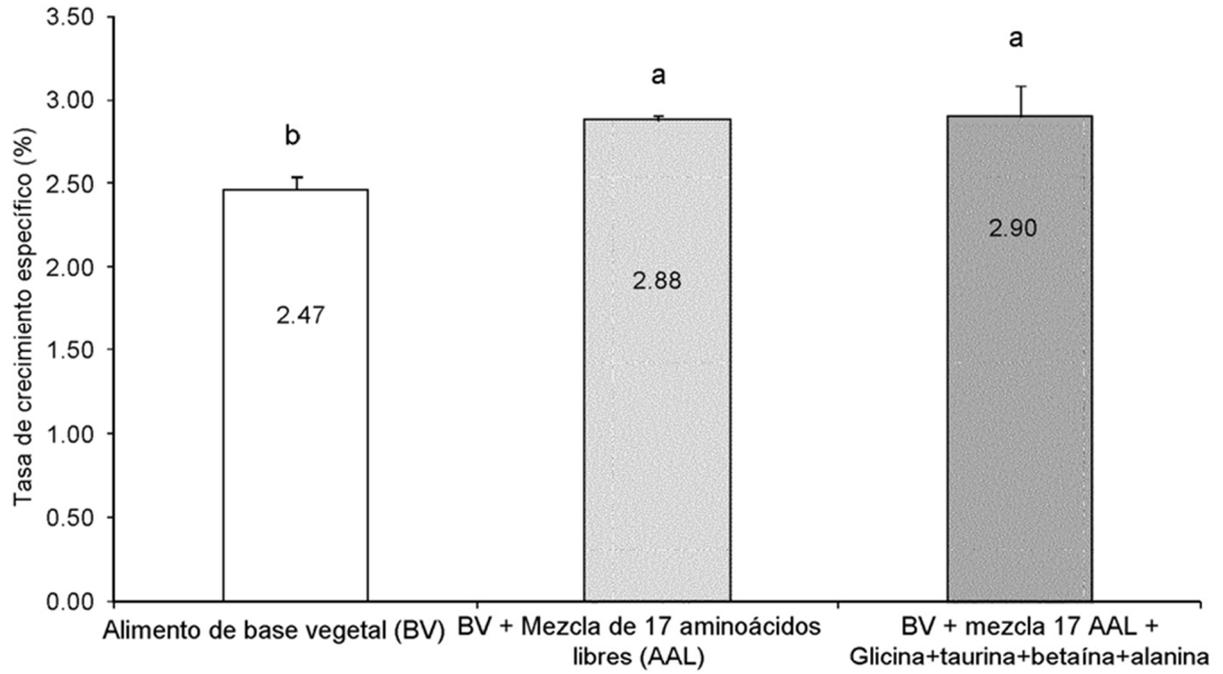


Fig.3

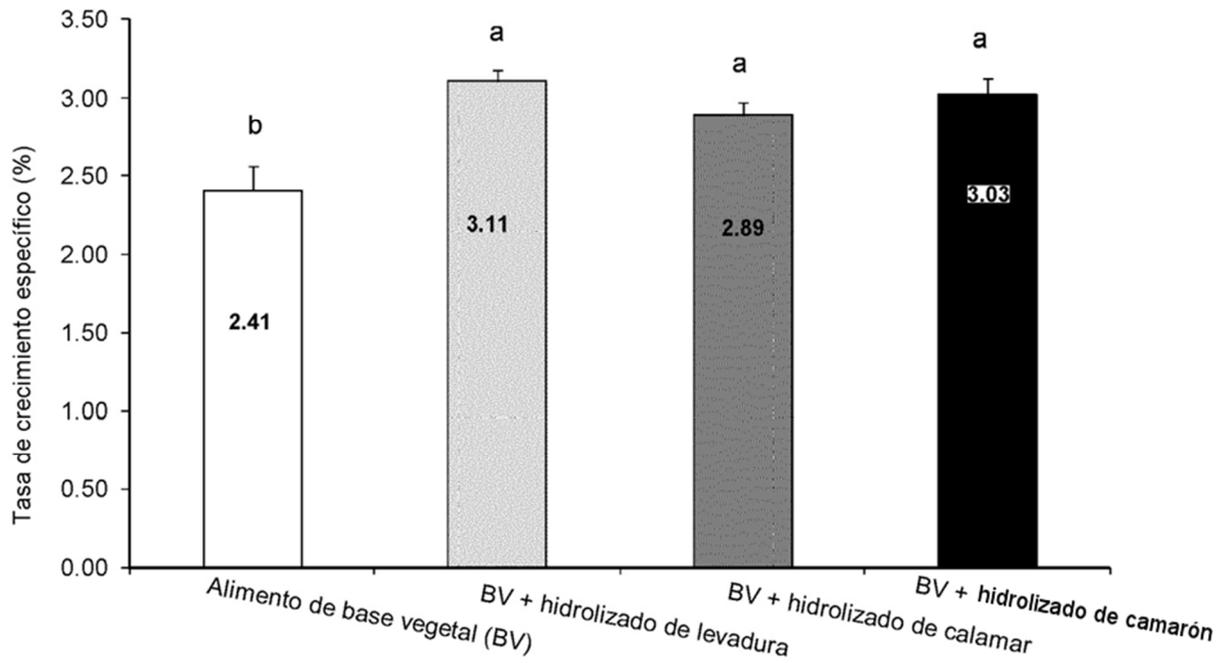


