

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 519**

51 Int. Cl.:

**A23J 1/04** (2006.01)  
**A23J 3/34** (2006.01)  
**A23K 40/20** (2006.01)  
**A23K 20/147** (2006.01)  
**A23K 50/80** (2006.01)  
**A23K 40/30** (2006.01)  
**A23K 10/22** (2006.01)  
**A23K 20/142** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2014 PCT/EP2014/051435**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO2014114767**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2014 E 14701382 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2948000**

54 Título: **Hidrolizados de proteínas de crustáceo para mantener y/o estimular la salud intestinal de peces de cultivo**

30 Prioridad:

**24.01.2013 EP 13305083**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FOURNIER, VINCENT**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 613 519 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

Hidrolizados de proteínas de crustáceo para mantener y/o estimular la salud intestinal de peces de cultivo.

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

Más particularmente, la invención se refiere a la utilización de uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos como ingrediente de pienso para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de peces en fase poslarvaria de cultivo.  
10

### Antecedentes de la invención

15 Los piscicultores y fabricantes que trabajan en el campo de la acuicultura se enfrentan a un problema importante basado en el hecho de que se espera que se reduzca la disponibilidad de materias primas marinas en los años venideros, a la vez que se expande progresivamente la acuicultura.

En particular, la disponibilidad en el mercado mundial de harinas y aceites de pescado, las cuales se han utilizado como fuente dominante de proteínas en los piensos secos para peces, se está reduciendo drásticamente y los precios de estas materias primas se están incrementando considerablemente. En consecuencia, la industria de la acuicultura, especialmente la industria de los piensos para peces, ha predicho durante varios años que se producirá una escasez de tanto harina de pescado como aceite de pescado en el futuro.  
20

Claramente el nivel nutricional de la harina de pescado sigue resultando crucial para conseguir un rendimiento de los piensos, afectando a tanto la palatabilidad de los mismos como a su utilización. De esta manera, durante los últimos 20 años, la industria de los piensos para peces se ha interesado crecientemente en alternativas satisfactorias a las harinas de pescado y los aceites de pescado para la utilización en la alimentación de peces de cultivo, dado que, año tras año, el nivel de harina de pescado en los piensos diseñados para especies de peces carnívoros tiende a reducirse y está próxima a alcanzar un umbral crítico para el crecimiento de los peces y la utilización del pienso.  
25  
30

Para los piensos para peces secos pueden utilizarse fuentes de proteínas animales alternativas. Por ejemplo, es conocida la utilización de materias primas de origen terrestre (por ejemplo harina de sangre, harina de huesos, harina de plumas y otros tipos de harina producidos a partir de otros residuos de matadero, por ejemplo harina de aves de corral), así como materias primas de origen vegetal (por ejemplo harina de soja, harina de trigo, harina de semilla de colza, harina de arroz y similares). Estas típicamente resultan más económicas y se encuentran más disponibles que las harinas de pescado y los aceites de pescado. Como resultado, ahora se proponen más comúnmente piensos de origen terrestre en las formulaciones de piensos para peces como alternativa a las harinas de pescado.  
35

Sin embargo, por otra parte, el equilibrado del perfil dietético de aminoácidos de las dietas ricas en plantas para cumplir los requisitos de aminoácidos de los peces no es suficientemente eficiente para conseguir rendimientos de peces y piensos para peces satisfactorios. Por otra parte, en algunas regiones geográficas, incluyendo Europa, existe una prohibición de utilizar materias primas de origen terrestre en la producción de piensos para animales y peces productores de piensos.  
40  
45

En dicho contexto de baja disponibilidad de harinas de pescado y volatilidad de los precios, resulta esencial encontrar soluciones para compensar el más bajo contenido de harinas de pescado de las actuales dietas para peces. Tal como se ha indicado anteriormente, las materias primas de origen vegetal con frecuencia se utilizan para sustituir las harinas de pescado en las fórmulas de los piensos para los peces y crustáceos de cultivo. Sin embargo, la introducción de proteínas vegetales en la dieta de los peces carnívoros es conocido que afecta negativamente a la calidad intestinal de los peces al causar daños en el epitelio intestinal (Krogdahl et al., 2003). Lo anterior resulta en diarrea y, por lo tanto, en una mala utilización de los nutrientes y en el debilitamiento de los peces, que se vuelven más susceptibles a patógenos. En el caso de que se utilicen dietas no equilibradas o dietas con bajo contenido de harinas de pescado, con frecuencia se observan peces muy delgados que rechazan el pienso y no crecen durante todo el ensayo.  
50  
55

De esta manera, existe una necesidad en la técnica de ingredientes para piensos para peces que presenten propiedades nutricionales altamente específicas con el fin de satisfacer requisitos para peces de cultivo y para superar los efectos adversos sobre la salud de los peces de las dietas que contienen materiales de bajo contenido en harinas de pescado y/o materiales vegetales.  
60

Los presentes inventores han planteado la hipótesis de que algunos hidrolizados de crustáceos particulares podrían satisfacer la necesidad de la técnica al incrementar el rendimiento de los piensos de bajo contenido en harinas de pescado mediante la mejora de la palatabilidad de los piensos y de las capacidades de absorción de nutrientes de los peces.  
65

Los hidrolizados de proteínas se reconocen en el campo de la nutrición animal como materias primas relevantes para mejorar los rendimientos de los piensos y animales. Los hidrolizados también están siendo reconocidos en la nutrición deportiva humana. El impacto positivo de la hidrólisis enzimática sobre la digestibilidad de las proteínas se ha demostrado desde hace algunas décadas. La predigestión de las materias primas proteínas por enzimas endógenos o exógenos es capaz de liberar péptidos altamente disponibles y aminoácidos libres que podrían pasar muy rápidamente la barrera intestinal a la circulación sistémica (Koopman et al., 2009). De esta manera, la hidrólisis enzimática limitará el riesgo de desnaturalización de las proteínas durante el procesamiento (secado) de las materias primas y mejorará la digestibilidad de las proteínas.

Varios estudios han investigado el impacto positivo de las proteínas hidrolizadas dietéticas sobre el crecimiento de varias especies de peces (carpas doradas, salmón atlántico, rodaballo, tilapia, pacu, lubina japonesa, lubina europea, etc.; ver Taheri et al., 2010, para referencias). En comparación con una materia prima no hidrolizada (por ejemplo harinas de pescado), los hidrolizados de pescado generalmente han mostrado un efecto beneficioso sobre el crecimiento y la utilización de los piensos debido a una palatabilidad y digestibilidad más elevadas.

La inclusión de hidrolizados de proteínas también se reconoce como una estrategia eficiente para mejorar la digestibilidad y valor nutricional de las dietas formuladas para peces en estado larvario (Kolkovski, 2008). Los hidrolizados pueden proporcionar compuestos de alta biodisponibilidad (en particular péptidos y aminoácidos libres) a las larvas, caracterizadas por un sistema digestivo inmaduro, y pueden mejorar el desarrollo del sistema digestivo (Cahu et al., 1999).

Sin embargo, las larvas presentan especificidades que las diferencian de los peces "poslarvarios" (es decir, peces que se encuentran en un estadio poslarvario del desarrollo/crecimiento), no sólo física sino también fisiológicamente. En particular, según Kendall et al. (1984), el estadio larvario (que cubre el periodo desde la eclosión hasta el desarrollo de radios de aleta completos y el inicio de la aparición de las escamas) se caracteriza por cambios de la forma corporal y cambios de la capacidad locomotora y de las técnicas de alimentación. Además, desde la eclosión, el estadio larvario se caracteriza por un intestino rudimentario, con una capacidad limitada de digestión de los macronutrientes, desarrollando un sistema digestivo maduro al alcanzar el estadio juvenil (Zambonino y Cahu, 2001). El estadio poslarvario se inicia tras el estadio juvenil, al completarse el número de radios de las aletas e iniciarse la aparición de las escamas, hasta (y comprendiendo) cuando el pez entra en la población adulta o alcanza la madurez sexual (Kendall et al., 1984). En este estadio los peces se caracterizan por la presencia de un sistema digestivo eficiente, representando el modo de digestión adulto (Zambonino y Cahu, 2001).

En la presente memoria se demuestra por primera vez un beneficio de hidrolizados particulares de proteínas de crustáceos para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de peces poslarvarios de cultivo, especialmente para la mejora del desarrollo del epitelio intestinal en dichos peces poslarvarios de cultivo.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un ingrediente para pienso preparado con uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos para la utilización en un procedimiento para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de los peces poslarvarios de cultivo.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Especificaciones del hidrolizado de proteínas de crustáceos (HID CRUS) y del hidrolizado de pescado blanco (HID pescado blanco) utilizados en el ensayo presentado. El contenido de proteínas en bruto, proteínas solubles y aminoácidos libres se expresa como % del hidrolizado. El perfil de pesos moleculares de péptidos se determina en % de proteínas solubles presentes en el hidrolizado.

Figura 2. Tasa de crecimiento específico (TCE) de lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 56 días. HID CRUS: hidrolizado de proteínas de crustáceos; HID de pescado blanco: hidrolizado de pescado blanco; FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado.

Figura 3. Índice de conversión alimentaria (ICA) en lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 56 días. HID CRUS: hidrolizado de proteínas de crustáceos; HID de pescado blanco: hidrolizado de pescado blanco; FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado.

Figura 4. Procedimiento para el cálculo de la relación diámetro interno (DI) / diámetro externo (DE) de la sección histológica del intestino medio.

Figura 5. Relación DI/DE de intestino medio muestreado en lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 56 días. GH: grado de hidrólisis; FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado.

Figura 5bis. Sección histológica del intestino medio de peces alimentados con dieta FM5 (A) y peces alimentados con FM5 + 5% de hidrolizados de proteínas de crustáceos (B).

5 Figura 6. Análisis comparativo de la expresión del gen beta-actina entre peces de los tratamientos de alimentación FM5 (=dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado), FM20 (=dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado) y FM5 + 5% de hidrolizado de proteínas de crustáceos. Los datos se refieren a valores de medias de 15 peces en cada tratamiento. El análisis comparativo de la cantidad de ARNm de act. de la diana (a lo largo de los tres segmentos intestinales) en términos de los valores  $2^{-\Delta CT}$  (eje Y) (\*\*P<0,01) (\*P<0,05; ANOVA a una vía). Pil\_ca: apéndice pilórico; int.: intestino proximal; dist.: intestino distal.

10 Figura 7. Calidad de las proteínas de las harinas de pescado, hidrolizados de proteínas de crustáceos (HID CRUS) y de los hidrolizados de pescado blanco (HID pescado blanco). El contenido de proteínas en bruto, proteínas solubles y aminoácidos libres se expresa como % del hidrolizado. Se determinó el perfil de pesos moleculares peptídicos en % de las proteínas solubles presentes en el hidrolizado.

15 Figura 8. Perfil de aminoácidos de las harinas de pescado, hidrolizados de proteínas de crustáceos (HID CRUS) y del hidrolizado de pescado blanco (HID pescado blanco) (% del producto).

20 Figura 9. Isocurvas de respuesta para la tasa de crecimiento específico (TCE) en lubina europea alimentada con dietas que incluyen hidrolizado de proteínas de crustáceos (HID CRUS) durante 47 días.

25 Figura 10. Isocurvas de respuesta para el índice de conversión para el índice de conversión alimentaria (ICA) en lubina europea alimentada con dietas que incluían hidrolizado de proteínas de crustáceos (HID CRUS) durante 47 días.

Figura 11. Isocurvas de respuesta para la tasa de crecimiento específico (TCE) en lubina europea alimentada con dietas que incluían hidrolizado de pescado blanco (HID de pescado blanco) durante 47 días.

30 Figura 12. Isocurvas de respuesta para el índice de conversión alimentaria (ICA) en lubina europea alimentada con dietas que incluían hidrolizado de pescado blanco (HID de pescado blanco) durante 47 días.

35 Figura 13. Tasa de crecimiento específico (TCE) de lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 45 días (C: recubrimiento; I: inclusión; Hid. Crust.: hidrolizado de proteínas de crustáceos; FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado).

40 Figura 14. Índice de conversión alimentaria (ICA) en lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 45 días (C: recubrimiento; I: inclusión; Hid. Crust.: hidrolizado de proteínas de crustáceos; FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado).

45 Figura 15. Proporción de peces muy delgados en lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 45 días (C: recubrimiento; I: inclusión; Hid. Crust.: hidrolizado de proteínas de crustáceos; FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado).

Figura 16. Supervivencia del falso fletán del Japón (*Paralichthys olivaceus*) alimentado con tratamiento dietéticos y después retado con *Streptococcus iniae* durante 60 días (Hid crust.: hidrolizado de proteínas de crustáceos).

50 Figura 17. Supervivencia de la dorada del Japón (*Pagrus major*) alimentada con tratamientos dietéticos y después retada con *Edwardsella tarda* durante 84 días (Hid. crust.: hidrolizado de proteínas de crustáceos).

55 Figura 18. Rendimiento del hidrolizado de diferentes orígenes (peces y crustáceos) en lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 18 días mediante la medición de la tasa de crecimiento específico (TCE) (FM5: dieta para peces que contenía 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contenía 20% de harinas de pescado).

60 Figura 19. Rendimiento del hidrolizado de diferentes orígenes (peces y crustáceos) aplicado mediante inclusión o recubrimiento superficial, en lubina europea alimentada con tratamientos dietéticos durante 57 días mediante la medición de la tasa de crecimiento específico (TCE) (FM5: dieta para peces que contiene 5% de harinas de pescado; FM20: dieta para peces que contiene 20% de harinas de pescado).

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

5 A menos que se indique específicamente lo contrario, los porcentajes se expresan en la presente memoria en peso.

Los porcentajes pueden expresarse en la presente memoria en peso de una referencia de producto en "peso seco". El experto en la materia apreciará que la expresión "en peso seco" se refiere a que se mide la concentración o porcentaje del ingrediente en una composición tras eliminar el agua libre o tras determinarla en peso de la composición tras restar cualquier humedad libre en la composición.

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

15 Tal como se utiliza a lo largo de la 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 pienso" incluye una pluralidad de dichos "procedimientos" o "piensos". De manera similar, los términos "comprende" y "comprendiendo" deben interpretarse de manera inclusiva. De manera similar, los términos "incluye", "incluyendo" y "o" deben interpretarse todos como inclusivos. Sin embargo, la totalidad de dichos términos debe considerarse como comprendiendo formas de realización exclusivas a las que también puede hacerse referencia utilizando términos tales como "consisten de".

20 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.

30 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos, términos de la técnica y acrónimos utilizados en la presente memoria presentan los significados entendidos comúnmente por el experto en la materia en el campo o campos de la invención, o en el campo o campos en los que se utiliza el término. Aunque pueden utilizarse en la práctica de la presente invención cualesquiera composiciones, procedimientos, artículos fabricados u otros medios o materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria, se indican en la presente memoria las composiciones, procedimientos, artículos fabricados u otros medios o materiales preferentes.

35 El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende comprender variaciones de  $\pm 15\%$ , 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.

40 Las expresiones "acuicultura", "piscicultura", "cultivo de peces" y "cría de peces" son sinónimas y se utilizan en la presente memoria 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 ubicación de la piscifactoría, los medios económicos del piscicultor, etc.

45 El término "corral" se utilizará posteriormente para referirse a cualquiera de entre un corral, un estanque, un tanque y una jaula.

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

55 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.

60 A título de ejemplo de especies de peces carnívoros puede citarse el salmón rosado (*Oncorhynchus gorbusha*), el salmón chum (*Oncorhynchus keta*), el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), el salmón masu (*Oncorhynchus masou*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), el salmón atlántico (*Salmo salar*), la trucha marina (*Salmo trutta*), la trucha común (*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 dumerilli*), "buri" (*Seriola quinqueradiata*), el jurel japonés (*Trachurus japonicas*), el besugo negro (*Acanthopagrus schlegelii*), el sargo (*Diplodus sargus*), la dorada japonesa (*Evynnis japonica*), la dorada del Japón (*Pagrus major*), el bocinegro (*Pagrus*

- 5 *pagrus*), el sargo dorado (*Rhabdosargus sarba*), la dorada (*Sparus aurata*), la lubina 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 fletán 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*).
- 10 A título de ejemplo 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.],
- 15 especies de bagre [*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*].
- 20 A título de ejemplo 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)).
- 25 Los términos "larvario", "larvas" y "larva" se refieren a un estadio recién eclosionado de desarrollo de pez que experimentará metamorfosis, presentando una apariencia marcadamente diferente de los alevines, adultos y maduros y que presentan capacidades digestivas y de absorción de los piensos limitadas.
- 30 De esta manera, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "poslarvario" se refiere a estadios de desarrollo en los que el pez presenta escamas, morfológicamente presenta la apariencia adulta y presenta capacidades digestivas y de absorción completas de los piensos. De esta manera, la expresión "peces poslarvarios" comprende alevines, peces adultos y peces maduros. En la presente memoria, la expresión "peces poslarvarios" se refiere a cualquier pez seleccionado de entre alevines, peces adultos y peces maduros. Las mezclas de peces
- 35 seleccionados de entre alevines, peces adultos y peces maduros también se encuentran comprendidas en la expresión "peces poslarvarios".
- 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "marisco" o "crustáceos" se refiere a una gran familia de artrópodos marinos que incluye elementos comunes como cangrejos, langostas, gambas, kril y percebes. Preferentemente, en el contexto de la presente invención, el término "crustáceos" se refiere a las familias siguientes: *Penaecidae*, *Palaemonidae*, *Pandalidae*, *Galatheididae*, *Euphausiidae*, *Mysidae* y *Nephropidae*. Los crustáceos preferentes son las gambas y el kril.
- 45 La expresión "materiales proteicos de crustáceos" pretende referirse en la presente memoria a crustáceos completos y/o partes o productos secundarios de los mismos, siendo estas partes o productos secundarios de los mismos uno o más de entre, entre otros, cabeza, vísceras, carne, conchas y patas delanteras.
- 50 El término "pienso" o "dieta" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a uno o más productos o composiciones que están destinadas a la ingestión por peces y que proporcionan por lo menos un nutriente a los peces. La composición del pienso depende del grupo de peces que será alimentado con dicho pienso. Un pienso para peces carnívoros es diferente de un pienso para peces omnívoros y de un pienso para peces herbívoros, siendo también los dos últimos piensos diferentes entre sí. Típicamente, los peces, especialmente los peces carnívoros, requieren proteínas/péptidos/aminoácidos, grasas, minerales y vitaminas para crecer y para encontrarse en un buen estado de salud.
- 55 El término "pienso" o "dieta" según la presente invención excluye los "cebos", los cuales sólo se utilizan para atraer a los peces.
- 60 El "pienso" para peces o "dieta" para peces está compuesto típicamente de una o más fuentes de proteína, tales como, aunque sin limitación, proteínas marinas, incluyendo, entre otras, harina de pescado y harina de kril, proteínas vegetales (por ejemplo harina de soja, harina de semilla de colza, gluten de trigo, gluten de maíz, harina de altramuz, harina de guisante, harina de semilla de girasol y harina de arroz) y productos secundarios de matadero, tales como harina de sangre, harina de huesos, harina de plumas y harina de aves de corral. Los "piensos" para peces o "dieta" para peces contienen además grasas, tales como aceite de pescado y/o aceites de origen vegetal (por ejemplo
- 65 aceite de semilla de colza y aceite de soja) y/o grasas de origen terrestre (en particular, grasa de aves de corral) como fuentes energéticas. Puede contener 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, harina de judías o de tapioca, para proporcionar al pienso la resistencia y estabilidad de la forma deseadas. Habitualmente, el "pienso" para peces o "dieta" para peces contiene además minerales y vitaminas para cuidar del buen crecimiento y buena salud de los peces. Los piensos pueden contener además ingredientes adicionales, tales como pigmentos.

