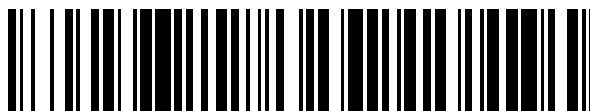


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 423**

51 Int. Cl.:

A23K 10/37 (2006.01)

A23K 10/30 (2006.01)

A23K 20/158 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

A01K 61/10 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2014 PCT/IB2014/058759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14122571**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2014 E 14707838 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2953478**

54 Título: **Método de producción de alimentos para peces enriquecidos con lípidos polares y método para enriquecer peces cultivados**

30 Prioridad:

05.02.2013 GR 20130100063

05.02.2013 GR 20130100064

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

28.05.2020

73 Titular/es:

NIREUS AQUACULTURE S.A (25.0%)

1st km. Koropiou-Varis Ave.

19400 Koropi-Attica, GR;

DEMOPOULOS, CONSTANTINOS (25.0%);

ANTONOPOULOU, SMARAGDI (25.0%) y

ZABETAKIS, IOANNIS (25.0%)

72 Inventor/es:

DEMOPOULOS, CONSTANTINOS;

ANTONOPOULOU, SMARAGDI;

ZABETAKIS, IOANNIS y

PAPAHARISIS, LEONIDAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 763 423 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

Método de producción de alimentos para peces enriquecidos con lípidos polares y método para enriquecer peces cultivados

5 La presente invención se refiere a la producción de alimento para peces con ingredientes de aceituna destinado a peces de agua dulce y de agua salada cultivados y la acuicultura de peces de agua dulce y salada que se fortalecen o enriquecen a través de su alimentación con ingredientes que derivan de subproductos de procesamiento de aceitunas y se define en las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a peces de las familias de Sparidae, tal como dorada - nombre binomial: *Sparus aurata* - y Moronidae, tal como lubina - nombre binomial: *Dicentrarchus labrax*.

10 Las necesidades nutricionales modernas de los consumidores han cambiado drásticamente debido a las diferentes dietas seguidas en relación con las décadas anteriores. El consumo frecuente de grandes cantidades de proteínas y grasas animales es una de las principales causas de una gran cantidad de afecciones patológicas en humanos. Uno de los efectos más significativos de la dieta y el estilo de vida moderno es la aterogénesis, es decir, la formación de placa ateromatosa dentro de las arterias, que impide la circulación sanguínea y aumenta significativamente el riesgo de ataque cardíaco y accidente cerebrovascular. Los científicos de la salud humana buscan atención particular a los hábitos de consumo y la adopción de dietas particulares, como la dieta mediterránea y alimentos, que demostraron que pueden mitigar los efectos del estilo de vida moderno.

20 Las capturas de peces son parte de la dieta mediterránea y junto con una dieta cuya a la que se han reconocido efectos positivos en muchas funciones humanas importantes. Sin embargo, una característica del pescado cultivado es el mayor contenido de grasa en relación con las capturas de pescado correspondientes de la pesca. Hasta la fecha, ha habido pocos intentos de incluir productos de procesamiento de aceitunas en alimentos para peces y pruebas en piscicultura – véase por ejemplo Nasopoulou C. et al. (2011). Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and seabass (*Dicentrarchus labrax*). Food Chemistry 129, 1108-1113. Un motivo para introducir subproductos de aceituna en alimento para peces es financiero debido al bajo costo de adquisición de productos de procesamiento de aceitunas. Se ha mostrado especial interés en la explotación/uso del aceite de pulpa de aceituna principalmente como fuente de energía adecuada crecimiento de peces. Sin embargo, hasta la fecha ha habido casos en los que el uso de orujo de aceituna provocó un crecimiento lento de los peces, probablemente debido al alto contenido de fibra y, finalmente, a problemas intestinales nutricionales graves y una mayor mortalidad de los peces.

30 Un objeto de la presente invención es un alimento para peces y un método de alimentación de peces, que cuando se aplica a piscicultura, da como resultado peces, que impiden la formación de placa ateromatosa en las arterias humanas.

35 El alimento para peces según la invención contiene orujo de aceituna, que incluye lípidos polares con acción del factor de activación antiplaqueta. El contenido de peso del orujo de aceituna en el alimento para peces está en un intervalo de 3,1% a 7,7% del peso del alimento para peces.