Fig. 4

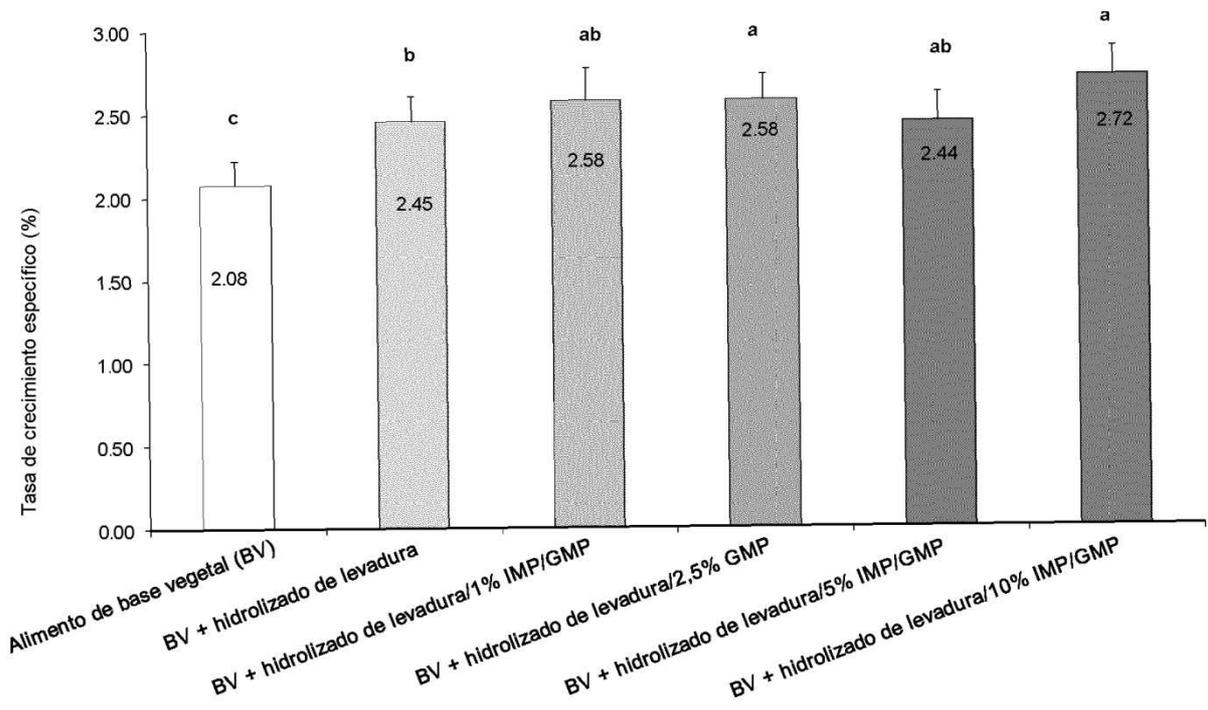


Fig. 5