5 De esta manera, un "pienso" para peces o "dieta" para peces típico es un pienso compuesto en el que las cantidades relativas de proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y cualesquiera otros ingredientes se calculan para estar adaptadas óptimamente a las necesidades nutricionales del grupo de peces y de las especies de peces basándose en la edad de los peces, el procedimiento de cría y las condiciones ambientales. Es habitual que la alimentación se lleve a cabo con un único tipo de pienso cada vez y de manera que cada trozo de pienso resulte

10 nutricionalmente adecuado. De esta manera, el "pienso" para peces o "dieta" para peces común presenta una composición aproximada de 25% a 60% en peso de proteínas, 5% a 40% en peso de lípidos y 3% a 15% en peso de humedad.

15 Como pienso compuesto, el "pienso" para peces o "dieta" para peces típico contiene más de un ingrediente de pienso. De esta manera, el "pienso" para peces o "dieta" para peces tal como se da a conocer en la presente memoria contiene ventajosamente por lo menos un ingrediente de pienso de la presente invención y por lo menos otro ingrediente de pienso para peces convencional, tal como harina de pescado, harina vegetal y similares.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "pienso para juveniles" se formula para satisfacer los requisitos nutricionales de peces con un peso corporal comprendido entre aproximadamente 0,5 g y aproximadamente 50 g.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "pienso de crecimiento" se formula para satisfacer los requisitos nutricionales de los peces con un peso corporal comprendido entre aproximadamente 50 g y el peso del pez comercializable.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "pienso para reproductores" se formula para satisfacer los requisitos nutricionales de peces maduros/adultos que se utilizan comúnmente como genitores en acuicultura.

30 Originalmente, en la cría de peces carnívoros, se utilizaron peces enteros o pescado molido para cubrir los requisitos nutricionales de los peces de cría. El pescado molido mezclado con materias primas secas de diversos tipos, tales como harina de pescado y almidón, se denominó "pienso blando". Gradualmente, la piscicultura se ha industrializado y los piensos blandos han sido sustituidos por piensos secos del tipo pienso comprimido. El pienso comprimido ha sido sustituido gradualmente por el pienso seco de tipo pienso extrudido. Actualmente el pienso extrudido es prácticamente universal en la piscicultura de un gran número de especies de peces, tales como varias especies de

35 salmónidos, bacalao, lubina 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 de transversal. Lo anterior se lleva a cabo tirando o forzando un material conformable a través de una

40 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 preacondicionador, en donde el calentamiento tiene lugar mediante la adición de vapor a la mezcla. También puede añadirse vapor y agua a la

45 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 extrudido 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 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

50 presente memoria a la cocción por extrusión mediante un extrusor de un solo husillo o un extrusor de doble husillo. La expresión "pienso extrudido" se refiere al pienso producido mediante cocción por extrusión mediante un extrusor de un solo husillo o un extrusor de doble husillo. El pienso para peces extrudido típicamente se presenta en forma de gránulos ("pellets"). La mayor parte, si no la totalidad, del "pienso extrudido" disponible actualmente contiene menos de aproximadamente 10% de agua y presenta un recubrimiento de aceite.

60 La expresión "pienso comprimido" se refiere a un pienso producido mediante una prensa de pienso. 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 pienso 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 "pienso comprimido" normalmente contiene menos de aproximadamente 10% de agua tras el

65

prensado y cualquier recubrimiento con aceite. No resulta necesario secar un pienso comprimido. El pienso se enfría antes del envasado opcional.

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

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ingrediente de pienso" se refiere a un componente del pienso para peces o un componente de la dieta para peces. Puede ser un componente de un pienso para peces compuesto, completo y formulado, tal como un componente de un pienso extrudido, en particular de un gránulo. Alternativamente, puede ser un complemento de pienso diferente proporcionado a los peces de cultivo además del  
10 pienso formulado. En este tipo de forma de realización, el ingrediente de pienso y el pienso formulado son dos componentes separados que constituyen un pienso para peces completo y pueden proporcionarse a los peces simultánea o separadamente.

15 Un "ingrediente de pienso" puede encontrarse bajo diversas formas. Puede ser un líquido (por ejemplo que presenta entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30% de materia seca) o un concentrado líquido (por ejemplo que presenta entre aproximadamente 30% y aproximadamente 60% de materia seca) o una pasta (por ejemplo que presenta entre aproximadamente 60% y aproximadamente 85% de materia seca) o unos polvos (por ejemplo que presenta entre aproximadamente 85% y aproximadamente 100% de materia seca).

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "ingrediente de pienso compuesto" es una mezcla o una combinación o una asociación o una composición de ingredientes de piensos para peces que incluye por lo menos un ingrediente de pienso de la presente invención (que está constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos) y otro u otros ingredientes de piensos diferentes de los hidrolizados de proteínas de crustáceos, tales como ingredientes de piensos para peces convencionales (por ejemplo harina de pescado, harina vegetal y similares).

25 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 pienso para peces presentan una forma cilíndrica. Debido a que los peces se crían utilizando un producto de pienso para peces, desde alevines (con un peso de aproximadamente 0,5 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. El tamaño y/o la forma de los gránulos en efecto deben adaptarse al tamaño 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 piensos para peces existentes. Además, en la cría de la lubina, 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.

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

45 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 de los mismos y los racematos.

50 La expresión "aminoácidos libres" pretende referirse en la presente memoria a aminoácidos que se encuentran presentes individualmente como ingredientes no unidos en un producto o en una composición. Los aminoácidos libres no forman parte o no se encuentran contenidos en péptidos o proteínas. En el caso de que se encuentren contenidos en un ingrediente de pienso, no se espera que los aminoácidos libres reaccionen significativamente in situ con cualquier otro ingrediente que puede encontrarse presente en el ingrediente de pienso. De esta manera, se encuentran comprendidos sin modificación en el ingrediente de pienso.

55 El término "péptido" pretende referirse en la presente memoria a una cadena corta de aminoácidos. En particular, un "péptido" en el presente contexto se caracteriza por su peso molecular (PM), expresado en daltons (Da).

60 La expresión "proteínas totales" o "proteínas en bruto" pretende referirse en la presente memoria a la cantidad global de proteínas presente en un producto dado.

La expresión "proteínas solubles" en la presente memoria pretende referirse a la fracción de proteína de un producto dado que es capaz de ser disuelta en agua. De hecho, "proteínas solubles" se refiere principalmente a péptidos y aminoácidos libres.

65 El término "proteasas" se refiere a enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos entre sí en una cadena polipeptídica.



El término "endoproteasa" o "endopeptidasa" se refiere a cualquier enzima proteolítico que cataliza el corte de enlaces internos en un péptido o en una proteína.

5 El término "exoproteasa" o "exopectidasa" se refiere a cualquier enzima proteolítico que cataliza el corte de los enlaces peptídicos externos en un péptido o en una proteína.

La expresión "proteasas endógenas" se refiere a proteasas que se originan o son producidas dentro de un organismo, tejido o célula.

10 La expresión "proteasas exógenas" se refiere a proteasas que no se encuentran presentes naturalmente en un organismo, tejido o célula y que son añadidas a dicho organismo, tejido o célula con el fin de hidrolizar proteínas.

15 En el campo de la presente invención, al experto en la materia le resultarán familiares los "parámetros zootécnicos", entre ellos la tasa de supervivencia, la ingesta de pienso o el consumo de pienso (Ac), la tasa de crecimiento específico (TCE) y el índice de conversión de pienso (ICA). Estos parámetros se utilizan comúnmente en acuicultura para evaluar, por ejemplo, cómo/qué comen o prefieren comer los peces, cómo crecen los peces, cómo utilizan los peces el pienso ingerido, 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  
20 septiembre de 2001).

El parámetro "tasa de supervivencia" puede definirse como la relación entre el número final de peces (es decir, el número total de peces vivo que se encuentra finalmente contenido en el corral) y el número inicial de peces (es decir, el número total de peces que se encontraba contenido inicialmente en el corral).

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

30 El parámetro "consumo de pienso" o "ingesta de pienso" (Ac) se define como el peso de pienso realmente consumido por los peces en el corral durante un periodo de tiempo dado. Puede calcularse Ac utilizando la ecuación (1):

$$35 \quad Ac = As - An$$

en la que As es el peso seco del pienso total que se ha repartido en exceso en el corral durante dicho periodo de tiempo y An es el peso seco del pienso no ingerido total que se recupera diariamente del corral durante dicho  
40 periodo de tiempo.

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

45 El parámetro "índice de conversión de pienso" (ICA) es un parámetro económico que indica el nivel de eficiencia del crecimiento de los peces a los que se proporciona el pienso. El crecimiento de los peces de hecho corresponde a la deposición de proteínas, grasas y agua en el músculo. De esta manera, el ICA refleja la "utilización del pienso" por los peces o la "eficiencia del pienso". El ICA varía entre las especies de pez y también con el tamaño de los peces. A título de ejemplo, en el salmón atlántico, el ICA típicamente puede ser de entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 2. El pienso para peces industrial en forma de pienso comprimido y pienso extrudido contiene  
50 cantidades reducidas de agua, típicamente de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%. El cuerpo de los peces presenta un contenido de agua más elevado. Por este motivo el ICA de diferentes piensos en teoría debería considerar el contenido de agua de los piensos ya que el agua no contribuye al crecimiento. Más exactamente, el ICA en teoría debería calcularse en unidades de materia seca. Sin embargo, debido a que el contenido de agua se encuentra dentro de un intervalo estrecho y ya que resulta complicado para el piscicultor calcular el ICA en materia seca, el ICA habitualmente se calcula con el pienso incluyendo el contenido de agua.

55 Debe indicarse que la determinación de los parámetros zootécnicos es importante en acuicultura, por lo menos 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 a nivel individual. Además, parte del pienso se pierde comúnmente debido a que los gránulos de pienso se rompen en el sistema de alimentación y los trozos rotos son excesivamente pequeños para ser ingeridos o son tan pequeños que se reconocen como polvo. Además, algunos gránulos de pienso no son ingeridos por los peces sino que simplemente sedimentan por la columna de columna. Además, parte del pienso se pierde debido a que los peces son alimentados hasta la saciedad, mientras que la alimentación continúa (lo que se conoce como "sobrealimentación" o alimentación "en exceso"). Alternativamente, puede producirse la infra-alimentación, en cuyo caso la ICA se incrementa debido a que  
60 una proporción más alta de los nutrientes del pienso (materias primas originados en peces, plantas o de origen  
65

terrestre, compuestos nitrogenados, grasas, carbohidratos y similares) será utilizada con fines metabólicos en lugar de ser utilizada para la deposición de músculo.

5 Los términos "estimular", "incrementar", "potenciar" y "mejorar" se utilizan en la presente memoria intercambiamente. Una función o actividad o efecto biológico o técnico de interés resulta "estimulado" en el caso de que sea mejor/más elevado en un grupo de peces sometido a ensayo en comparación con un grupo de peces estándar. A título de ejemplo, la salud intestinal ha sido estimulada en el caso de que la salud intestinal de un grupo de peces sometido a ensayo alimentado con una dieta completa preparada a partir del ingrediente de pienso de la presente invención y de un pienso convencional de bajo contenido en harinas de pescado (por ejemplo con un contenido de harinas de pescado de aproximadamente 5% en peso) es mejor/más elevada que la salud intestinal de un grupo de peces estándar alimentado con únicamente dicho pienso convencional de bajo contenido de harinas de pescado.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "un grupo de peces sometido a ensayo" es un grupo de peces con una dieta completa preparada a partir del ingrediente de pienso de la presente invención y de un pienso convencional con un bajo contenido de harinas de pescado (por ejemplo que presenta un contenido de harinas de pescado de aproximadamente 5% en peso). "Un grupo de peces estándar" es un grupo de peces alimentados con únicamente un pienso convencional de bajo contenido en harinas de pescado (por ejemplo que presenta un contenido de harinas de pescado de aproximadamente 5% en peso). "Un grupo de peces de control" es un grupo de peces alimentados con únicamente un pienso convencional con elevado contenido de harinas de pescado (por ejemplo que presenta un contenido de harinas de pescado de aproximadamente 20% en peso).

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "vísceras" e "intestino" son sinónimos.

25 La expresión "asimilación de nutrientes" se refiere en la presente memoria a la absorción o metabolización por el organismo del pez de sustancias dietéticas que resultan necesarias para los peces para crecer y para encontrarse en un buen estado de salud (en particular proteínas/péptidos/aminoácidos, grasas, minerales y vitaminas).

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "resistencia a patógenos" se refiere a que los peces de cultivo no son susceptibles a infecciones o enfermedades causadas por microbios, incluyendo virus, bacterias, hongos, mohos y parásitos. En particular, los peces de cultivo no sufren de enteritis.

35 En referencia a un kit, la expresión "único envase" se refiere a que los componentes de dicho kit están físicamente asociados con uno o más envases y se consideran una unidad de fabricación, distribución, comercialización o utilización. Entre los envases se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, bolsas, cajas, paquetes, botellas, estuches, paquetes de cualquier tipo o diseño o material, componentes embalados, retractilados, grapados o de otro modo fijos, o combinaciones de los mismos. Un solo envase puede estar constituido por envases de componentes individuales asociados físicamente de manera que se considera que forman una unidad de fabricación, distribución, comercialización o utilización.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "medios para comunica información o instrucciones" es un componente del kit bajo 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, visualización gráfica que contiene información, etc. Los medios de comunicación pueden ser un sitio de Internet visualizado, un folleto, una etiqueta de producto, un impreso en el paquete, un anuncio, un mensaje visual, etc.

50 El término "recubrimiento" o "recubrimiento externo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una deposición tópica de un producto o de una composición sobre la superficie de un pienso para peces, tal como mediante pulverización, espolvoreo y similares.

55 La "inclusión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la adición de un producto o de una composición internamente en una preparación alimentaria para peces, mediante la mezcla del mismo con la preparación alimentaria para peces, antes de etapas de procesamiento adicionales para la obtención del pienso para peces final.

60 El término "palatabilidad" se refiere a una preferencia de un pez por un pienso y no por otro. La palatabilidad se refiere a la voluntad global de un pez de ingerir un determinado pienso. Ventajosamente, aunque no necesariamente, la palatabilidad se refiere adicionalmente a la capacidad del pienso ingerido de satisfacer al pez. En todo caso en que un pez muestre una preferencia, por ejemplo por uno de entre dos o más piensos, el pienso preferido es más "agradable al paladar" y presenta una "palatabilidad incrementada". La palatabilidad de un aliento en comparación con otro u otros piensos puede determinarse, por ejemplo, sometiendo a ensayo el consumo de los piensos por el pez. Dicha preferencia puede surgir a partir de cualquiera de los sentidos del pez, aunque típicamente se refiere, entre otros, al sabor, olor, aroma, gusto, textura y/o sensación en boca.

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

**Descripción de algunas formas de realización de la invención**

La presente invención en la presente memoria proporciona un ingrediente de pienso para peces preparado a partir de hidrolizados de proteínas de crustáceos específicos que se demuestra que (i) mantienen y/o estimulan la salud intestinal de los peces poslarvarios, e (ii) estimulan el atractivo o la palatabilidad del pienso.

De esta manera, la presente invención se refiere a un ingrediente de pienso para peces constituido de uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos para la utilización en un procedimiento para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de peces poslarvarios de cultivo.

Preferentemente, dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos comprenden:

- aminoácidos libres en una cantidad de entre 10% y 60% en peso y
- una cantidad de proteínas solubles de entre 70% y 100% respecto al peso de proteínas total de dichos hidrolizados, en el que dichas proteínas solubles presentan un perfil de distribución del peso molecular de los péptidos tal como se indica en la tabla 1, posteriormente.

Tabla 1

Peso molecular de los péptidos (PM en Da)	Cantidad en % de proteínas solubles en los hidrolizados de proteínas de crustáceos
PM < 500	50 < % ≤ 100
500 < PM < 1.000	0 ≤ % < 20
1.000 < PM < 5.000	0 ≤ % < 20
5.000 < PM < 10.000	0 ≤ % < 5
PM > 10.000	0 ≤ % < 5

Todavía preferentemente, dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos comprenden:

- aminoácidos libres en una cantidad de entre 12% y 58% en peso, y
- una cantidad de proteínas solubles de entre 80% y 100% respecto al peso de proteínas total de dichos hidrolizados, en el que dichas proteínas solubles presentan un perfil de distribución de pesos moleculares de los péptidos tal como se indica en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Peso molecular de los péptidos (PM en Da)	Cantidad en % de proteínas solubles en los hidrolizados de proteínas de crustáceos
PM < 500	57 < % ≤ 100
500 < PM < 1.000	0 ≤ % < 18
1.000 < PM < 5.000	0 ≤ % < 17
5.000 < PM < 10.000	0 ≤ % < 4
PM > 10.000	0 ≤ % < 4

En particular, dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos se seleccionan de entre hidrolizados de proteínas de las familias de crustáceos siguientes: *Penaeidae*, *Palaemonidae*, *Pandalidae*, *Galatheididae*, *Euphausiidae*, *Mysidae* y *Nephropidae*. Todavía en particular, dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos se seleccionan de entre hidrolizados de proteínas de gambas y kril.

Pueden obtenerse hidrolizados de proteínas mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, puede conseguirse la hidrólisis de proteínas mediante uno o más medios físicos (por ejemplo calor y/o corte), medios químicos (utilizando ácidos o bases), medios enzimáticos (utilizando enzimas endógenos, obteniendo de esta manera autolisados o ensilados, y/o enzimas exógenos). Las formas de realización ventajosas de hidrólisis de las proteínas para producir hidrolizados de interés en el contexto de la presente invención se ilustran en los ejemplos, posteriormente.