Según el método de producción según la invención, el orujo de aceituna se mezcla con harinas vegetales y/o harinas animales. El peso del orujo de aceituna está en el intervalo de 3,1 gramos a 7,7 gramos por 100 gramos de alimento para peces.

40 Según el método de la invención se enriquecen peces de la familia de Sparidea o la familia de Moronidae con lípidos polares que se obtienen de productos de aceituna al alimentar a los peces con alimento para peces y que comprenden orujo de aceituna.

45 El orujo de aceituna que se utiliza tiene una humedad en el intervalo de 2% a 40%, preferiblemente de 6% a 15%. El orujo de aceituna es la única sustancia en el alimento para peces, que se origina de aceitunas en el alimento para peces y enriquece el alimento para peces con ácido caprílico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido linoleico y ácido linoléico ω 3.

Peces de la familia Sparidea o de la familia Moronidae producidos según el método de la invención contiene en su carne lípidos polares biológicamente activos del orujo de aceituna que actúan como inhibidores o agonistas del factor activador de plaquetas. Tales peces evitan la formación de lesiones ateroscleróticas en experimentos in vivo con conejos.

50 La exitosa cría de peces de agua dulce y salada utiliza alimentos artificiales que contienen orujo de aceituna. Tal alimento para peces y tal método da como resultado el fortalecimiento de la carne de los peces con los lípidos polares que evitan la formación de aterogénesis. La cría es exitosa porque asegura el buen crecimiento de los peces sin poner en peligro su salud y con tasas de crecimiento similares o mejores con peces de la misma generación alimentados junto con alimentos para peces comerciales artificiales. La fortificación de la carne de pescado se confirmó por mediciones bioquímicas.

55

El orujo de aceituna es el subproducto obtenido durante la producción de aceite de oliva y no forma parte de la dieta normal de los peces de acuicultura de aguas saladas y dulces. Hasta la fecha, no se ha considerado el uso de orujo de aceituna en alimento para peces. Un factor que desalienta el uso de orujo de aceituna podría ser el alto porcentaje de factores antinutricionales, como las fibras que incluyen. La alimentación de peces con el alimento para peces, según la invención, fortifica los productos finales con lípidos que derivan de aceitunas de tal manera que la combinación final tiene eficacia proliferativa. Los peces que se crían con alimentos que contienen orujo de aceituna dan como resultado un nuevo alimento con mayores concentraciones de lípidos polares con actividad de factor de activación antiplaqueta (anti-PAF). La fortificación suministrada a la carne de pescado con los lípidos polares antes mencionados hace que el pescado sea un alimento adecuado para la protección contra la aterogénesis, la formación de placa ateromatosa en las arterias humanas, en el contexto de una dieta equilibrada.

A través del enriquecimiento dietético según la invención, las especies de peces de acuicultura se han enriquecido con lípidos biológicamente activos de origen de aceituna. Los lípidos polares de estos nuevos peces inhibieron la aterosclerosis cuando se suplementaron dietéticamente a conejos hipercolesterolémicos, lo que sugiere que estos nuevos peces tienen actividades cardioprotectoras importantes, lo que subraya el efecto protector del enriquecimiento con orujo de aceituna de los alimentos para peces contra enfermedades cardiovasculares. Estos componentes lipídicos contenían lípidos activos biológicos - derivados de subproductos de la producción de aceite de oliva con procedimientos específicos - que se han aclarado estructuralmente.

La combinación de la actividad biológica de lípidos de pescado y aceituna da como resultado un alimento funcional con actividad biológica enriquecida/reforzada de lípidos polares de peces y, por lo tanto, una acción protectora mejorada contra la aterogénesis y enfermedades cardiovasculares.

Efectos particulares del nuevo alimento para peces y el método de alimentación de peces se han registrado cuando se aplican al cultivo de peces de las familias

✓ Sparidae, tal como dorada - nombre binomial: *Sparus aurata* – y

✓ Moronidae, tal como lubina - nombre binomial: *Dicentrarchus labrax*.

Las realizaciones de la invención se describen a continuación con referencia a las figuras 1 a 6, donde:

La figura 1 es un diagrama esquemático de la separación de lípidos totales (TL) a lípidos polares totales (TPL) y lípidos neutros totales (TNL) en las matrices alimentarias utilizadas en la presente invención.