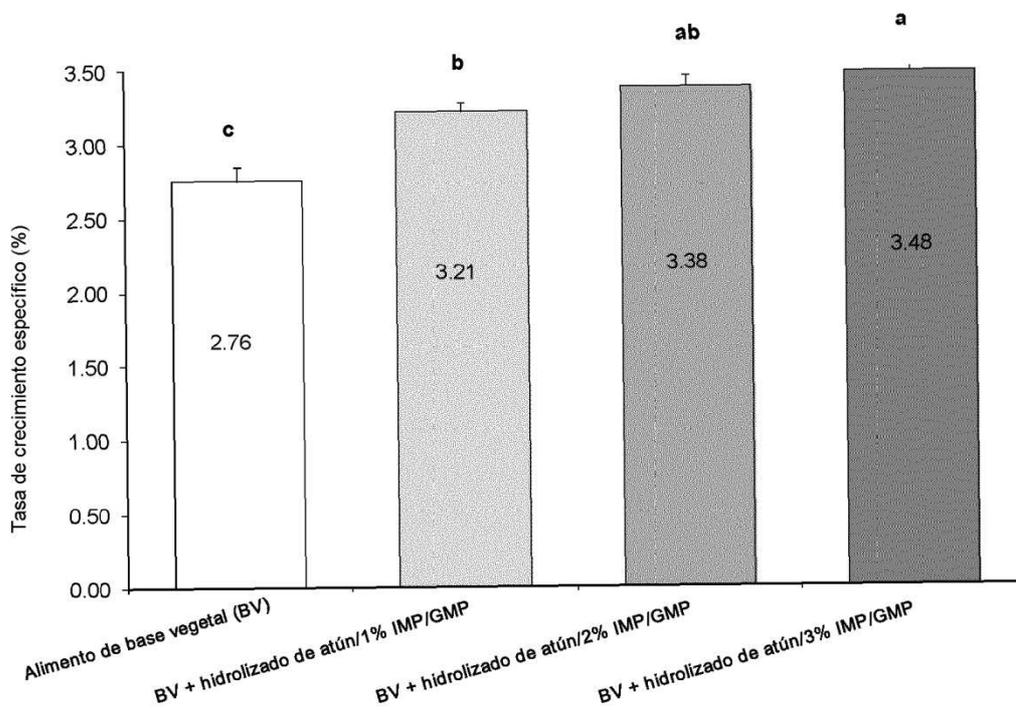


Fig. 6

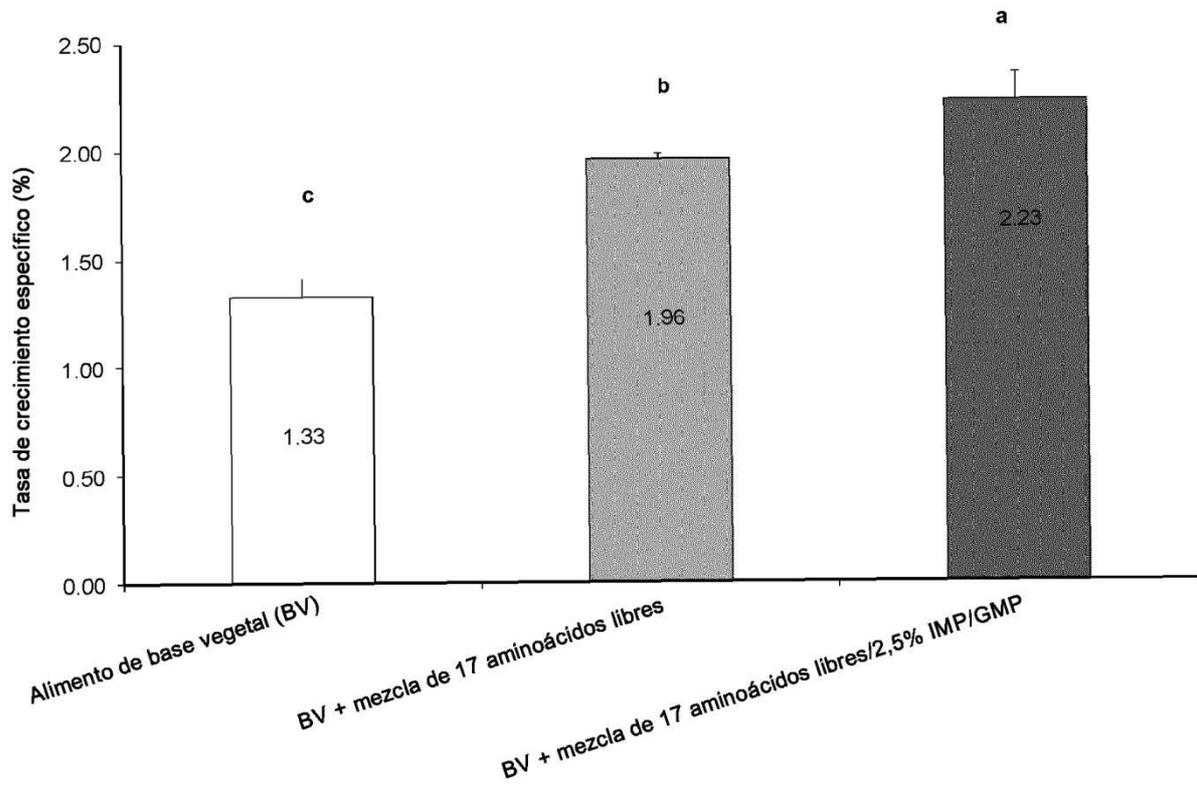


Fig. 7a