Tal como se ha mencionado en las definiciones, anteriormente, el ingrediente de pienso para peces constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos puede ser un líquido, un concentrado líquido, una pasta o unos polvos. Bajo estas circunstancias, los ejemplos de composiciones proximales (o analíticas) del ingrediente de pienso pueden ser tal como se indica en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3

Forma del hidrolizado	Materia seca (%)	Proteínas (%)	Grasas (%)	Ceniza (%)
Líquida	10-30%	8-20%	1-6%	1-10%
Concentrado	30-60%	8-50%	1-15%	1-20%
Pasta	60-88%	20-80%	1-30%	1-30%
Polvos	>88%	50-90%	1-35%	1-35%

5 Preferentemente, dicho pez poslarvario de cultivo es un pez poslarvario carnívoro. Un pez carnívoro particularmente preferente es la lubina.

En particular, la salud intestinal se mantiene y/o se estimula en dichos peces poslarvarios de cultivo mejorando el desarrollo del epitelio intestinal.

10 Todavía en particular, la salud intestinal se mantiene y/o se estimula en dichos peces poslarvarios de cultivo potenciando la asimilación de nutrientes por parte de dichos peces poslarvarios de cultivo.

15 Todavía en particular, la salud intestinal se mantiene y/o se estimula en dichos peces poslarvarios de cultivo mediante el incremento de la resistencia de dichos peces poslarvarios de cultivo frente a patógenos.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de los peces poslarvarios de cultivo, que comprende:

- 20 - alimentar dichos peces poslarvarios con un ingrediente de pienso constituido de uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos.

25 Se describe además en la presente memoria la utilización de uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos para la preparación de un ingrediente de pienso para peces destinado a la utilización en un procedimiento para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de peces poslarvarios de cultivo.

Todas las formas de realización preferidas, ventajosas o particulares indicadas anteriormente en relación al ingrediente de pienso según la presente invención, se aplican también a las demás partes de la presente exposición.

30 Se describe además en la presente memoria un ingrediente de pienso para la alimentación de peces poslarvarios de cultivo constituido de uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos tal como se ha indicado anteriormente.

35 Ventajosamente, los inventores han demostrado que dicho ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos presenta un efecto de potenciación de la palatabilidad al utilizarlo en pienso para peces (datos no mostrados).

La presente exposición se refiere además a un procedimiento para la preparación de un ingrediente de pienso tal como se ha mencionado anteriormente, que comprende:

- 40 a) proporcionar uno o más materiales proteicos de crustáceos,
- b) hidrolizar dichos materiales,
- c) recuperar hidrolizados de proteínas de crustáceos, que comprenden:
  - 45 - aminoácidos libres en una cantidad de entre 10% y 60% en peso, y
  - una cantidad de proteínas solubles de entre 70% y 100% respecto al peso de proteínas total de dichos hidrolizados, en el que dichas proteínas solubles presentan un perfil de distribución de pesos moleculares de péptidos tal como se indica en la tabla 1, anteriormente,

y

- d) obtener dicho ingrediente de pienso constituido por uno o más de dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos.

55 En particular, dicho procedimiento comprende:

- a) proporcionar uno o más materiales proteicos de crustáceos,

b) hidrolizar dichos materiales,

c) recuperar hidrolizados de proteínas de crustáceos, que comprenden:

- 5
- aminoácidos libres en una cantidad de entre 12% y 58% en peso, y
  - una cantidad de proteínas solubles de entre 80% y 100% respecto al peso de proteínas total de dichos hidrolizados, en el que dichas proteínas solubles presentan un perfil de distribución de pesos moleculares de los péptidos tal como se indica en la tabla 2, anteriormente,

10 y

d) obtener dicho ingrediente de pienso constituido por uno o más de dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos.

15 En formas de realización particulares, dicho procedimiento comprende además una o más etapas intermedias entre las etapas b) y d), anteriormente, tal como:

- 20 e) tratar térmicamente la mezcla resultante de la etapa b) o c), y/o
- f) estabilizar adicionalmente la composición resultante de la etapa b) o c) mediante, por ejemplo, acidificación, adición de conservantes y similares, y/o
- 25 g) opcionalmente, secar la composición obtenida de la etapa b) o c).

En una forma de realización todavía particular, pueden mezclarse entre sí dos o más hidrolizados de proteínas de crustáceos con el fin de obtener un hidrolizado de proteínas de crustáceos final para la utilización como ingrediente de pienso en un pienso para peces. En el caso de que se lleve a cabo una etapa de secado g), dichos dos o más hidrolizados de proteínas de crustáceos pueden mezclarse antes de dicha etapa g).

30 En otra forma de realización todavía particular, el hidrolizado o hidrolizados de proteínas de crustáceos pueden mezclarse con una harina de pescado o con una harina vegetal, de manera que se obtiene un ingrediente de pienso para peces compuesto. De esta manera, el perfil de distribución de los pesos moleculares de los péptidos del ingrediente de pienso para peces compuesto resultante puede ser diferente del indicado anteriormente para los hidrolizados de proteínas de crustáceos.

35 Se indica adicionalmente en la presente memoria un ingrediente de pienso para peces compuesto para la alimentación de peces poslarvarios de cultivo que comprende por lo menos un ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos tal como se ha indicado anteriormente.

40 Dicho ingrediente de pienso para peces compuesto puede comprender además, de esta manera, cualesquiera ingredientes de piensos para peces convencionales diferentes de los hidrolizados de proteínas de crustáceos, tales como harina de pescado, harina vegetal y similares.

45 De esta manera, dicho ingrediente de pienso para peces compuesto puede obtenerse según la práctica convencional de la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse mediante por lo menos:

- 50
- la provisión de por lo menos un ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos (que pueden prepararse utilizando el procedimiento dado a conocer anteriormente), y
  - la mezcla con uno o más ingredientes de piensos convencionales para peces diferentes de los hidrolizados de proteínas de crustáceos, tales como harina de pescado, harina vegetal y similares.

55 En la presente memoria se describe además un pienso para peces para la alimentación de peces poslarvarios de cultivo, que comprende:

- por lo menos un ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteína de crustáceos, y/o
- por lo menos un ingrediente de pienso para peces compuesto, tal como se ha indicado anteriormente.

60 Ventajosamente, dicho pienso para peces comprende una cantidad apropiada de dicho ingrediente o ingredientes de piensos constituidos por hidrolizados de proteínas de crustáceos, en el que dicha cantidad apropiada depende del tipo de pienso. En particular:

- 65
- para juveniles, dicha cantidad apropiada de ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos está comprendida entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 15%, preferentemente entre

aproximadamente 1% y aproximadamente 10% (% expresado en peso del pienso en materia seca),

- 5 - para la alimentación de crecimiento, dicha cantidad apropiada de ingrediente de pienso constituido por hidrolizados de proteínas de crustáceos está comprendida entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 8%, preferentemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% (% expresado en peso del pienso en materia seca),
- 10 - para la alimentación de reproductores, dicha cantidad apropiada de ingrediente de pienso constituido por hidrolizados de proteínas de crustáceos está comprendida entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 8%, preferentemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% (% expresado en peso del pienso en materia seca).

15 Dicho pienso para peces puede comprender, de esta manera, cualesquiera ingredientes de piensos para peces, tales como harina de pescado, harina vegetal y similares.

De esta manera, dicho pienso para peces puede obtenerse según la puesta en práctica convencional de la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse mediante por lo menos:

- 20 - la provisión de por lo menos un ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos (que pueden prepararse utilizando el procedimiento dado a conocer anteriormente) y/o por lo menos un ingrediente de pienso para peces compuesto, y
- 25 - la mezcla con uno o más ingredientes de piensos para peces convencionales, tales como harina de pescado, harina vegetal y similares.

25 En particular, uno o más ingredientes de pienso para pescado y/o uno o más ingredientes de pienso para peces compuestos tal como se indica en la presente memoria pueden aplicarse a un pienso para peces bajo la forma de gránulos mediante inclusión y/o mediante recubrimiento. En otras palabras, el ingrediente o ingredientes de pienso para peces y/o el ingrediente o ingredientes de pienso compuestos para peces se incluyen en los gránulos de aliento para peces o los gránulos se recubren con uno o más ingredientes de pienso para peces y/o con uno o más ingredientes de pienso compuestos para peces.

30 Se da a conocer además en la presente memoria un procedimiento para alimentar peces poslarvarios de cultivo, que comprende:

- 35 - alimentar dichos peces poslarvarios con un ingrediente de pienso o un ingrediente de pienso compuesto o un pienso para peces tal como se ha indicado anteriormente.

40 Sin embargo, se da a conocer en la presente memoria un kit para la utilización en un procedimiento para el mantenimiento y/o la estimulación de la salud intestinal de peces poslarvarios de cultivo, que comprende, en uno o más envases en un sólo paquete:

- 45 a) por lo menos un ingrediente de pienso constituido de hidrolizados de proteínas de crustáceos tal como se ha indicado anteriormente, y/o
- 45 b) por lo menos un ingrediente de pienso compuesto tal como se ha indicado anteriormente, y/o
- 50 c) por lo menos un pienso para peces tal como se ha indicado anteriormente.

Opcionalmente, dicho kit comprende además uno o más de:

- 55 - por lo menos un ingrediente de pienso convencional para peces diferente de los hidrolizados de proteínas de crustáceos, tal como harina de pescado, harina vegetal y similares, y/o
- 55 - un medio para comunicar información o instrucciones al usuario para la utilización apropiada de los componentes del kit.

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

## 60 Ejemplos

### 1. Descripción del hidrolizado de proteínas de crustáceos

#### 65 1.1 Origen de las materias primas

Las materias primas pueden ser animales enteros o partes de animal de crustáceos salvajes o domésticos.

Por ejemplo, pueden utilizarse animales de la familia *Euphausiidae*: kril (*Euphausia superb*), de la familia *Penaeidae*: gamba blanca (*Penaeus vannamei*), gamba tigre (*Penaeus monodon*), gamba azul (*Litopenaeus stylirostris*), de la familia *Calanidae* (*Calanus finmarchicus*), de la familia *Pandalidae* (*Pandalus borealis*) y similares.

5

### 1.2 Procesamiento de materia prima para obtener hidrolizados de proteínas de crustáceos

Preprocedimiento de hidrólisis:

- 10 o Adición de agua: 0% a 50%
- o Trituración (3 a 30 mm)
- 15 o Calentamiento hasta la temperatura configurada de la etapa de hidrólisis (ver posteriormente)

Parámetros del procedimiento de hidrólisis:

- 20 o Se recomienda llevar a cabo el procedimiento de hidrólisis en reactor (por lotes) horizontal o vertical cerrado con el fin de controlar la reacción y obtener un hidrolizado estandarizado lote por lote.
- o Los enzimas son proteasas exógenas o endógenas que pueden ser exopeptidasas o endopeptidasas o mezclas de ambas.
- 25 o Nivel de enzima, al añadir enzimas exógenos: 1% a 5% respecto a la proteína en bruto de las materias primas.
- o Temperatura de la hidrólisis: según las especificaciones del enzima, aunque habitualmente de entre 40°C y 60°C.
- 30 o Tiempo de hidrólisis: entre 15 min. y 120 min. desde que se alcanza el valor configurado de temperatura de hidrólisis.

Posprocedimiento de hidrólisis:

- 35 o Inactivación del enzima: según las especificaciones del enzima, aunque habitualmente de por lo menos 80°C durante 15 min.
- o Los hidrolizados pueden desgrasarse en caso necesario mediante restricciones del procedimiento (tal como el secado).
- 40 o Los hidrolizados pueden estabilizarse como producto acabado líquido o concentrarse o secarse.

### 1.3 Especificaciones del hidrolizado

45 Composición proximal (o analítica):

Los hidrolizados obtenidos de esta manera pueden ser un líquido (10% a 30% de materia seca), un concentrado líquido (30% a 60% de materia seca), una pasta (60% a 85% de materia seca) o unos polvos (>85% de materia seca).

50

Dependiendo de la forma de los hidrolizados (líquidos, concentrado, pasta o polvos), la composición proximal puede ser tal como se indica en la tabla 3, anteriormente.

Perfil de péptidos:

55

el perfil de péptidos de los hidrolizados obtenidos de esta manera resulta esencial para conseguir los efectos esperados del ingrediente de pienso.

60

El perfil de péptidos se expresa como porcentaje de proteínas solubles presentes en los hidrolizados de proteínas de crustáceos. Al final del procedimiento, dichas proteínas solubles pueden representar por lo menos 70% y preferentemente por lo menos 80% de las proteínas totales.

Al final del procedimiento de hidrólisis, el perfil de pesos moleculares de la proteína satisface lo indicado en las tablas 1 y 2, anteriormente.

65

## 2. Rendimiento de los hidrolizados de proteínas de crustáceos en peces poslarvarios

2.1 Efecto positivo de los hidrolizados dietéticos de proteínas de crustáceos sobre el desarrollo intestinal en peces poslarvarios

5 Se llevó a cabo un ensayo de crecimiento con lubinas con el fin de estudiar el efecto del hidrolizado dietético de proteínas de crustáceos seco ("HID. CRUS.") y de hidrolizado de pescado blanco ("HID. de pescado blanco") (figura 1) aplicado a una dieta de bajo contenido en harinas de pescado (5%, "FM5") y en comparación con un control positivo que contenía 20% de harinas de pescado ("FM20"). Se repartió el pienso en exceso con recolección diaria del pienso no consumido.

10 Con el fin de formular las dietas de bajo contenido en harina de pescado, que contenían 5% de harina de pescado ("FM5"), se sustituyó la harina de pescado de FM20 en FM5 por una mezcla de materias primas de origen vegetal. Se añadió metionina libre, lisina libre y una fuente de fósforo (fosfato monocalcico) para satisfacer los requisitos nutricionales de la lubina (Tabla 4, a continuación). Todos los demás ingredientes (por ejemplo vitaminas, minerales y similares) fueron los mismos en todas las formulaciones de pienso. Todos los piensos se formularon para ser isonitrogenados, isocalóricos e isolipídicos.

15 Tabla 4. Fórmula de pienso proporcionado a lubinas durante 56 días (composición proximal: proteína en bruto: 45%; grasa en bruto: 16%; ceniza: 6,5%; energía: 5,1 Kcal/Kg)

20

Ingredientes	FM5	FM5 + 5% HID. CRUST.	FM5 + 5% HID. PESC. BLANCO	FM20
Harina de pescado (calidad Super Prime)	5,00	5,00	5,00	20,00
HID. CRUST.	0,00	5,00	0,00	0,00
HID. PESC. BLANCO	0,00	0,00	5,00	0,00
Proteínas vegetales mixtas	74,25	68,40	67,95	60,70
Metionina libre	0,57	0,52	0,52	0,43
Lisina libre	1,60	1,46	1,45	1,08
Fosfato monocalcico	2,52	2,30	2,29	1,35
Aceite de pescado	13,70	13,45	13,13	12,78
Celulosa	0,00	1,50	2,30	1,30
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	2,36	2,36	2,36	2,36

25 Al final del ensayo de 56 días, se pesaron los peces para el cálculo de la tasa de crecimiento específico (TCE) y el índice de conversión de pienso (ICA); después se muestrearon nueve peces por tratamiento para el análisis histológico del intestino medio. Se calculó la relación diámetro interno/diámetro externo "DI/DE" de la sección histológica del intestino medio tal como se muestra en la figura 4.

30 Al final del ensayo, sólo la adición de hidrolizados de proteínas de crustáceos a la dieta para peces permitió mejorar significativamente el rendimiento de crecimiento de los peces alimentados con dieta FM5 hasta alcanzar el del control positivo (figura 2). De la misma manera, se mejoró ligeramente la eficiencia del pienso (figura 3).

35 La adición dietética de los hidrolizados de proteínas de crustáceos con niveles elevados de aminoácidos libres y péptidos pequeños ("hidrolizado alto DH") mejoró significativamente el desarrollo de las microvellosidades intestinales en comparación con los peces alimentados con FM5 (P=0,06) y con los peces alimentados con FM20 (P=0,07) (figura 5). La altura de las microvellosidades era más alta que en otros tratamientos, incluso que el control positivo ("FM20"), y la luz interna era muy pequeña, tal como se ilustra en la figura 5bis. Los hidrolizados de pescado blanco evaluados en el presente ensayo no presentaron este efecto significativo sobre el desarrollo intestinal.

40 El remodelaje del intestino de los peces alimentados con hidrolizados de proteínas de crustáceos se confirmó mediante el análisis de la expresión génica de la beta-actina (una proteína que participa en la estructura de la pared celular) en el intestino de los peces recolectados de otro ensayo realizado bajo las mismas condiciones del que se informa anteriormente. Se registró una sobreexpresión significativa del gen beta-actina en los peces alimentados con hidrolizados de proteínas de crustáceos, proporcionando otra prueba de un efecto positivo de dicho ingrediente sobre el desarrollo del epitelio intestinal (figura 6).

45 Con el fin de obtener los resultados ilustrados en la figura 6, se generaron unas curvas de amplificación a partir de datos de qPCR en tiempo real y se calculó el ciclo umbral ("CU") basándose en un umbral de la fluorescencia de 0,01, en donde se define CU como el ciclo umbral de la PCR en el que se detecta por primera vez un producto amplificado. A continuación, se determinó la ΔCU para cada muestra utilizando la ecuación ΔCU = CU gen diana - CU gen de referencia, a fin de calcular la expresión relativa de cada gen respecto al control de referencia interno. Lo



anterior se llevó a cabo mediante una modificación de la ecuación original para la expresión relativa =  $1 / (2\Delta CU)$  para las muestras tanto de control como de tratamiento (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

5 En consecuencia, se mejora la superficie de absorción de nutrientes, de manera que la eficiencia del pienso podría mejorar en el caso de que los hidrolizados de proteínas de crustáceos sean un ingrediente del pienso.

2.2 Efectos positivos de los hidrolizados de proteínas de crustáceos sobre la asimilación de nutrientes en la dieta en peces poslarvarios

10 Con el fin de estudiar el efecto positivo de los hidrolizados de proteínas de crustáceos dietéticos secos en la utilización del pienso, se diseñó un experimento factorial completo con lubinas alimentadas con una gradación de niveles de harina de pescado en la dieta e hidrolizados de proteínas de crustáceos en la dieta ("HID. CRUST.") o hidrolizados de pescado blanco ("HID. pescado blanco") que presentaban un perfil nutricional y calidad de las proteínas diferentes (figuras 7 y 8).

15 Se formularon veinte piensos que contenían 4 niveles de harina de pescado (0, 5, 10 y 20%) y para cada nivel de harina de pescado, se evaluaron 5 niveles de hidrolizados (0, 2,5, 5, 7,5 y 10%) (Tabla 5, a continuación).

20 Con el fin de formular dietas con bajo contenido de harina de pescado, se sustituyó la harina de pescado por una mezcla de materias primas de origen vegetal. Se añadió metionina libre, lisina libre y una fuente de fósforo (fosfato monocálcico) para satisfacer los requisitos nutricionales de la lubina (Tabla 6, posteriormente). Todos los demás ingredientes (por ejemplo vitaminas, minerales y similares) eran los mismos en todas las formulaciones de pienso. Todos los piensos se formularon para ser isonitrogenados, isocalóricos e isolipídicos.

25 Se repitieron cuatro tratamientos para mejorar la robustez del ensayo. Los piensos se proporcionaron a lubinas durante 47 días. Se racionó el pienso para evitar la influencia de la adición de hidrolizado sobre la palatabilidad del pienso y, por lo tanto, sobre los rendimientos de utilización del pienso.

30 Al final del ensayo, se pesaron los peces y a continuación se analizaron los resultados de crecimiento y utilización del pienso utilizando el procedimiento estadístico ANOVA (software Statgraphics) y se modelaron utilizando la ilustración de respuestas de isocurvas.

Tabla 5. Tratamientos dietéticos con los que alimentaron lubinas durante 47 días

Tratamientos	Nivel de harina de pescado (%)	Nivel de hidrolizado (%)
1		0
2		2,5
3	0	5
4		7,5
5		10
6		0
7		2,5
8	5	5
9		7,5
10		10
11		0
12		2,5
13	10	5
14		7,5
15		10
16		0
17		2,5
18	20	5
19		7,5
20		10
21	0	5
22	10	5
23	10	5
24	20	5

35

ES 2 613 519 T3

Tabla 6. Fórmula alimentaria utilizada para alimentar lubinas durante 47 días (composición proximal: proteína en bruto: 45%; grasa en bruto: 16%; ceniza: 6,5%; energía: 5,1 Kcal/Kg)

Harina de pescado en la dieta	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
HID. CRUST. en la dieta	0,0%	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%
Ingredientes					
Harina de pescado (calidad Super Prime)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
HID. CRUST.	0,00%	2,50%	5,00%	7,50%	10,00%
Proteínas vegetales mixtas	78,25%	76,18%	73,12%	70,51%	67,90%
Metionina libre	0,61%	0,60%	0,58%	0,56%	0,54%
Lisina libre	1,82%	1,77%	1,70%	1,64%	1,59%
Fosfato monocalcico	2,96%	2,89%	2,77%	2,68%	2,58%
Aceite de pescado	13,99%	13,70%	13,47%	13,26%	13,04%
Celulosa	0,00%	0,00%	1,00%	1,50%	2,00%
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%
Harina de pescado en la dieta	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
HID. CRUST. en la dieta	0,0%	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%
Ingredientes					
Harina de pescado (calidad Super Prime)	4,97%	4,97%	4,97%	4,97%	4,97%
HID. CRUST.	0,00%	2,50%	5,00%	7,50%	10,00%
Proteínas vegetales mixtas	74,29%	72,21%	69,15%	66,54%	63,93%
Metionina libre	0,57%	0,55%	0,53%	0,51%	0,49%
Lisina libre	1,60%	1,55%	1,48%	1,42%	1,36%
Fosfato monocalcico	2,52%	2,44%	2,33%	2,23%	2,14%
Aceite de pescado	13,70%	13,41%	13,18%	12,97%	12,76%
Celulosa	0,00%	0,00%	1,00%	1,50%	2,00%
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%
Harina de pescado en la dieta	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
HID. CRUST. en la dieta	0,0%	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%
Ingredientes					
Harina de pescado (calidad Super Prime)	10,01%	10,01%	10,01%	10,01%	10,01%
HID. CRUST.	0,00%	2,50%	5,00%	7,50%	10,00%
Proteínas vegetales mixtas	70,06%	67,54%	64,93%	61,87%	58,81%
Metionina libre	0,53%	0,51%	0,49%	0,47%	0,45%
Lisina libre	1,46%	1,40%	1,35%	1,28%	1,21%
Fosfato monocalcico	2,16%	2,07%	1,98%	1,86%	1,75%
Aceite de pescado	13,41%	13,10%	12,89%	12,65%	12,42%
Celulosa	0,00%	0,50%	1,00%	2,00%	3,00%
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%
Harina de pescado en la dieta	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%	20,0%
HID. CRUST. en la dieta	0,0%	2,5%	5,0%	7,5%	10,0%
Ingredientes					
Harina de pescado (calidad Super Prime)	20,02%	20,02%	20,02%	20,02%	20,02%
HID. CRUST.	0,00%	2,50%	5,00%	7,50%	10,00%
Proteínas vegetales mixtas	61,86%	58,88%	55,82%	52,76%	49,70%
Metionina libre	0,44%	0,42%	0,40%	0,37%	0,35%
Lisina libre	1,11%	1,04%	0,97%	0,90%	0,83%
Fosfato monocalcico	1,39%	1,28%	1,17%	1,06%	0,95%
Aceite de pescado	12,83%	12,50%	12,26%	12,03%	11,80%
Celulosa	0,00%	1,00%	2,00%	3,00%	4,00%
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%	2,36%

- 5 Las figuras 9 y 10 demuestran que, al mismo nivel en la dieta de hidrolizados de proteínas de crustáceos ("HID. CRUST."), los rendimientos de crecimiento y del pienso fueron más elevados que con harina de pescado. Por ejemplo, sólo resultó necesario ~2,5% de hidrolizado para registrar un ICA de 2,26%, comparado con ~5% de harina de pescado. Además, se obtuvo un ICA de 1,05 con ~3% de hidrolizado frente a ~9% de harina de pescado. En resumen, se requeriría un nivel más bajo de adición de hidrolizado de proteínas de crustáceo (2 a 3 veces menos)
- 10 para alcanzar el rendimiento de la harina de pescado y ello incluso si los dos ingredientes presentan una composición analítica y perfil de aminoácidos cerrados. La diferencia principal entre los dos ingredientes es el

tamaño molecular de las proteínas, que aparentemente es un motor esencial del rendimiento en peces.

En el segundo experimento, aunque el hidrolizado de pescado blanco ("HID. pescado blanco") tendió a funcionar ligeramente mejor que la harina de pescado, el rendimiento se mantuvo más bajo que con el hidrolizado de proteínas de crustáceos (figuras 11 y 12). A un nivel de adición bajo, el hidrolizado de pescado blanco podría resultar preferente respecto a la harina de pescado, aunque rápidamente con un nivel creciente de adición, la harina de pescado y el hidrolizado de pescado blanco proporcionaron el mismo rendimiento. Además, al nivel elevado de adición, el hidrolizado de pescado blanco tendió a presentar peores rendimientos de crecimiento y del pienso.

Dichos dos últimos ensayos demostraron claramente la importancia del origen de la materia prima y del perfil de pesos moleculares proteicos de los hidrolizados, en el mantenimiento de un rendimiento elevado al añadirlos a un pienso para peces. Aunque el hidrolizado de pescado blanco mostró el mejor perfil nutricional, representado por su nivel de proteínas y perfil de aminoácidos, su rendimiento se mantuvo más bajo que el del hidrolizado de proteínas de crustáceos debido a que el perfil de pesos moleculares proteicos es menos rico en péptidos muy pequeños (<1.000 Da) y en aminoácidos libres.

Basándose en estos resultados, los inventores pudieron prever aplicaciones dietéticas de los hidrolizados de proteínas de crustáceos para mejorar los rendimientos de los peces y de los piensos.

### 3. Aplicaciones de los hidrolizados de proteínas de crustáceos al pienso para peces poslarvarios

#### 3.1 Rendimiento de los hidrolizados de proteínas de crustáceos en peces poslarvarios alimentados con dietas con bajo contenido en harina de pescado

Se llevó a cabo un ensayo con lubina alimentada con FM5, FM20, FM5+5% de hidrolizado de proteínas de crustáceos ("Hid. crust.") durante 45 días. Se aplicó concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos (55% de materia seca) mediante sólo inclusión (5%I) o mediante inclusión y recubrimiento externo (3%I/2%R) para incrementar la palatabilidad del producto. También se aplicó un tratamiento que contenía harina de kril, ya que esta materia prima se considera actualmente una de las de mejor rendimiento en acuicultura.

Con el fin de formular las dietas de bajo contenido en harina de pescado que contenían 5% de harina de pescado (FM5), se sustituyó la harina de pescado de FM20 en FM5 por una mezcla de materiales de origen vegetal. Se añadió metionina libre, lisina libre y una fuente de fósforo (fosfato monocálcico) para satisfacer los requisitos nutricionales de la lubina (Tabla 7, posteriormente). Todos los demás ingredientes (por ejemplo vitaminas, minerales y similares) eran los mismos en todas las formulaciones de pienso. Todos los piensos se formularon para ser isonitrogenados, isocalóricos e isolipídicos.

Tabla 7. Fórmula de pienso utilizado para alimentar lubina durante 45 días (composición proximal: proteínas en bruto: 45%; grasas en bruto: 14%; cenizas: 6,5%; energía: 4,9 Kcal/Kg)

Ingredientes	FM5	FM5 +5% HID. CRUST. (I)	FM5 + 5% harina de kril	FM5 +5% HID. CRUST. (3% R/2%I)	FM20
Harina de pescado (calidad Super Prime)	5,00	5,00	5,00	5,00	20,00
HID. CRUST.	0,00	5,00*	0,00	5,00*	0,00
Harina de kril	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00
Proteínas vegetales mixtas	76,51	72,86	71,19	72,86	64,53
Metionina libre	0,59	0,56	0,55	0,56	0,45
Lisina libre	1,67	1,59	1,55	1,59	1,08
Fosfato monocálcico	2,60	2,46	2,40	2,46	1,25
Aceite de pescado	11,27	11,32	10,34	11,32	10,33
Celulosa	0,00	1,10	1,60	1,10	0,00
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	2,36	2,36	2,36	2,36	2,36
*equivalente a 2,75% de materia seca					

Al final del ensayo, se pesaron los peces y se registró el número de peces delgados.

La inclusión de concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos en la dieta FM5 resultó en una mejora significativa de los rendimientos de crecimiento de los peces y de la utilización del pienso en comparación con el grupo alimentado con la dieta FM5 (figuras 13 y 14). Ambas aplicaciones del concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos (inclusión o inclusión+recubrimiento externo) funcionaron bien y el recubrimiento externo en

combinación con la inclusión no permitiendo obtener un rendimiento más elevado que la inclusión por sí sola. Aunque la inclusión de harina de kril resultó en una mejora del rendimiento de la dieta FM5, la ganancia se mantuvo en niveles menores a los del hidrolizado de proteínas de crustáceos.

5 Resulta interesante que la aplicación del hidrolizado de proteínas de crustáceos permitió obtener un número muy bajo de peces delgados en comparación con los otros tratamientos, incluso la dieta de alto contenido en harina de pescado (FM20) o la dieta que contenía harina de kril (figura 15). Las diferencias observadas fueron significativas entre FM5 y FM5+hidrolizado de proteínas de crustáceos (ambos procedimientos de aplicación). Estos resultados  
10 constituyen una mayor evidencia de que la utilización del hidrolizado de proteínas de crustáceos como solución funcional para mejorar y estandarizar los rendimientos de los peces y del pienso.

3.2 Rendimiento de hidrolizados de proteínas de crustáceos para incrementar la resistencia de los peces poslarvarios frente a patógenos

15 El efecto beneficioso de los hidrolizados de proteínas de crustáceos sobre la palatabilidad del pienso, sobre la utilización del pienso y, en última instancia, sobre el desarrollo del sistema digestivo podría presentar algunos efectos directos sobre el estado de salud de los peces. De hecho, se considera que el intestino es la vía principal de entrada de patógenos en el organismo del pez y cuanto menor sea la calidad del intestino, más alto será el riesgo de enfermedades.  
20

Con el fin de verificar dichas hipótesis, se llevó a cabo un ensayo en dos especies tropicales: la dorada del Japón y el falso fletán del Japón, alimentados con una dieta de tipo comercial que contiene 46% a 52% de harina de pescado y 2% o 7,2% de concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos (55% de materia seca) aplicado mediante recubrimiento externo o mediante inclusión, respectivamente (Tablas 8 y 9, a continuación).  
25

Tabla 8. Fórmula del pienso para el falso fletán del Japón (*Paralichthys olivaceus*)

Ingredientes	Dietas experimentales		
	Control (Con.)	Con. + recubrimiento de Hid. crust.	Con. + inclusión de Hid. crust.
Harina de pescado blanco	50,00	48,90	46,00
Hidrolizado de crustáceos	0,00	2,00 <sup>1</sup>	7,20 <sup>2</sup>
Mezcla de harinas de origen vegetal	38,50	38,50	38,50
Aceite de hígado de calamar	4,00	4,00	4,00
Aceite de soja	4,00	4,00	4,00
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	3,50	3,50	3,50
<sup>1</sup> Equivalente a 1,1% de materia seca; <sup>2</sup> Equivalente a 4,0% de materia seca Hid. Crust.: hidrolizado de crustáceos			

Tabla 9. Fórmula del pienso para la dorada del Japón (*Pagrus major*)

Ingredientes	Dietas experimentales		
	Control (Con.)	Con. + recubrimiento de Hid. crust.	Con. + inclusión de Hid. crust.
Harina de pescado blanco	52,00	50,90	48,00
Hidrolizado de crustáceos	0,00	2,00 <sup>1</sup>	7,20 <sup>2</sup>
Mezcla de harinas de origen vegetal	34,50	34,50	34,50
Aceite de hígado de calamar	5,00	5,00	5,00
Aceite de soja	5,00	5,00	5,00
Premezcla (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.)	3,50	3,50	3,50
<sup>1</sup> Equivalente a 1,1% de materia seca; <sup>2</sup> Equivalente a 4,0% de materia seca Hid. Crust.: hidrolizado de crustáceos			

Los piensos se proporcionaron manualmente hasta la saciedad según evaluación visual, durante 60 días (falso fletán del Japón) y 84 días (dorada del Japón). Al final del ensayo, se pesaron los peces y se calcularon los parámetros zootécnicos (supervivencia, crecimiento y utilización del pienso). A continuación, se retaron los peces con un patógeno (*Streptococcus iniae*) y se registró la supervivencia durante 21 días. Se presentan los resultados posteriormente.  
35

Al final del ensayo, la aplicación del concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos mejoró significativamente el rendimiento del crecimiento y la utilización del pienso en ambas especies (Tablas 10 y 11, a continuación).

5 Tabla 10. Rendimiento de crecimiento del falso fletán del Japón (*Paralichthys olivaceus*) alimentado con las dietas experimentales durante 5 semanas (hidrolizado de crustáceos: Hid. Crust.)

Tratamientos	PCI (g)	PCF (g)	TCE (%)	ICA
Control (Con.)	24,06±0,24	74,75±2,89b	1,89±0,05b	1,53±0,02a
Con. + 2% recubrimiento de Hid. crust.	24,40±0,21	86,64±3,69a	2,11±0,06a	1,32±0,06b
Con. + 7,2% inclusión de Hid. crust.	24,86±0,42	93,12±1,72a	2,20±0,05a	1,25±0,02b
Valores son medias de grupos por triplicado, presentados como medias ± S.D. PCI: peso corporal inicial - PCF: peso corporal final				

10 Tabla 11. Rendimiento de crecimiento de dorada del Japón (*Pagrus major*) alimentada con las dietas experimentales durante 6 semanas (hidrolizado de crustáceos: Hid. crust.)

Tratamientos	PCI (g)	PCF (g)	TCE (%)	ICA
Control (Con.)	28,99±0,20	102,75±1,43b	1,51±0,02b	1,86±0,04a
Con. + 2% recubrimiento de Hid. crust.	29,01±0,27	112,73±2,27a	1,62±0,03a	1,69±0,04b
Con. + 7,2% inclusión de Hid. crust.	29,03±0,03	113,20±3,22a	1,62±0,03a	1,70±0,06b
Valores son medias de grupos por triplicado, presentados como medias ± S.D. PCI: peso corporal inicial - PCF: peso corporal final				

15 En ambas especies, la tasa de mortalidad de los peces alimentados con la dieta de control se incrementó mucho en el 3º a 5º día posterior al reto, hasta alcanzar un nivel muy elevado al final del periodo de reto (>80%) (figuras 16 y 17). Por el contrario, los peces alimentados con el concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos ("Hid. crust.") aplicado mediante inclusión, registró un nivel de supervivencia muy elevado durante el periodo de ensayo. Este resultado es una buena prueba del efecto bioactivo de los hidrolizados de proteínas de crustáceos utilizados para alimentar a peces para obtener una dieta completa.

20 Al aplicarlos mediante recubrimiento externo, el concentrado líquido de hidrolizado de proteínas de crustáceos ("Hid. crust.") proporcionó resultados limitados y sólo el falso fletán del Japón sobrevivió bien al reto bacteriano. Este último resultado permite concluir que debe aplicarse un nivel mínimo de hidrolizado en la dieta para obtener una mejora del estado de salud de los peces.

25 3.3 Otras posibles aplicaciones del hidrolizado de proteínas de crustáceos en piensos para peces poslarvarios

30 En el contexto de la presente invención se ha demostrado anteriormente que los hidrolizados de proteínas de crustáceos resultan eficientes para mejorar significativamente el rendimiento de las dietas de bajo contenido en harina de pescado, las cuales son formulaciones muy estresantes para los peces debido a su baja palatabilidad y bajo valor nutricional. Pueden encontrarse muchas otras fuentes de estrés durante un ciclo de acuicultura y la aplicación de los hidrolizados de proteínas de crustáceos podrían resultar útiles para reducir el estrés de los peces y, por lo tanto, para mejorar su resistencia a factores bióticos y abióticos.

35 3.3.1 Rendimiento de los hidrolizados de proteínas de crustáceos en la recuperación después de un periodo de estrés

40 Un primer ejemplo se refiere al estrés inducido por la manipulación de los peces poslarvarios para el pesado, vacunación, transferencia y similares. La consecuencia principal para los peces de dicha manipulación es una reducción significativa de la ingesta de pienso, que conduce a una reducción del crecimiento. En el caso de que el comportamiento anoréxico de los peces se prolongue muchos días, podría resultar negativamente afectada la morfología del intestino: reducción de la superficie de las microvellosidades, enteropatía, atrofia de las mucosas, etc. (Zeng et al., 2012) y la vuelta a un sistema digestivo funcional podría requerir varios días. Para evitar los efectos negativos de un ayuno prolongado, el objetivo principal es conseguir una recuperación de la alimentación muy rápida a fin de limitar el retraso del crecimiento y el riesgo de enfermedades.