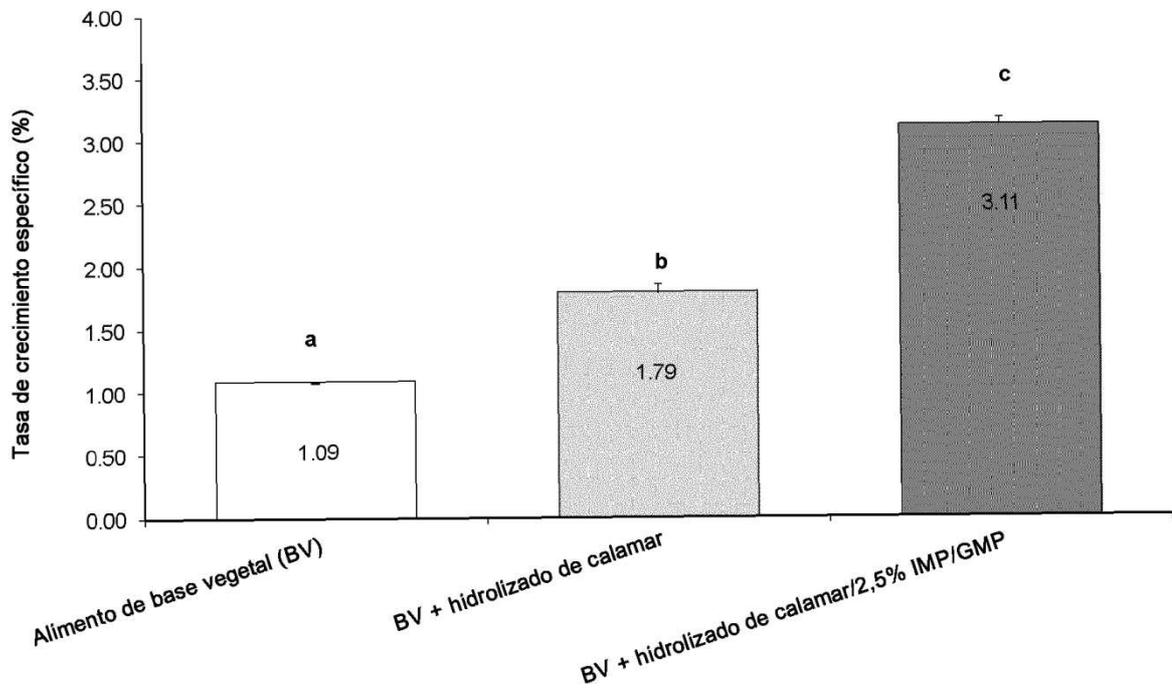


Fig. 7b

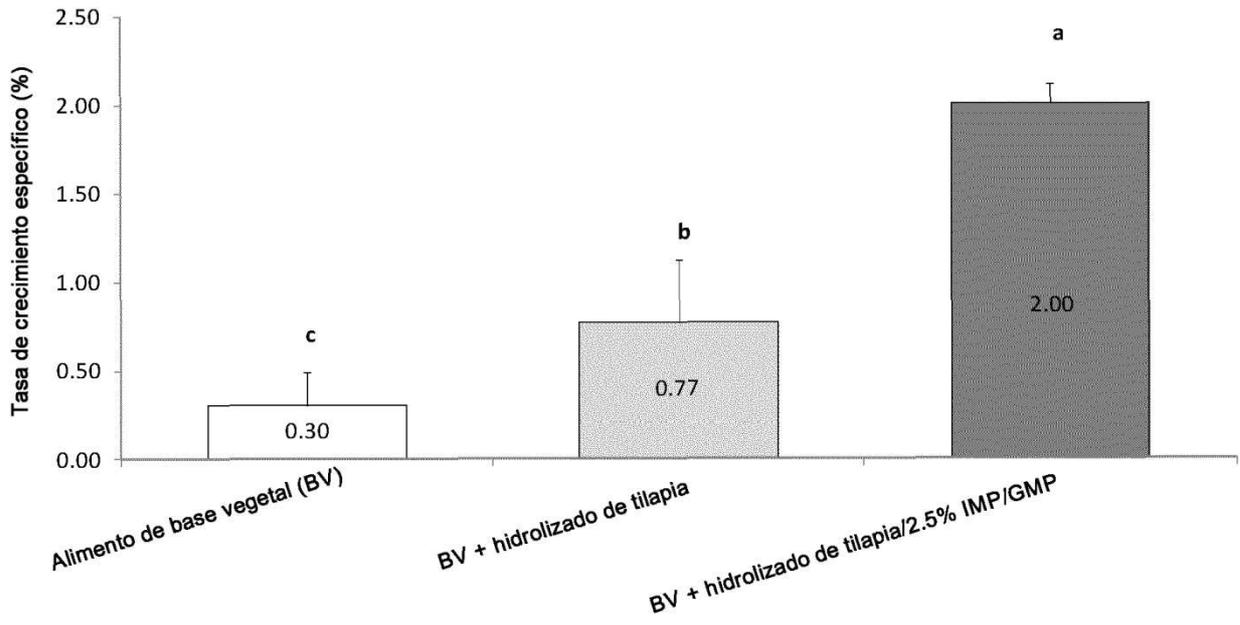


Fig. 7c

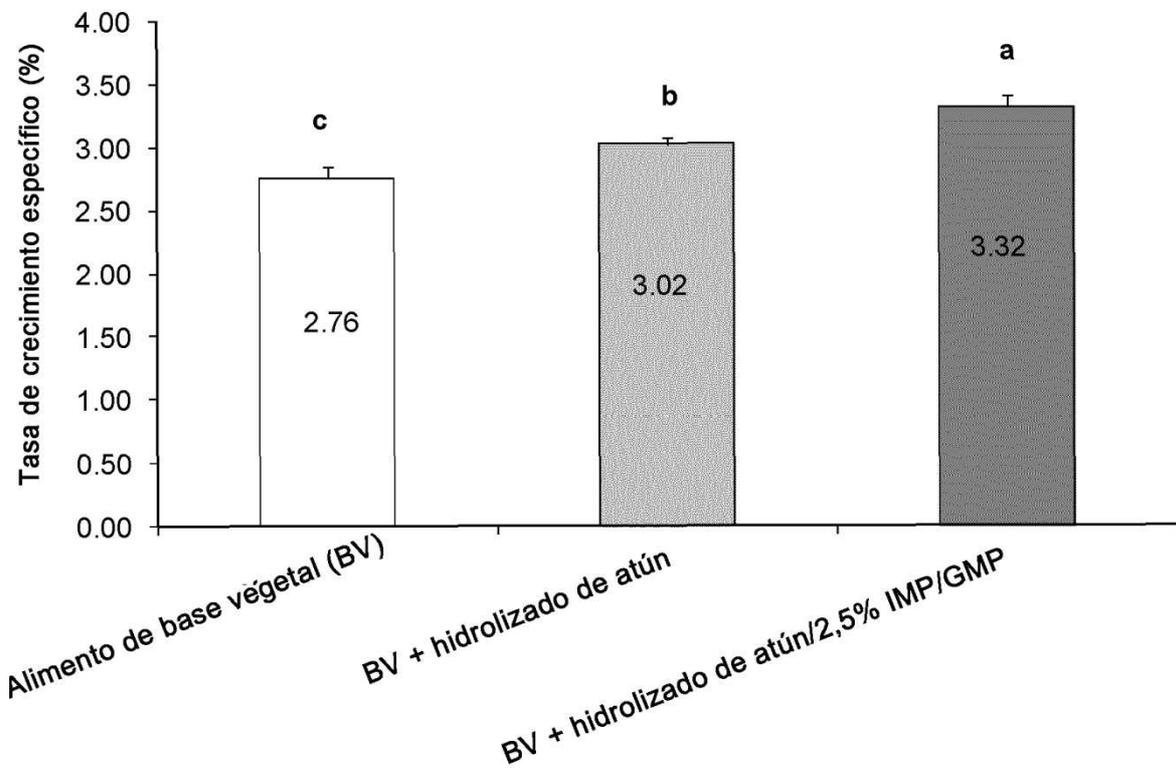


Fig. 7d