45 La aplicación de hidrolizados de proteínas de crustáceos podría ayudar a cumplir dicho objetivo. En primer lugar, los hidrolizados presentan un efecto potenciador de la palatabilidad y, de esta manera, estimularán el comportamiento de alimentación de los peces poslarvarios. En segundo lugar, los péptidos de los hidrolizados podrían contribuir al desarrollo del sistema digestivo, consiguiendo una mejor asimilación de los nutrientes y, por lo tanto, mejores

rendimientos de los peces y del pienso.

3.3.2 Rendimiento de los hidrolizados de proteínas de crustáceos para la recuperación tras un reto ambiental

5 Las variaciones estacionales de temperatura del agua y del nivel de oxígeno son dos parámetros importantes que podrían afectar al rendimiento de los peces de cultivo. Debido a que los peces poslarvarios son ectotérmicos, su metabolismo está directamente relacionado con la temperatura del agua en su medio de cría. Muchos peces poslarvarios se crían en jaulas en el mar y sufren cambios de los parámetros ambientales durante el ciclo de cría, las cuales son fuentes de estrés y, por lo tanto, las desviaciones del rendimiento de los peces entre jaulas o piscifactorías o ciclos de cría. De esta manera, los hidrolizados de proteínas de crustáceos podrían ayudar a los peces poslarvarios a ser más resistentes durante estos periodos estresantes al estimular la ingesta de pienso y proteger el sistema digestivo.

15 **4. Ejemplos comparativos**

4.1 Comparación del rendimiento de los hidrolizados de proteínas de crustáceos y de los hidrolizados de pescado en peces poslarvarios

20 Se sometió a ensayo el rendimiento de hidrolizados de origen diferente en lubina poslarvarios con el fin de evaluar el impacto del origen de las materias primas sobre el rendimiento de los hidrolizados resultantes. Todas las materias primas sometidas a ensayo se sometieron a exactamente el mismo procedimiento de hidrólisis en términos de especificaciones del enzima y duración de la hidrólisis.

25 Se diseñaron dos ensayos:

- 25 - un ensayo de duración corta (18 días) para comprobar el efecto a corto plazo de los hidrolizados, controlado mayoritariamente por sus rendimientos de palatabilidad (figura 18). Se aplicaron los hidrolizados mediante inclusión al 5% sobre una dieta de bajo contenido en harinas de pescado (5% harinas de pescado, FM5) y se compararon con una dieta de alto contenido en harinas de pescado (20% de harinas de pescado, FM20),
- 30 - un ensayo de larga duración (57 días), para comprobar el efecto a largo plazo de los hidrolizados, controlado mayoritariamente por sus rendimientos nutricionales (figura 19). Se aplicaron los hidrolizados, mediante inclusión al 5% o mediante recubrimiento externo al 2%, en una dieta de bajo contenido de harinas de pescado (5% de harinas de pescado, FM5) y en comparación con una dieta de alto contenido en harina de pescado (20% de harinas de pescado, FM20).

35 En ambos ensayos, aunque los hidrolizados de pescado resultasen eficientes en la mejora del rendimiento de la dieta de bajo contenido de harinas de pescado (FM5), no pudieron recuperar el rendimiento del control positivo (FM20). El rendimiento de los hidrolizados de crustáceos fue significativamente superior al rendimiento de los hidrolizados basados en pescado, alcanzando por lo menos el rendimiento del control positivo.

40 Dichos resultados demuestran la importancia del origen de la materia prima sobre el rendimiento del hidrolizado y que los hidrolizados de crustáceos son más relevantes y de mejor rendimiento que los hidrolizados de pescado en la mejora de las características zootécnicas de los peces poslarvarios y en la restauración del rendimiento de la fórmula de bajo contenido en harinas de pescado.

4.2 Influencia del origen de los hidrolizados en la dieta sobre su capacidad de estimular el desarrollo intestinal en peces poslarvarios

50 Con el fin de confirmar el rendimiento de los hidrolizados de diferente origen en la estimulación del desarrollo intestinal, se diseñó otro ensayo en falso fletán del Japón poslarvario alimentado con hidrolizados de salmón o de pescado blanco o de crustáceos durante 11 semanas. Todas las materias primas sometidas a ensayo se sometieron a exactamente el mismo procedimiento de hidrólisis en términos de especificaciones enzimáticas y duración de la hidrólisis. Se aplicó el hidrolizado al 3,5% en una dieta de bajo contenido en harinas de pescado (27,5% de harinas de pescado, BHP) y se comparó con una dieta de alto contenido en harinas de pescado (55% de harinas de pescado, AHP). Al final del experimento, se muestrearon los intestinos anteriores (n=15 de cada tratamiento) para el análisis morfométrico, representado por el diámetro intestinal y la longitud de las vellosidades. Se muestran los resultados en la tabla 12, posteriormente.

60 Tabla 12. Diámetro intestinal y longitud de las vellosidades en falso fletán del Japón poslarvario alimentado con hidrolizados en la dieta de origen diferente durante 11 semanas (los valores son de medias de 15 análisis)

	Diámetro intestinal (µm)	Longitud de las vellosidades (µm)
Dieta de alto contenido en harinas de pescado (AHP)	2,767±98,0 <sup>a</sup>	913±5,2 <sup>a</sup>
Dieta de bajo contenido en harinas de pescado (BHP)	2,576±41,0 <sup>b</sup>	782±24,4 <sup>c</sup>

	Diámetro intestinal (µm)	Longitud de las vellosidades (µm)
BHP + 3,5% hidrolizado de gambas	2,818±97,3 <sup>a</sup>	960±22,7 <sup>a</sup>
BHP + 3,5% hidrolizado de pescado blanco	2,657±154 <sup>b</sup>	829±5,4 <sup>b</sup>
BHP + 3,5% hidrolizado de salmón	2,279±154 <sup>c</sup>	798±16,7 <sup>c</sup>

La reducción de la cantidad de harinas de pescado en la dieta impactó significativamente sobre el diámetro intestinal y la longitud de las vellosidades en los peces alimentados con la dieta BHP en comparación con los alimentados con la dieta AHP. Dicho deterioro de la calidad intestinal podría impactar negativamente sobre el rendimiento de los peces y del pienso. La aplicación de hidrolizado de gambas permitió recuperar una buena calidad intestinal (comparable al diámetro intestinal y longitud de las vellosidades en la dieta de control AHP), mientras que la harina de pescado blanco y el hidrolizado de salmón no. Además, la inclusión del hidrolizado de salmón impactó negativamente sobre la calidad intestinal en comparación con los peces alimentados con el control negativo (BHP).

Dichos resultados permitieron concluir que el origen de la materia prima era importante para el rendimiento de los hidrolizados y que los hidrolizados de crustáceos son más relevantes y presentan mejor rendimiento que los hidrolizados de pescado en la mejora del desarrollo intestinal y en la protección de los efectos histológicos negativos de la fórmula de bajo contenido en harinas de pescado.

## Referencias

Krogdahl et al. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 9 (6):361-371.

Guillaume et al. September 2001. *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Springer Praxis (UK).

Zeng et al. 2012. The effects of starvation on digestive tract function and structure in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2012 Jul;162(3):200-11.

Livak y Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.

Schmittgen y Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3: 1101 - 1108.

Taheri et al. 2010. The Relationship between different Protein Hydrolysate Diets by Growth, Digestive Enzymes and Resistance to an *Aeromonas salmonicida* Bacterial Challenge in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Alevine. Volume 2 Number (4).

Cahu et al. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109-119.

Koopman et al. 2009. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. *Am J Clin Nutr*. 2009, 90(1):106-15.

Kolkovski, S., 2008. Advances in marine fish larvae diets, in: Cruz-Suárez, E., Ricque, D., Tapia, M., Nieto, M.G., Villarreal, L.D.A., Lazo, J.P., Viana, M.T. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola IX*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico, Nuevo León, pp. 20-45.

Kendall Jr AW, Ahlstrom EH and Moser HG. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special publication* 1: 11-22.

Zambonino Infante JL, Cahu CL. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 130(4):477-87.

**REIVINDICACIONES**

1. Ingrediente de pienso realizado a partir de uno o más hidrolizados de proteínas de crustáceos para la utilización en un procedimiento para mantener y/o estimular la salud intestinal de un pez poslarvario de cultivo.

2. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos comprenden:

- aminoácidos libres en una cantidad desde 10 a 60% en peso; y
- una cantidad de proteínas solubles desde 70 a 100% en relación con el peso de proteínas total de dichos hidrolizados, en el que dichas proteínas solubles presentan un perfil de distribución en el peso molecular de péptidos como se expone en la tabla a continuación:

Peso molecular de péptidos (PM en Da)	Cantidad en % de las proteínas solubles en los hidrolizados de proteínas de crustáceos
PM < 500	50 < % ≤ 100
500 < PM < 1.000	0 ≤ % < 20
1.000 < PM < 5.000	0 ≤ % < 20
5.000 < PM < 10.000	0 ≤ % < 5
PM > 10.000	0 ≤ % < 5

3. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos comprenden:

- aminoácidos libres en una cantidad desde 12 a 58% en peso; y
- una cantidad de proteínas solubles desde 80 a 100% en relación con el peso de proteínas total de dichos hidrolizados, en el que dichas proteínas solubles presentan un perfil de distribución en el peso molecular de péptidos como se expone en la tabla a continuación:

Peso molecular de péptidos (PM en Da)	Cantidad en % de las proteínas solubles en los hidrolizados de proteínas de crustáceos
PM < 500	57 < % ≤ 100
500 < PM < 1.000	0 ≤ % < 18
1.000 < PM < 5.000	0 ≤ % < 17
5.000 < PM < 10.000	0 ≤ % < 4
PM > 10.000	0 ≤ % < 4

4. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se mantiene y/o se estimula la salud intestinal en dicho pez poslarvario de cultivo mejorando el desarrollo del epitelio intestinal.

5. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se mantiene y/o se estimula la salud intestinal en dicho pez poslarvario de cultivo aumentando la asimilación de nutrientes por dicho pez poslarvario de cultivo.

6. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se mantiene y/o se estimula la salud intestinal en dicho pez poslarvario de cultivo aumentando la resistencia de dicho pez poslarvario de cultivo a los patógenos.

7. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos se seleccionan de entre hidrolizados de proteínas de las familias de crustáceos siguientes: *Penaeidae*, *Palaemonidae*, *Pandalidae*, *Galatheididae*, *Euphausiidae*, *Mysidae* y *Nephropidae*.

8. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos hidrolizados de proteínas de crustáceos se seleccionan de entre hidrolizados de proteínas de gamba y de kril.

9. Ingrediente de pienso para la utilización en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho pez poslarvario de cultivo es un pez poslarvarios carnívoro.