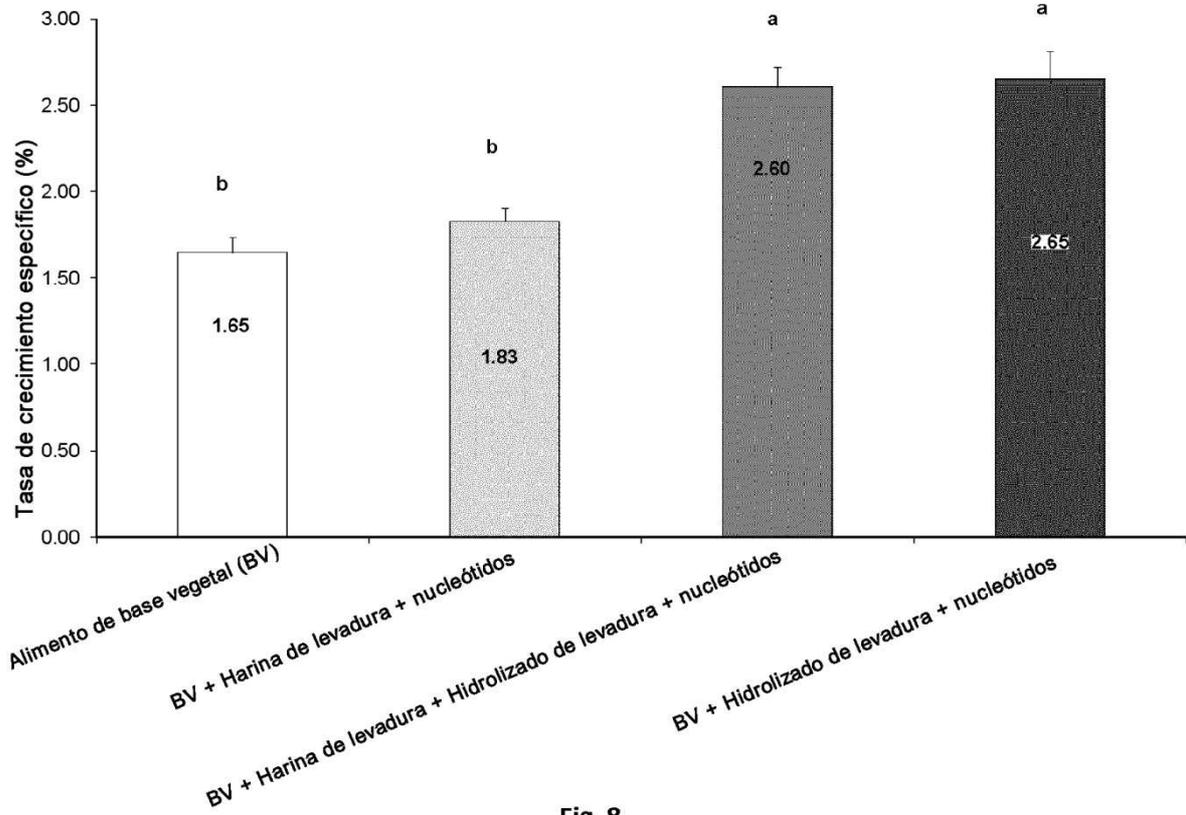


Fig. 8

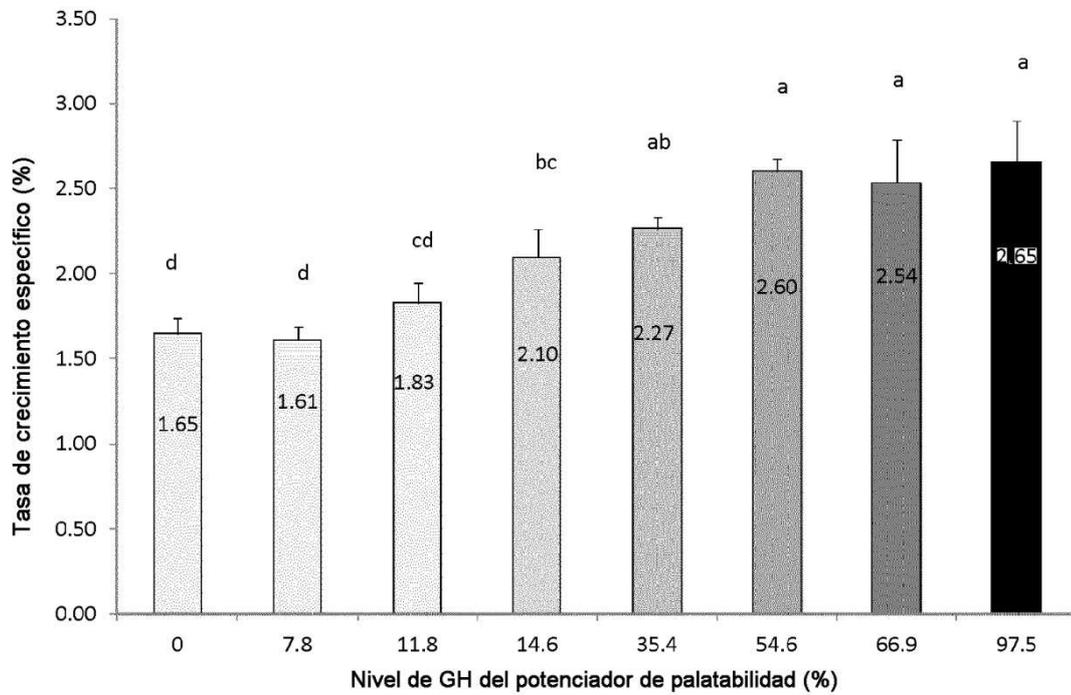


Fig. 9

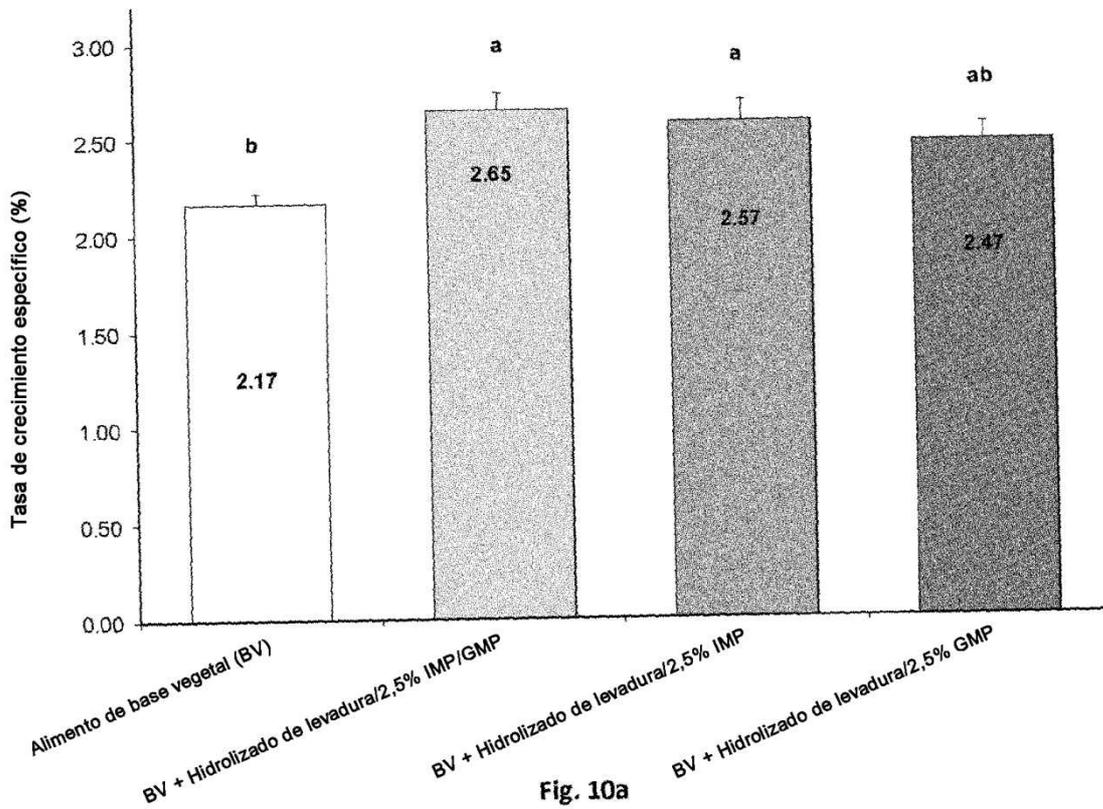


Fig. 10a