Figura 1

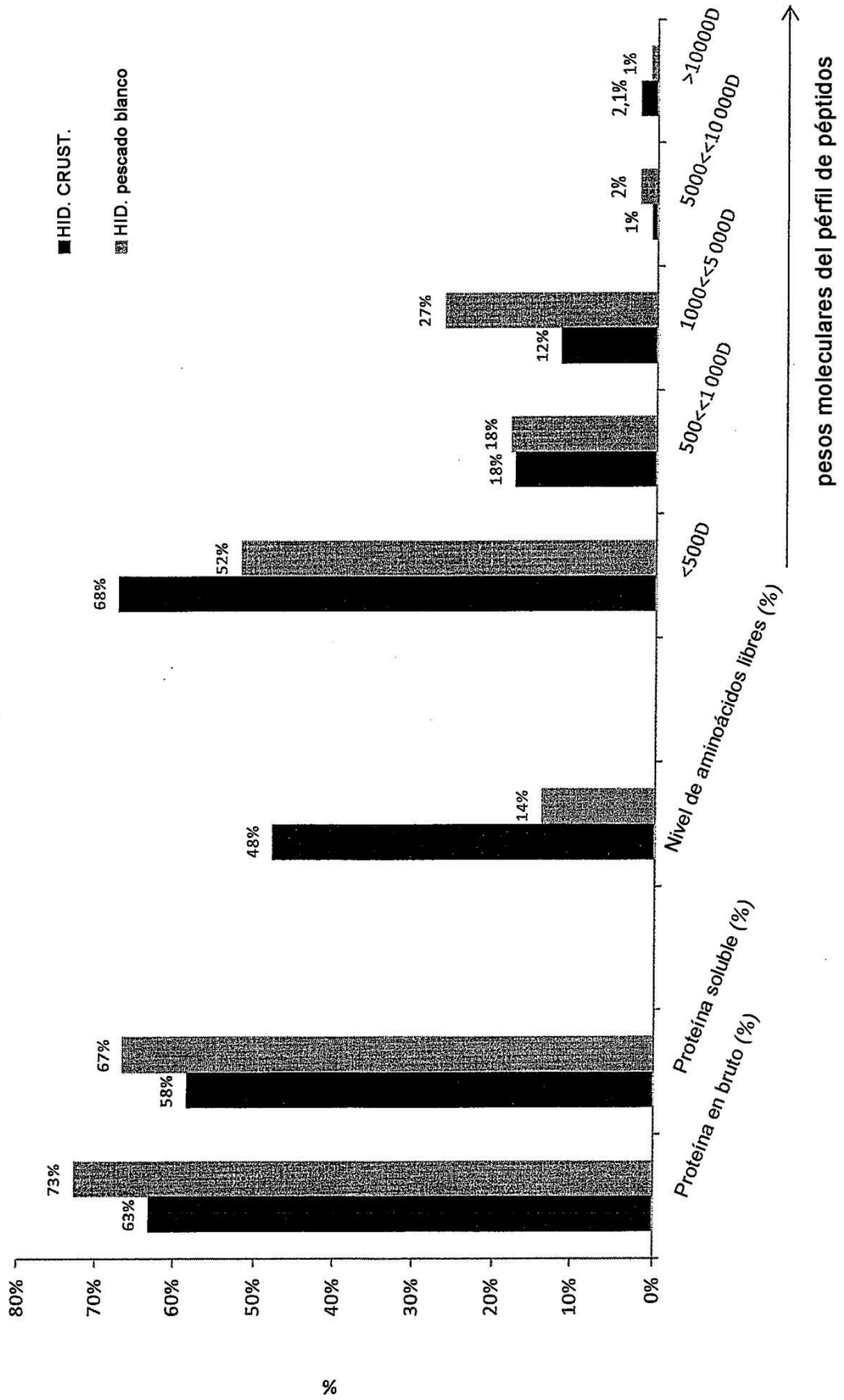


Figura 2

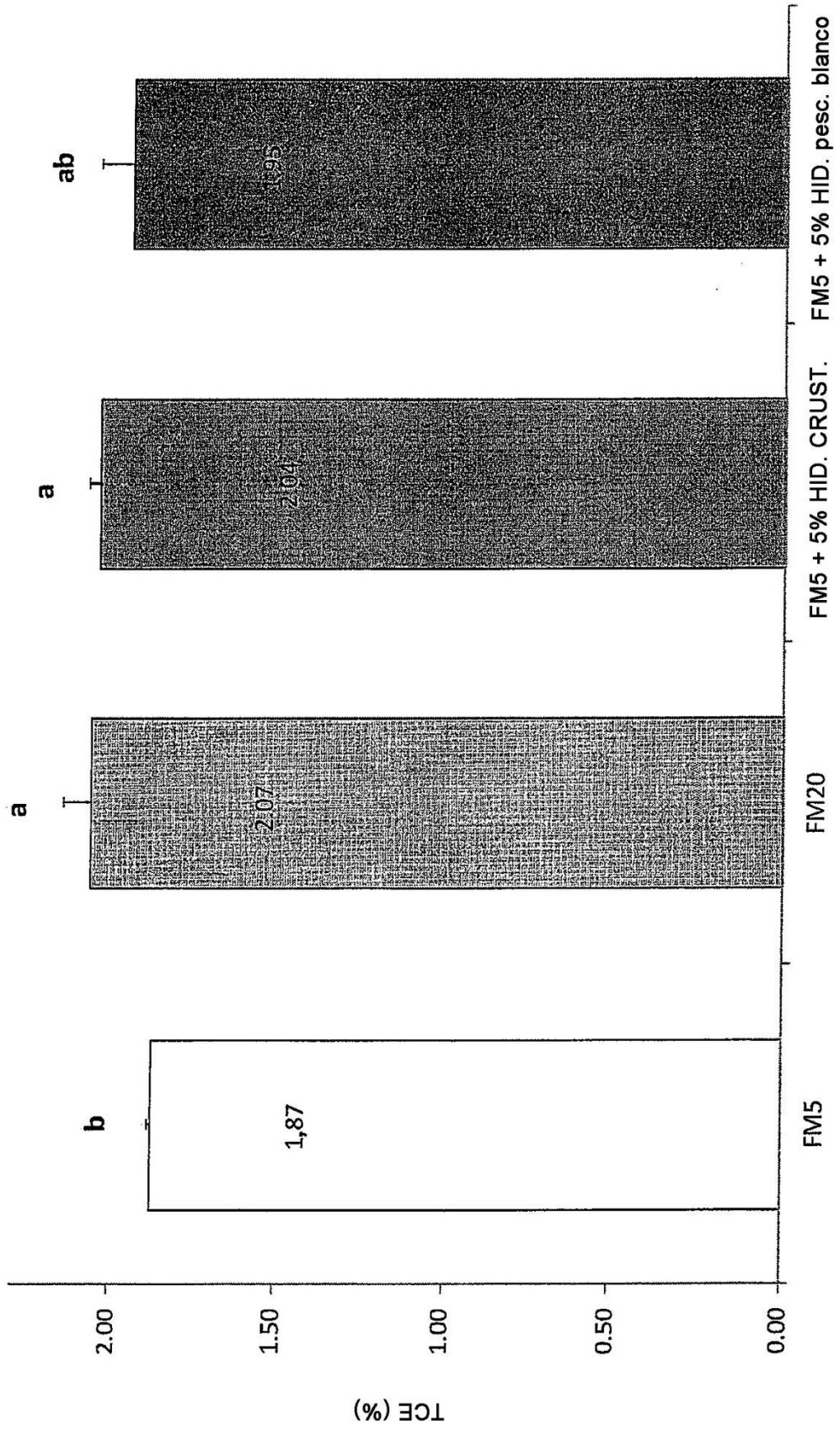


Figura 3

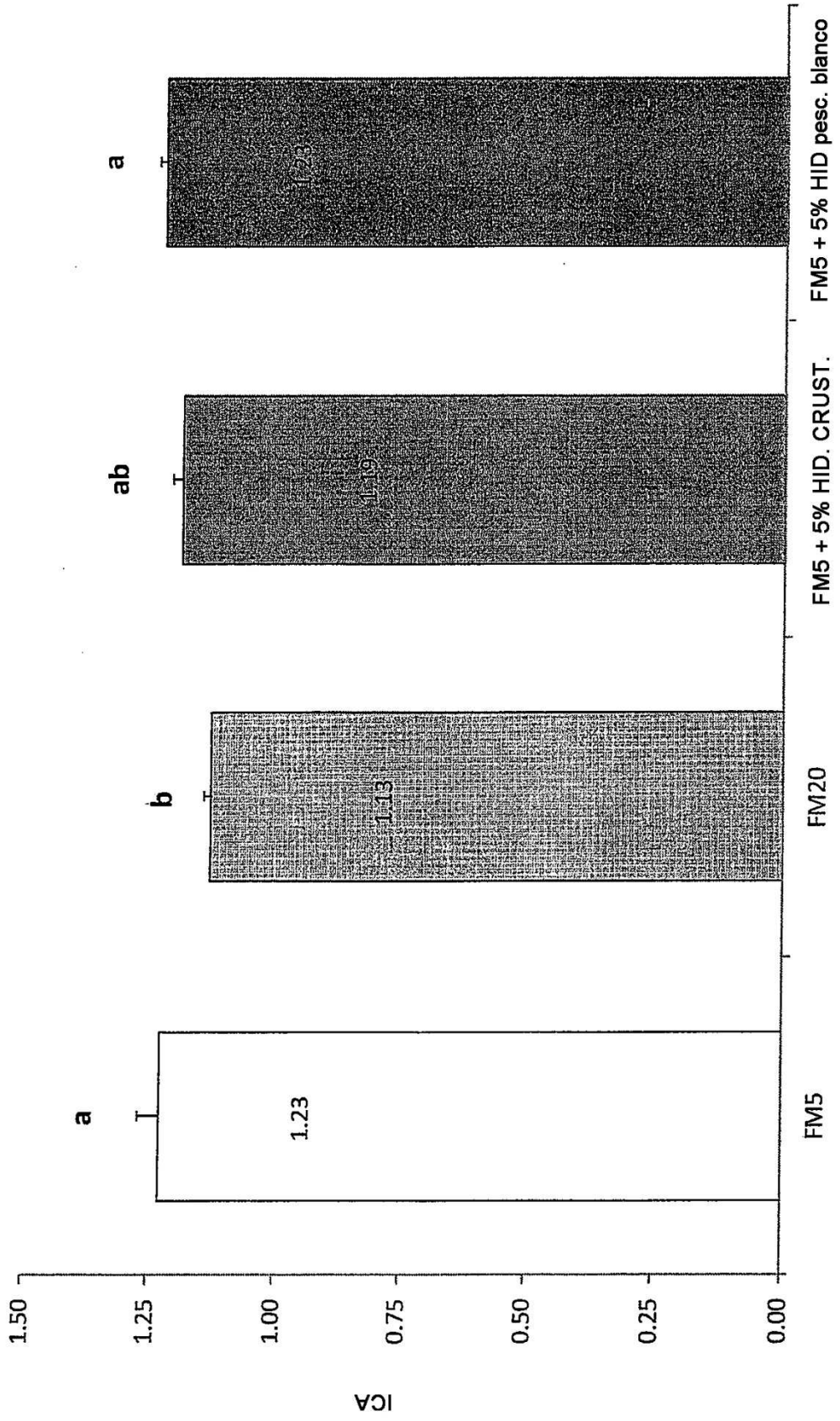


Figura 4

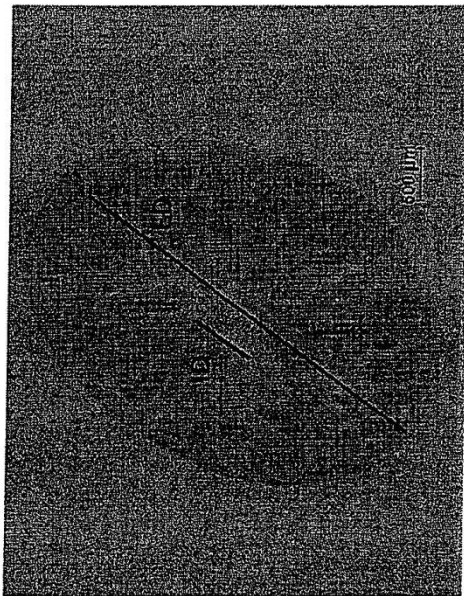


Figura 5

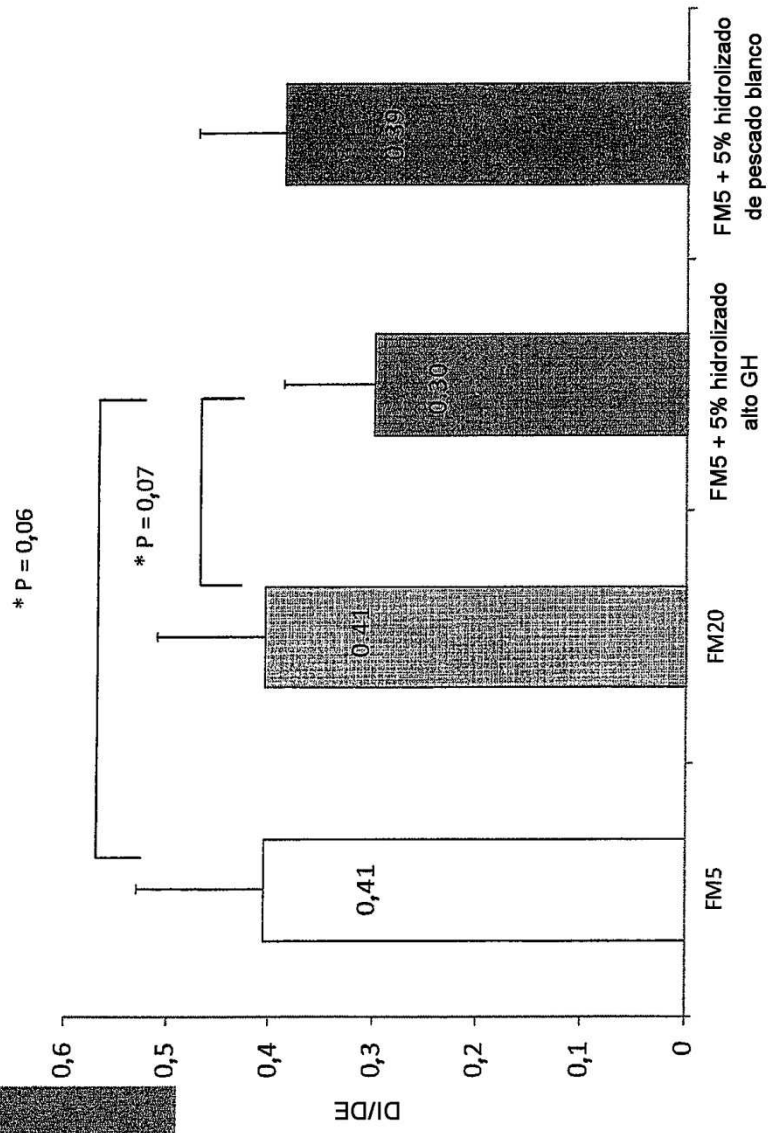


Figura 5b

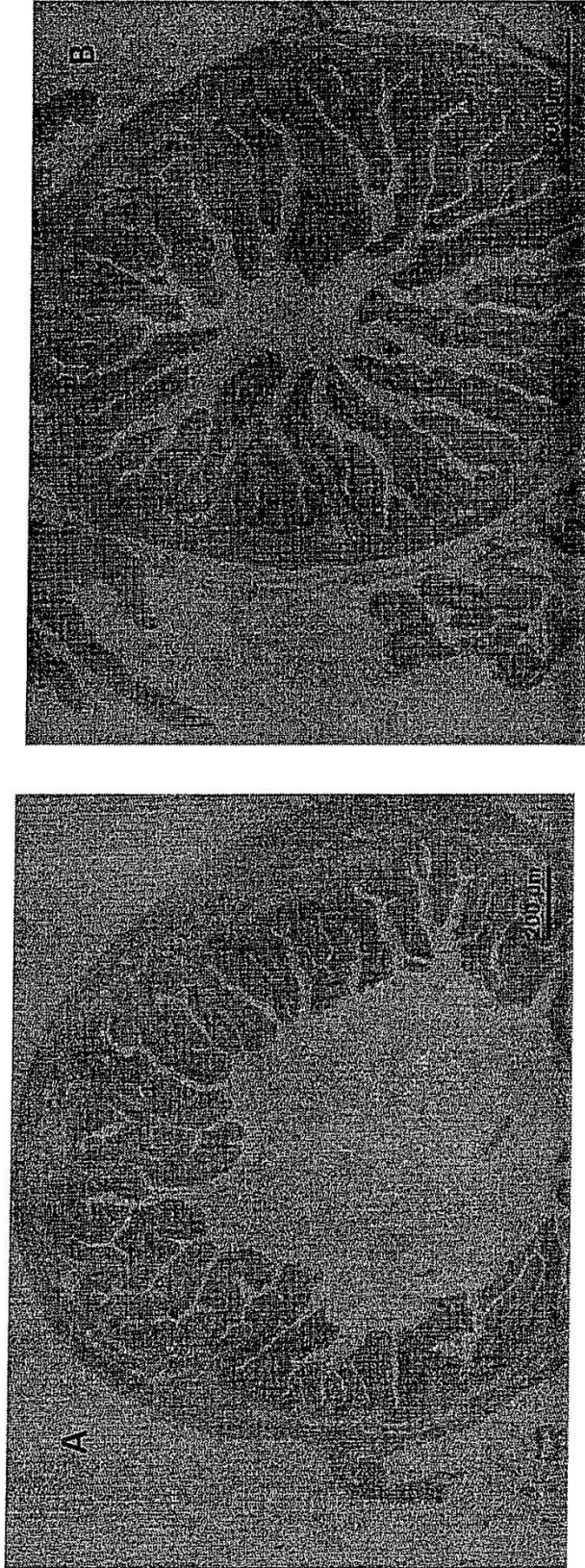
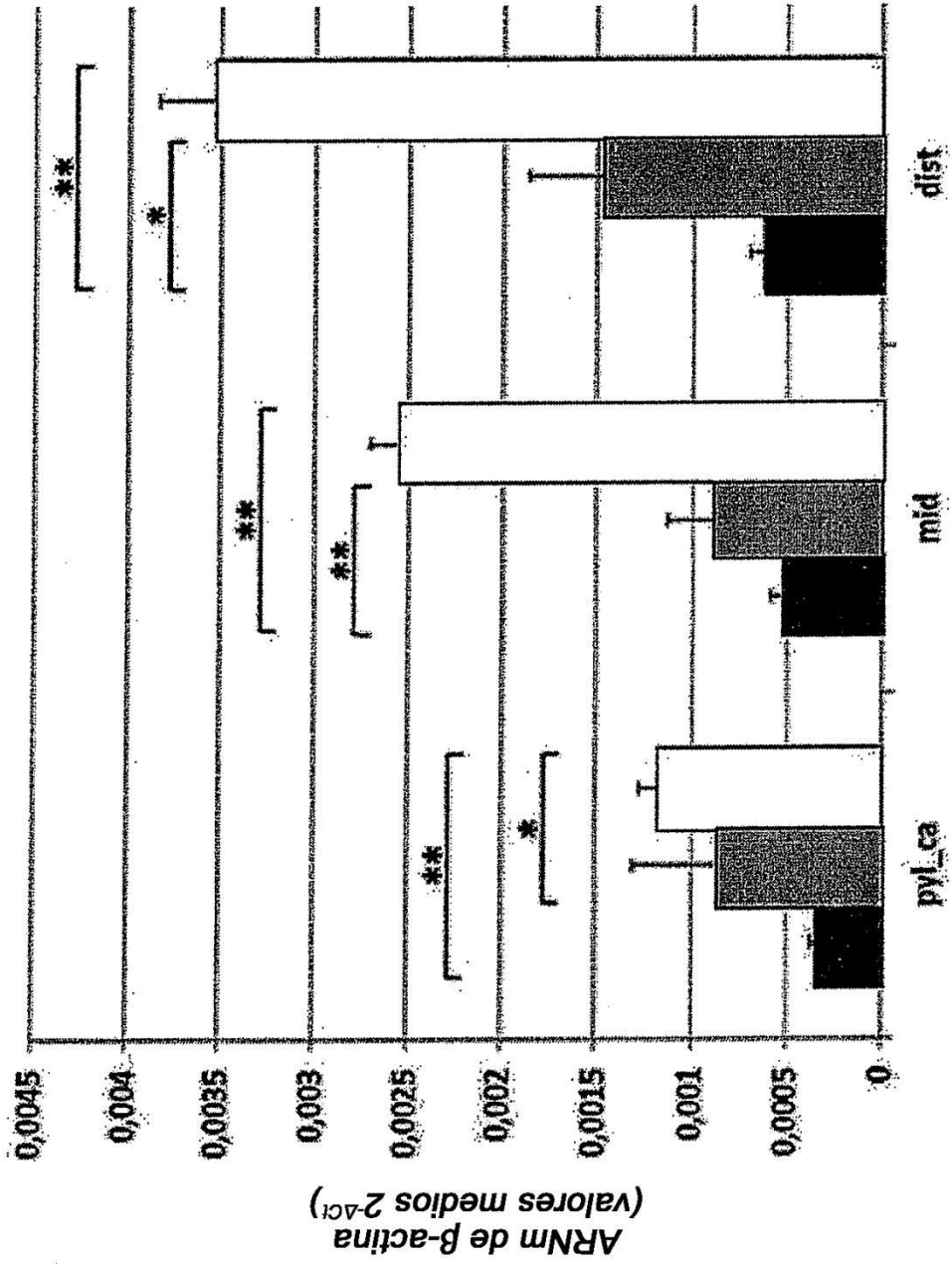


Figura 6



FM5 (■), FM20 (□), y FM5 + 5% hidrolizado de crustáceos (□)

Figura 7

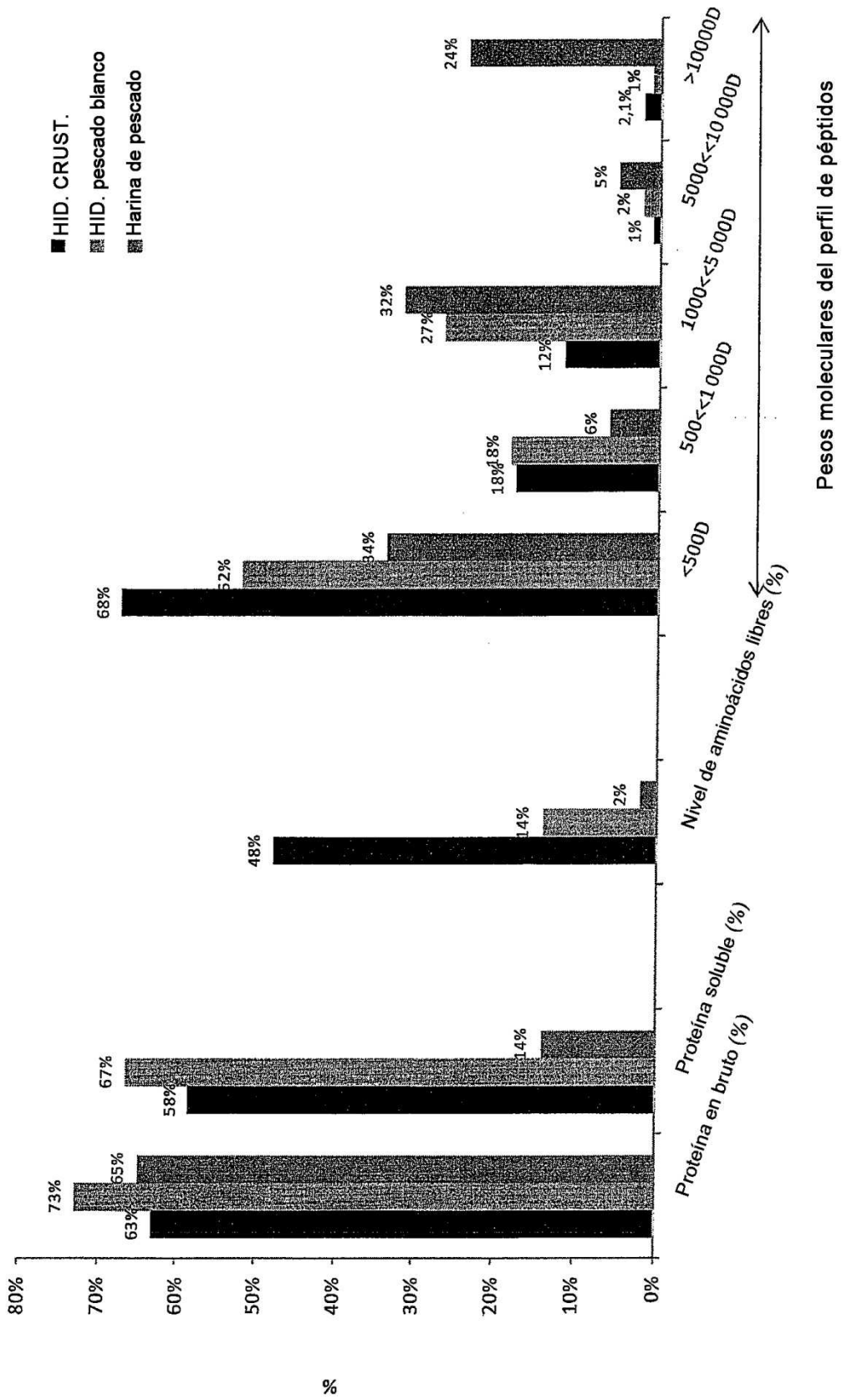


Figura 8

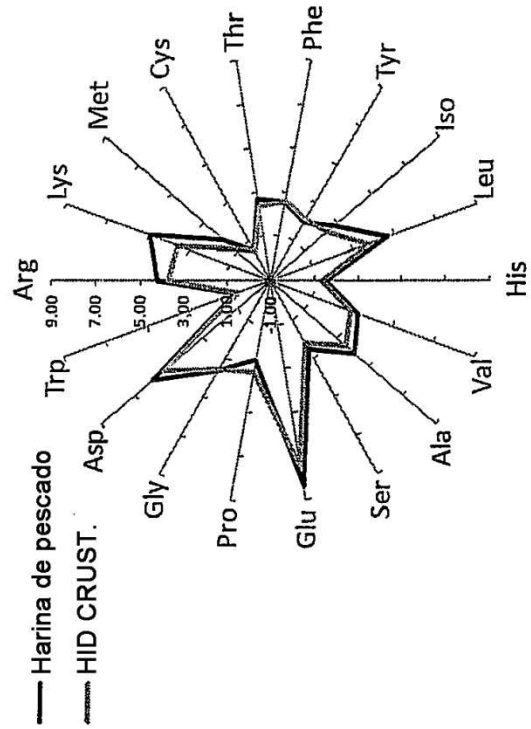
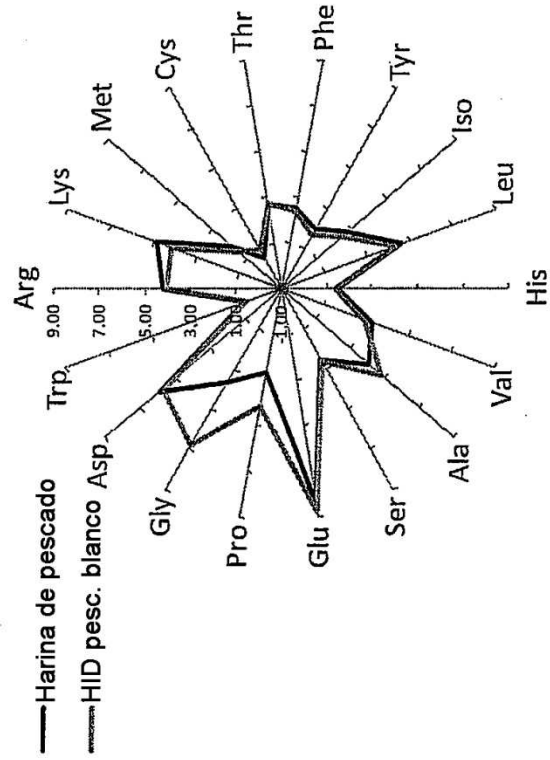




Figura 9

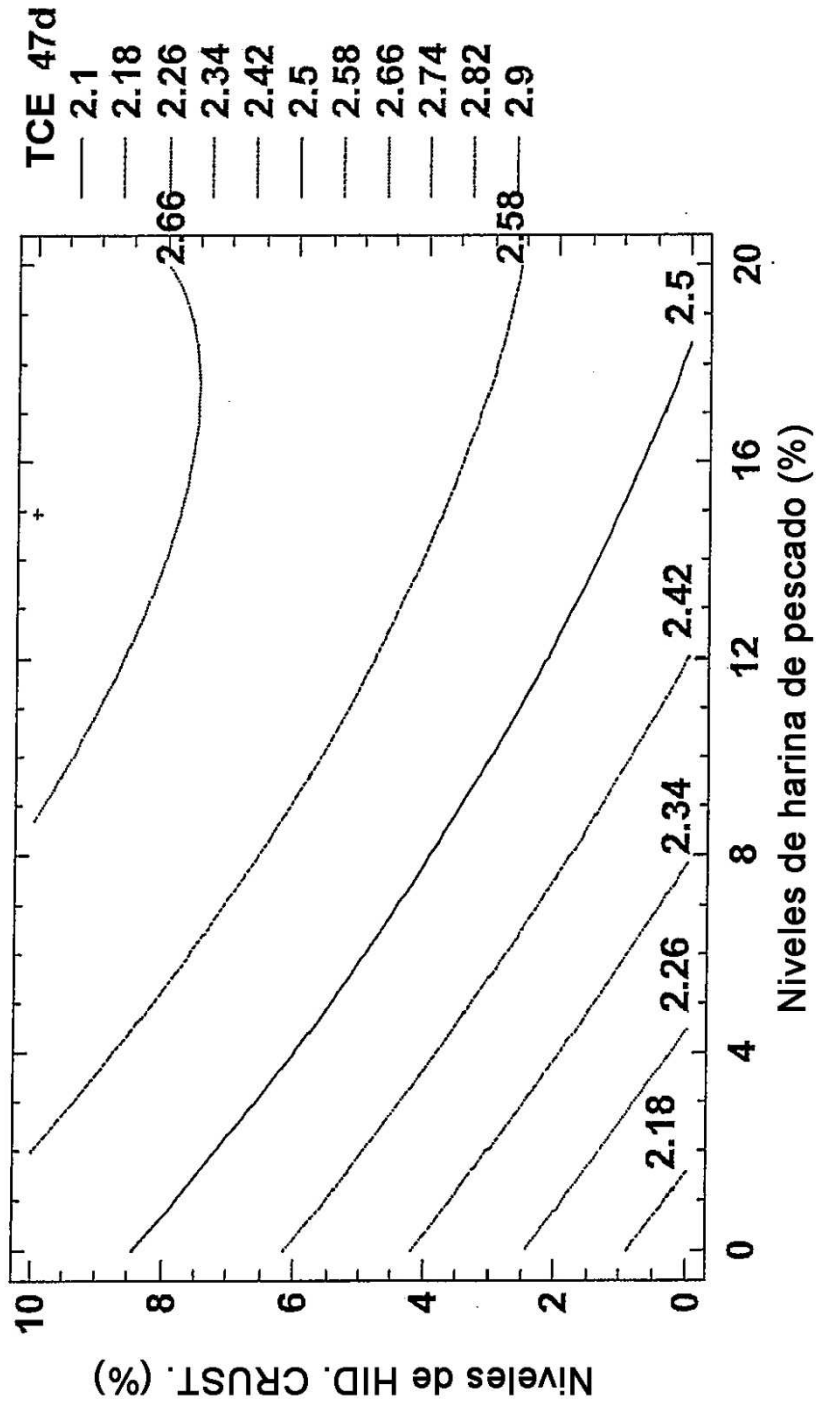


Figura 10

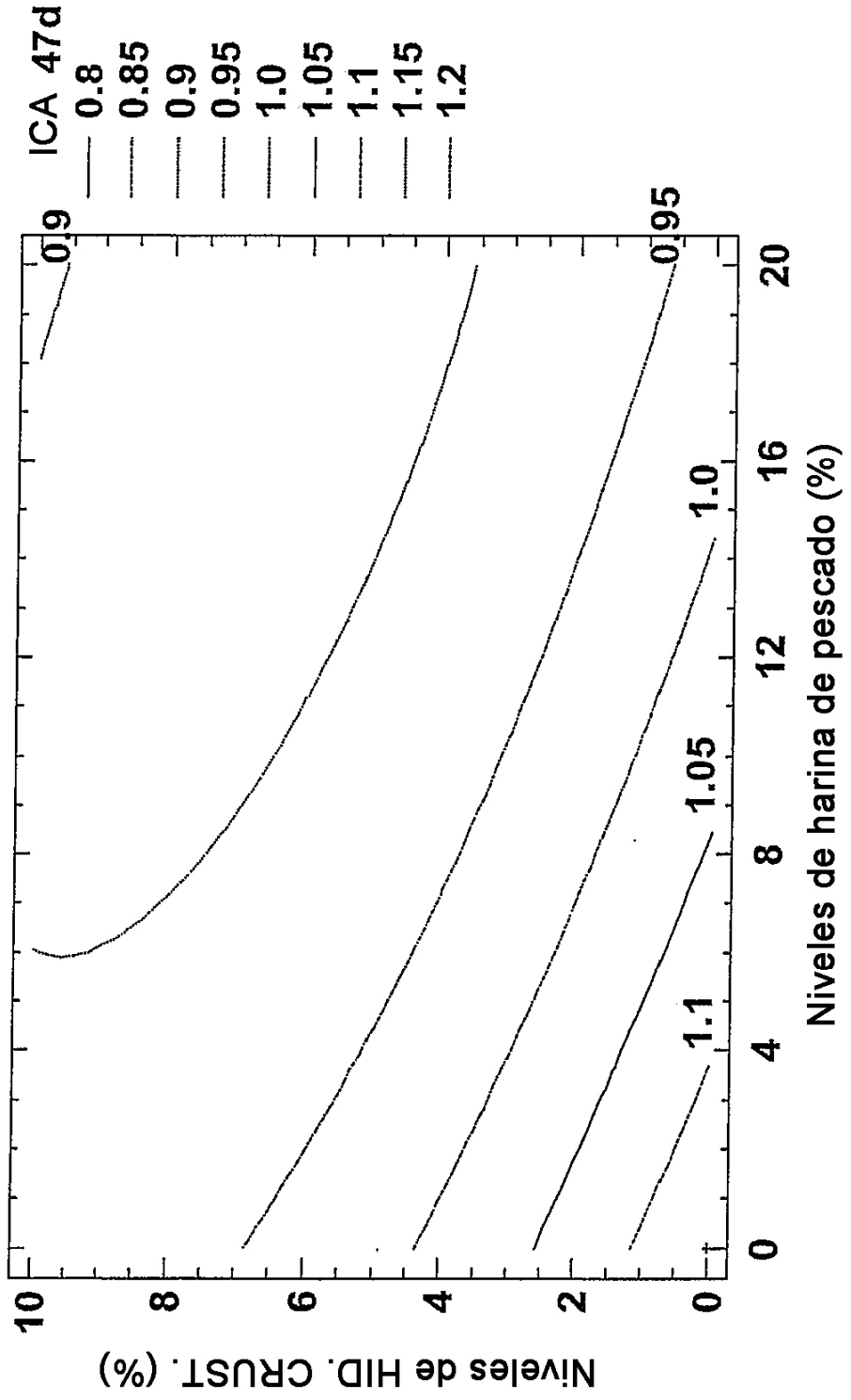


Figura 11

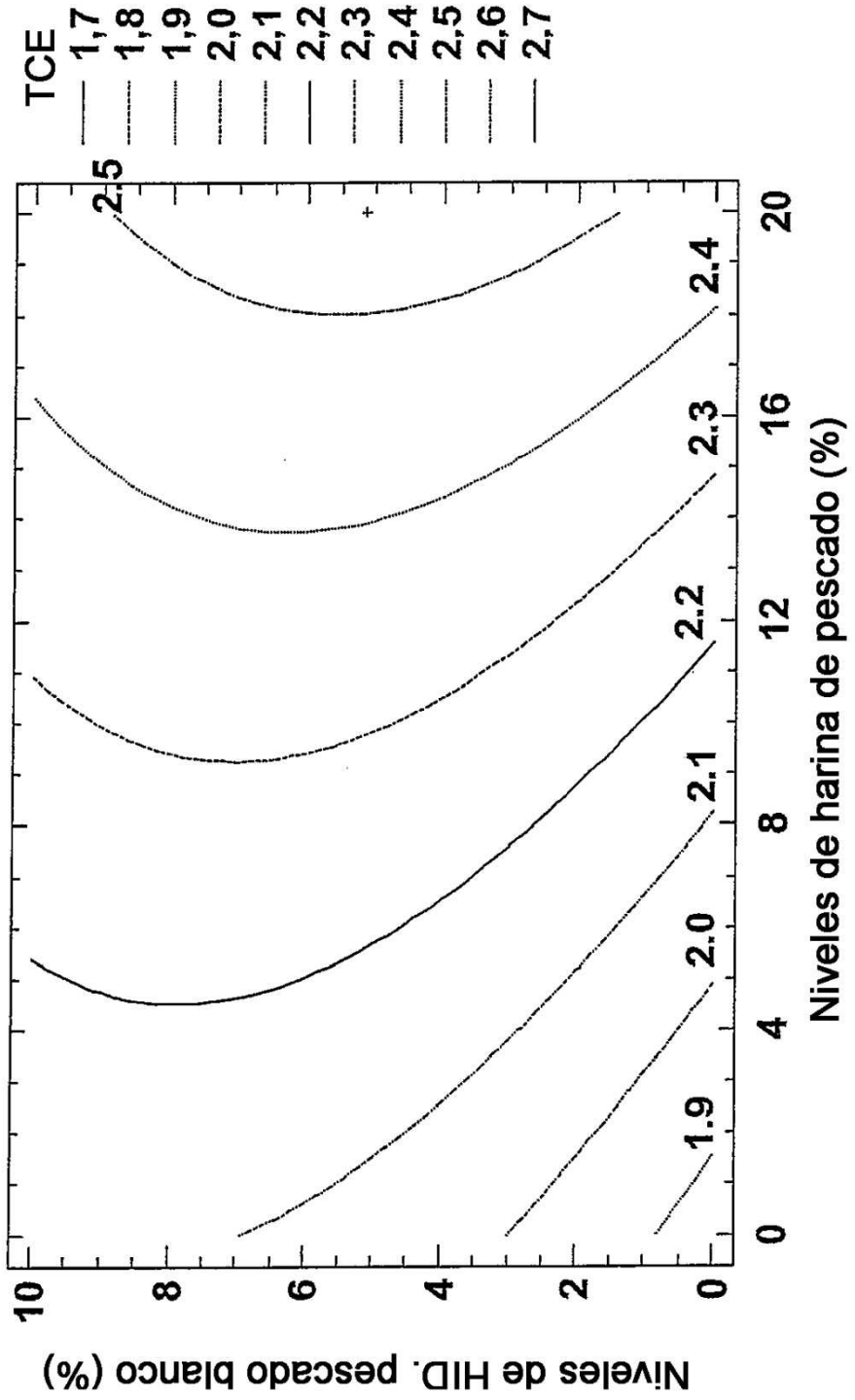


Figura 12

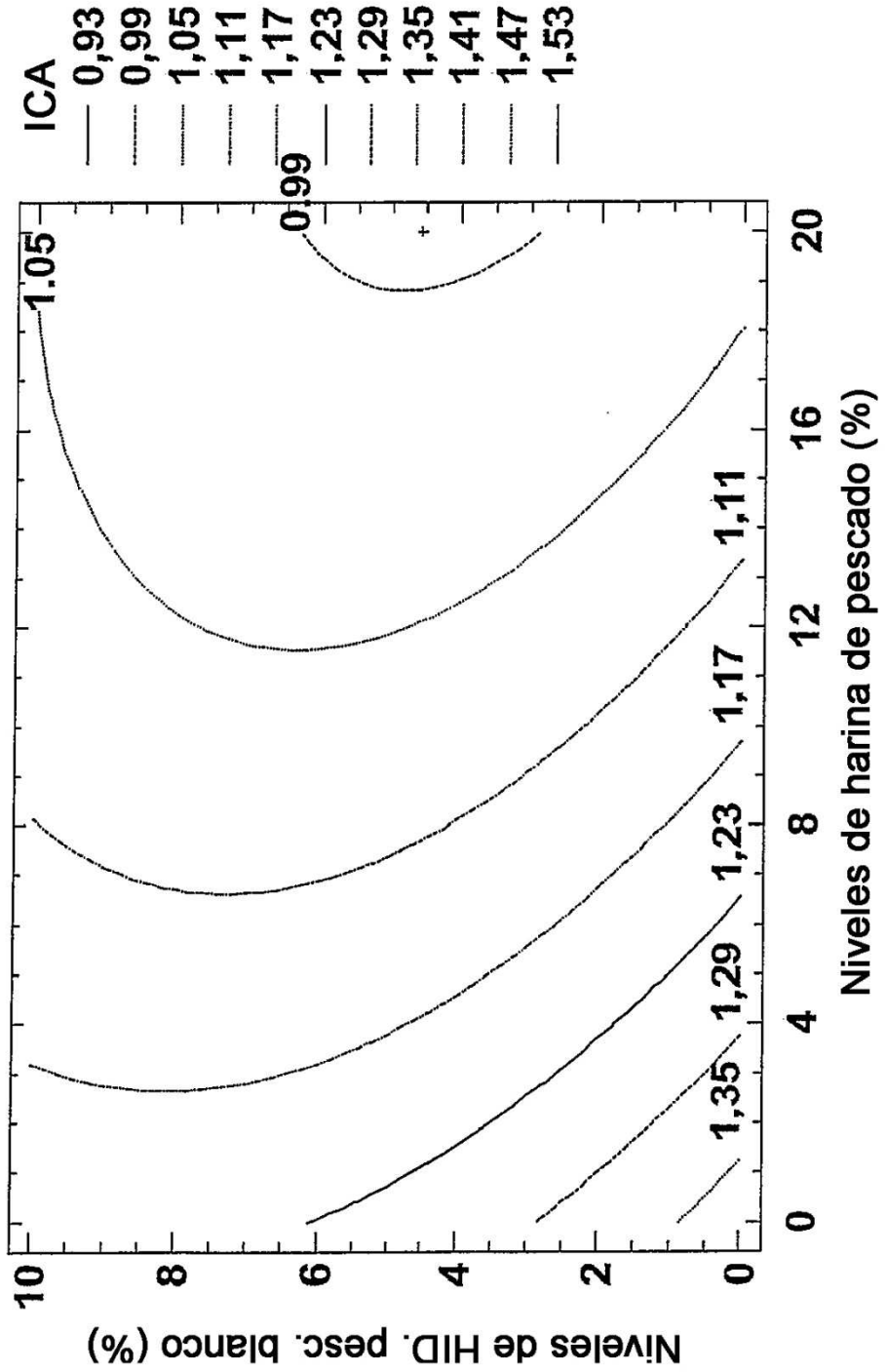


Figura 13

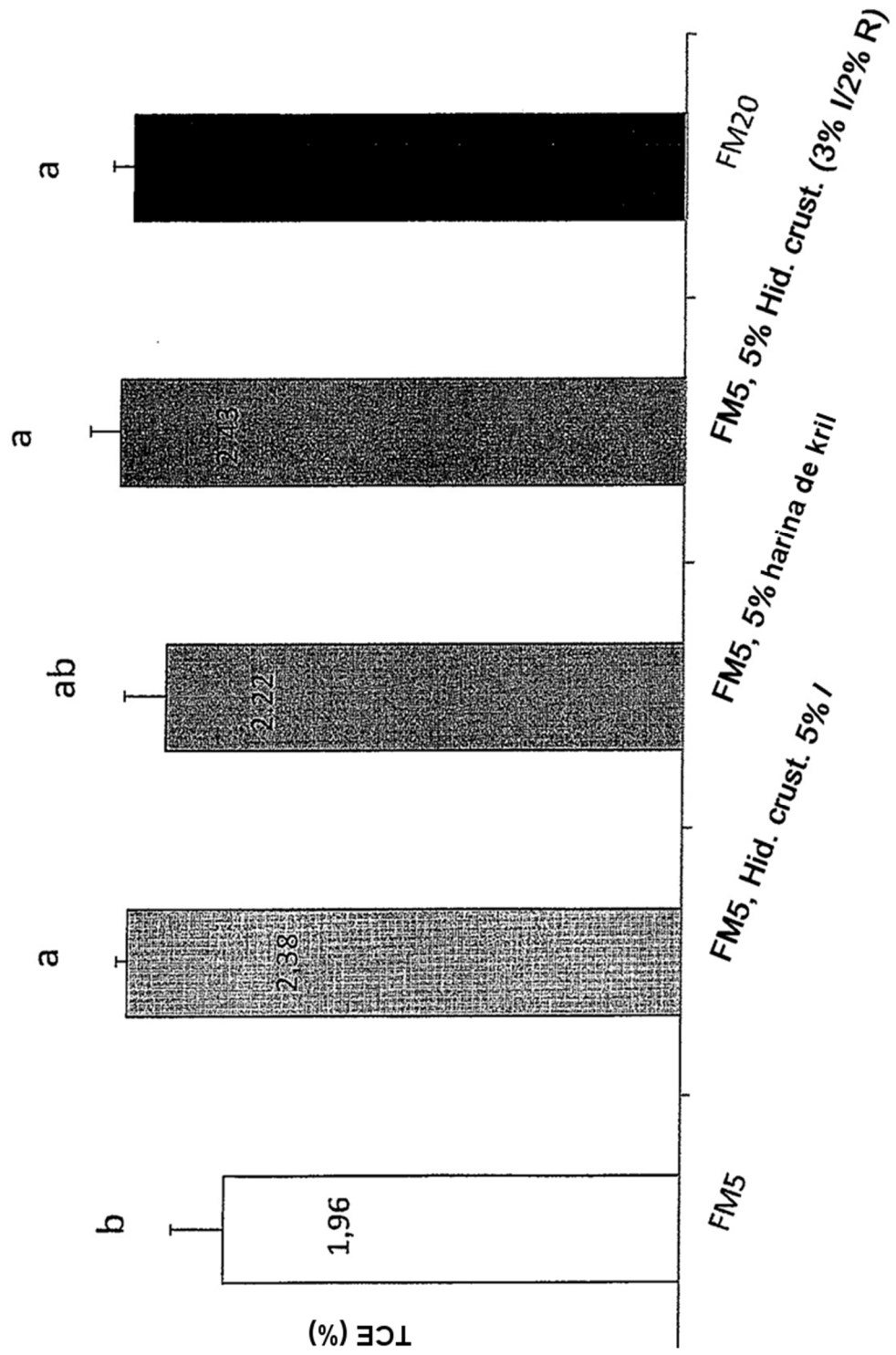


Figura 14