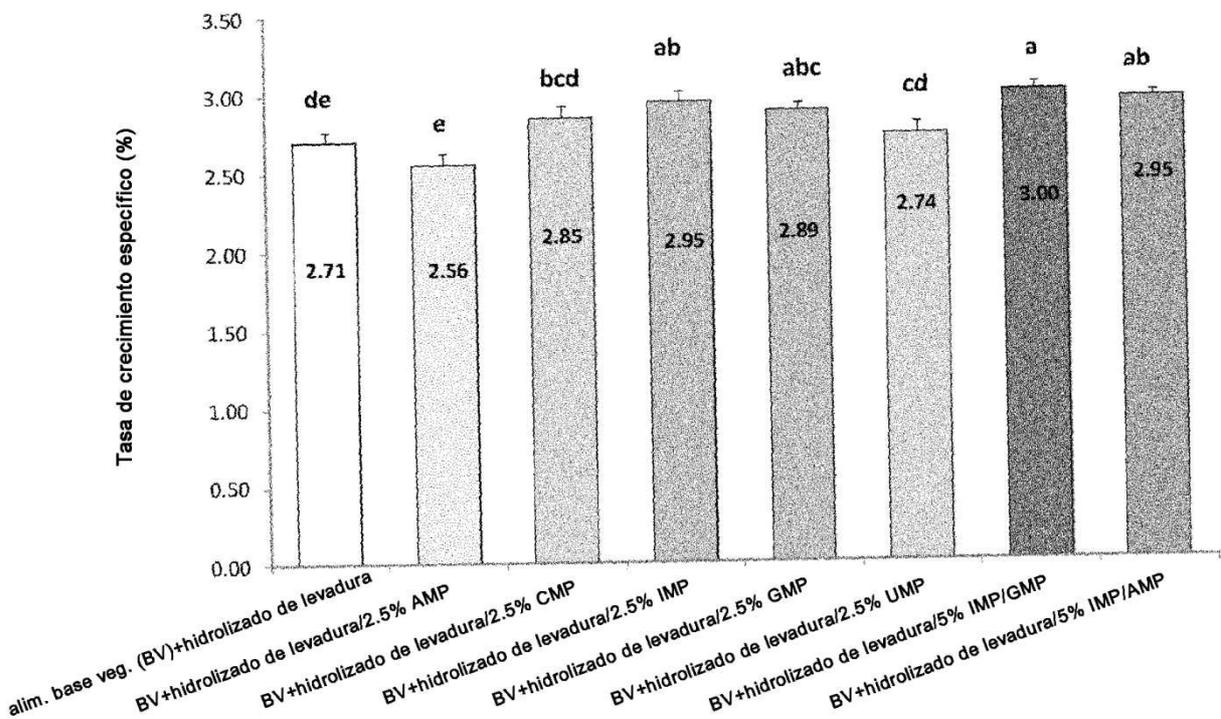


Fig. 10b

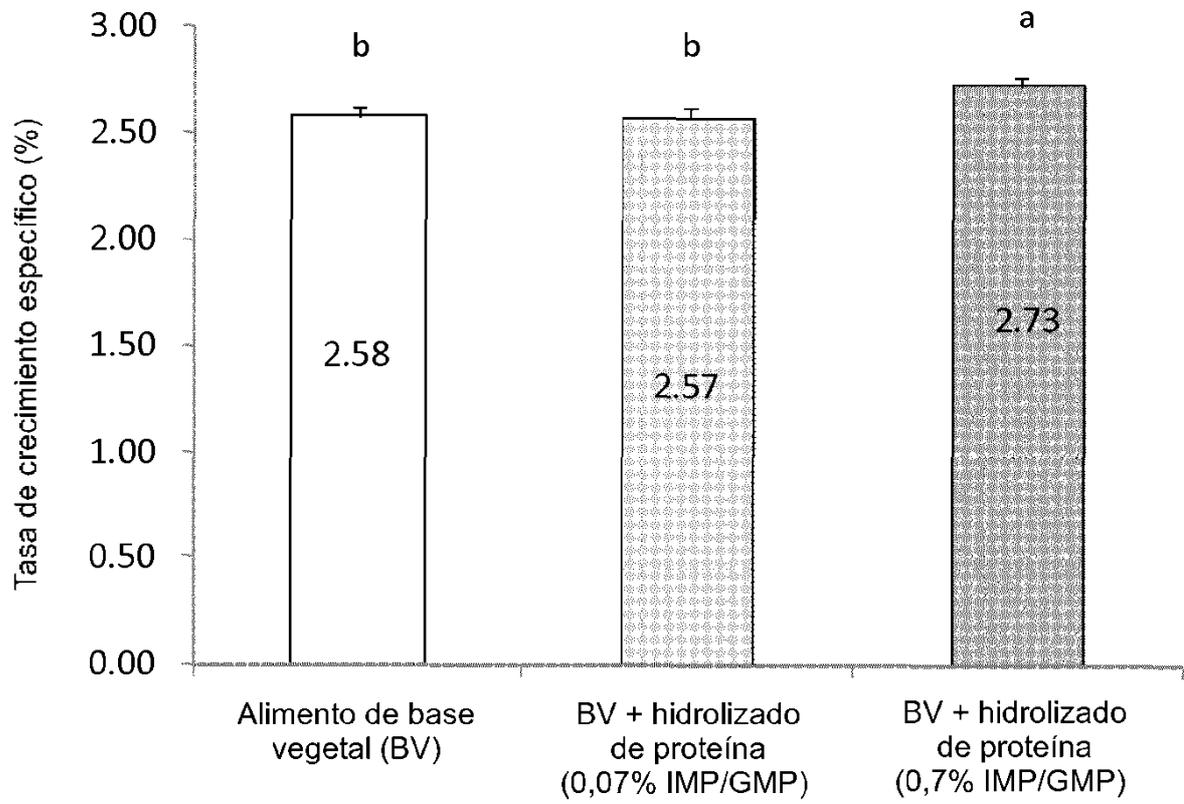


Fig. 11