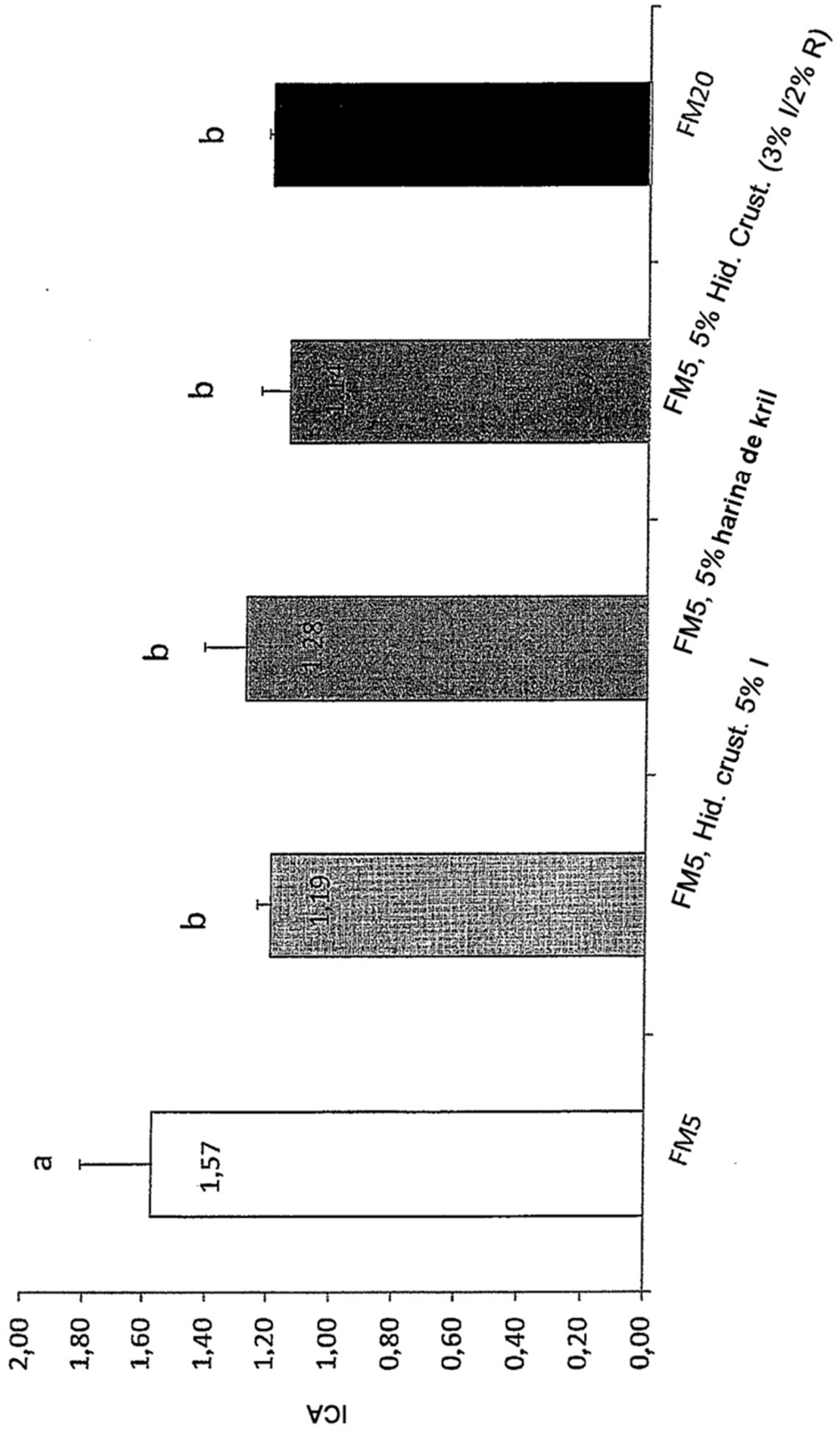


Figura 15

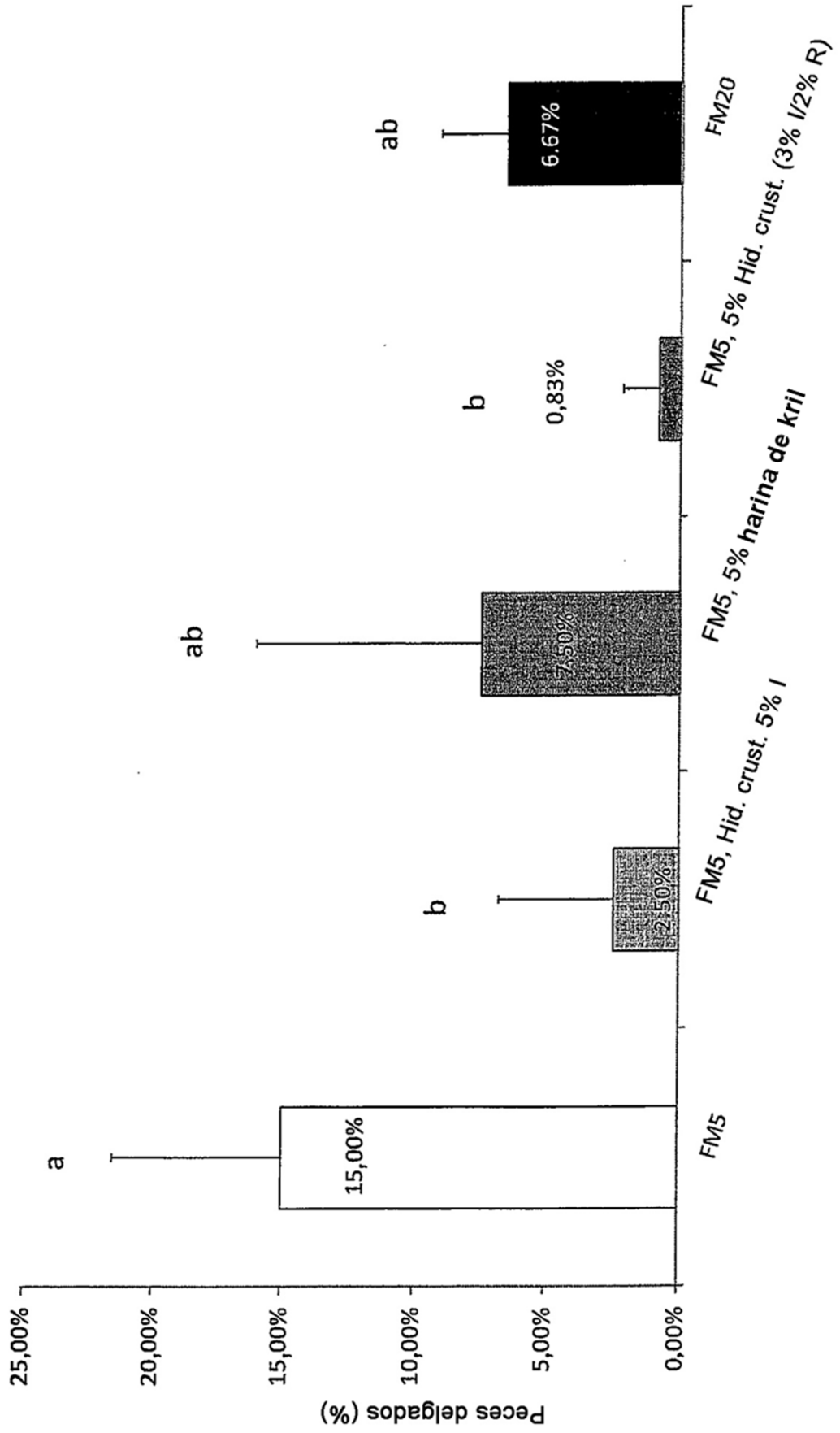


Figura 16

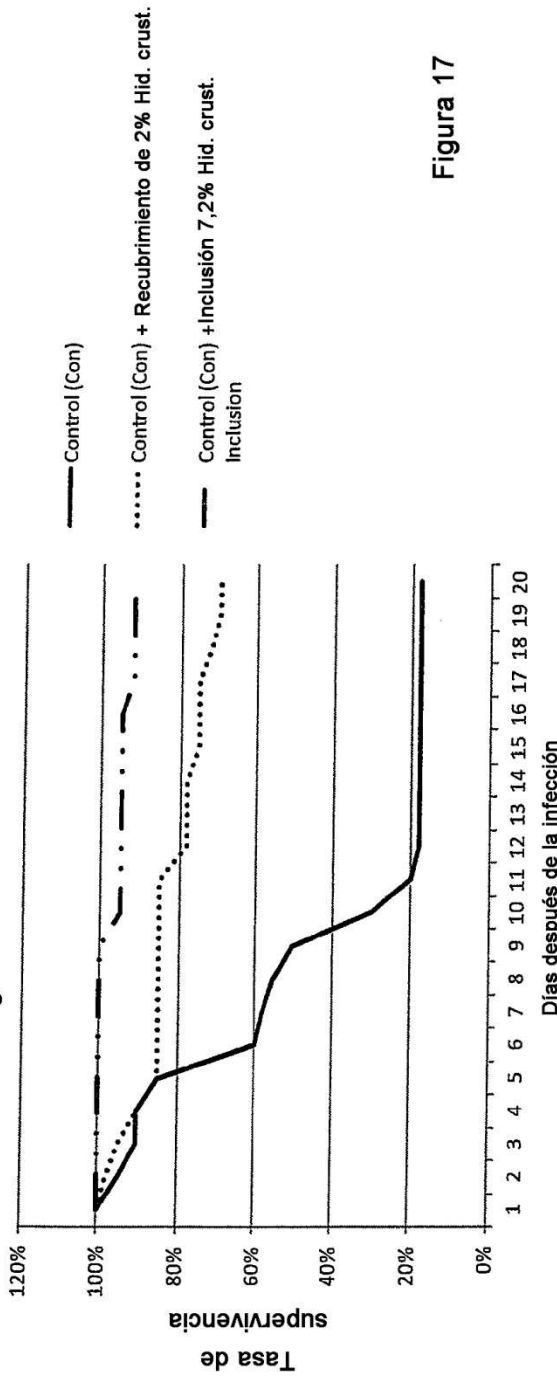


Figura 17

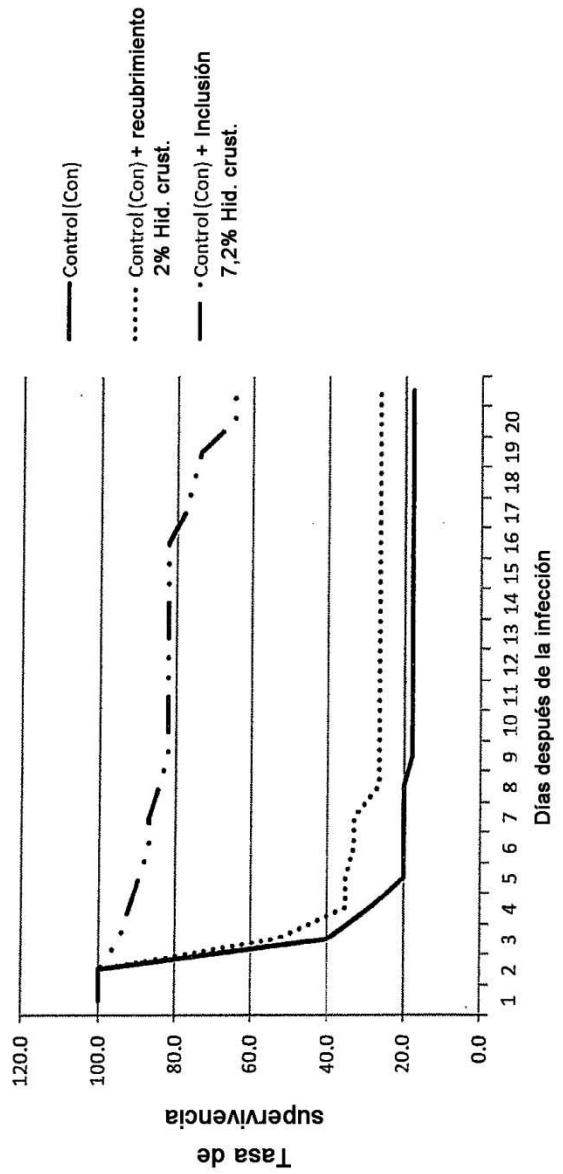




Figura 18

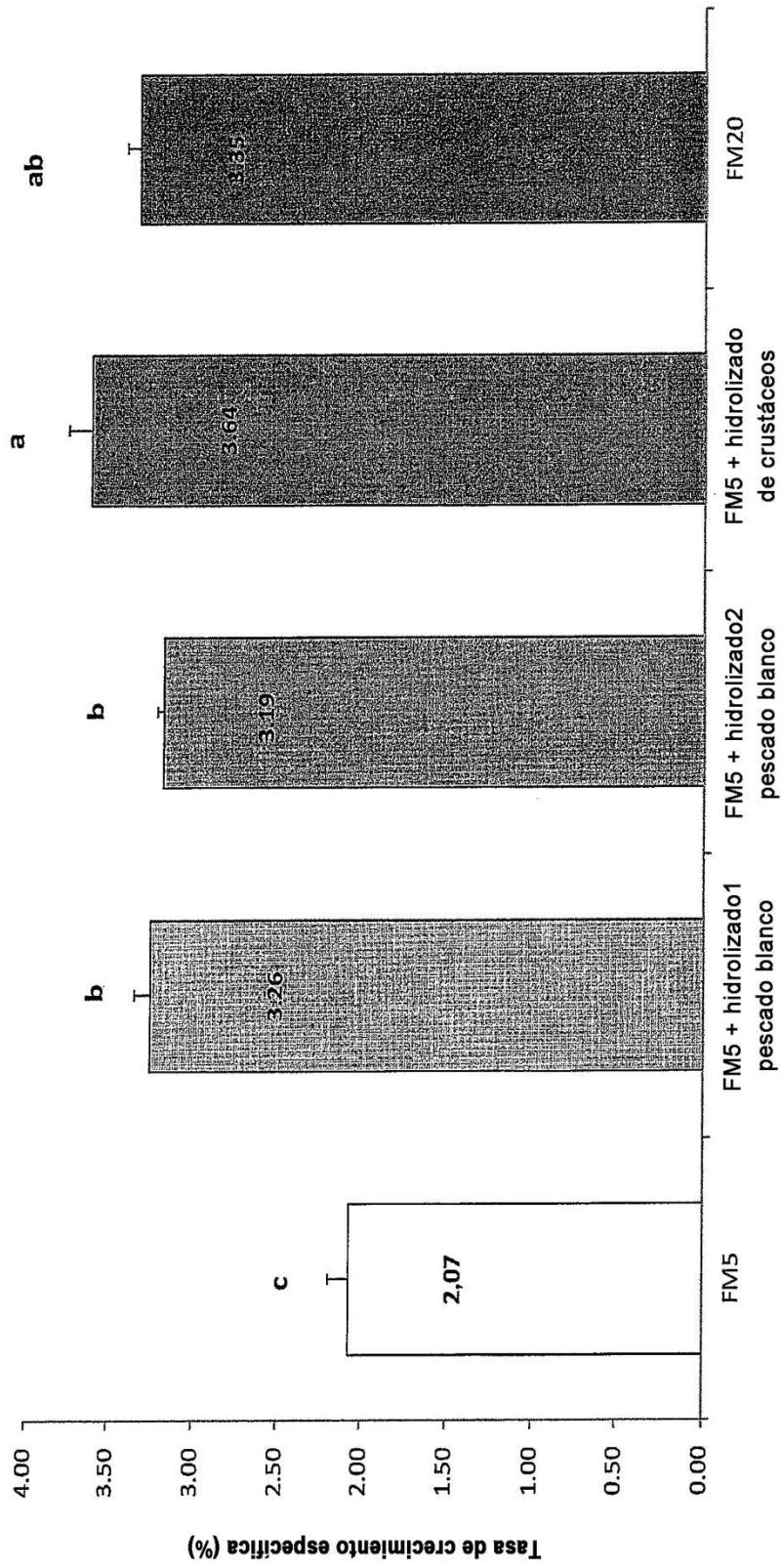


Figura 19