Las figuras 2A, 2B y 2C muestran cromatogramas representativos de separación HPLC por fase normal de las fracciones lipídicas polares obtenidas de A: OK, B: alimento para peces convencional (FO_{alimento}) y C: alimento para peces enriquecido (OK_{alimento}) (el análisis se realizó en una columna NH_2 con detección UV a 208 nm, un caudal de 3 ml min^{-1} y el sistema solvente de elución como se describe en Nasopoulou et al 2013, Marine Drugs).

La figura 3 ilustra los dos grupos de conejos machos de Nueva Zelanda que se usaron en el experimento in vivo.

La figura 4 es un gráfico de barras de los datos bioquímicos al principio del experimento ($t = 0$), (barras azules = conejos del grupo A y barras amarillas = conejos del grupo B).

La figura 5 es un gráfico de barras de los datos bioquímicos al final del experimento ($t = 45$ días), (barras azules = conejos del grupo A y barras amarillas = conejos del grupo B).

La figura 6 son fotografías microscópicas indicativas que muestran el grosor de la lesión aterosclerótica en el endotelio (izquierda: conejos del grupo A y derecha: conejos del grupo B).

Producción de orujo de aceituna.

El orujo de aceituna es un subproducto de la producción de aceite de oliva; está disponible por dos procesos diferentes.

Según una alternativa, el orujo de aceituna se produce en almazaras de aceite de oliva durante el procesamiento de la aceituna, para la extracción de aceite de oliva. La recolección de aceite de oliva, en la gran mayoría de almazaras, se realiza mediante centrifugación en separadores centrífugos de dos o tres fases. El separador de dos fases produce orujo de aceituna con 64%-68% de humedad, mientras que el trifásico produce orujo de aceituna con 48%-54% de humedad. En ambos casos, el orujo de aceituna todavía contiene aceite de oliva en el orden de 8%-12% (base seca), que no se extrajo mediante el proceso de centrifugación. El orujo de aceituna se obtiene de un procesamiento adicional del orujo de aceituna que separa los líquidos del resto y mantiene la parte sólida del material.

Con la otra alternativa, el orujo de aceituna se obtiene en la planta de aceite de pulpa de aceituna. Consecutivamente, la pulpa de aceituna se transfiere a las plantas de aceite de pulpa de aceituna para extraer el aceite de oliva residual (crudo-aceite de pulpa de aceituna crudo) por el método de extracción. En las cámaras de secado de las plantas de aceite de pulpa de aceituna, la pulpa de aceituna se seca para reducir su humedad a 8%-10%. El secado se realiza en desecadores (hornos rotativos) en los que, con la ayuda de impulsores metálicos, "teje" y entra en contacto directo con una corriente de aire caliente producida por la mezcla de gases de escape del horno de combustión de la torta de

ES 2 763 423 T3

aceitunas agotada con aire ambiente. Los productos finales de este proceso son el aceite de pulpa de aceituna y orujo de aceituna.

Los datos del análisis cualitativo del orujo de aceituna obtenido de los procesos descritos anteriormente se dan en las tablas 1 y 2. El perfil completo de ácidos grasos del orujo de aceituna se presenta en la tabla 3.

- 5 Los datos que se refieren a procesos industriales pueden variar en un intervalo de $\pm 10\%$ debido a las desviaciones en la fabricación industrial y la precisión limitada de los equipos de pesaje y mezcla.

Tabla 1: orujo de aceituna de plantas de aceite de oliva: análisis cualitativo	
Energía total (kcal/100 gramos)	381,5
Energía total (kJ/100 gramos)	1.596,6
Lípidos (gramos/100 gramos de peso seco)	14,7
Ácidos grasos saturados (% de ácidos grasos totales)	15,5
Ácidos grasos monoinsaturados (% de ácidos grasos totales)	75,6
Ácidos grasos poliinsaturados (% de ácidos grasos totales)	8,9
Proteínas (gramos/100 gramos de peso seco)	9,2
Humedad (gramos/100 gramos de peso seco)	6,1
Ceniza (gramos/100 gramos de peso seco)	16,9
Fibra (gramos/100 gramos de peso seco)	37,3

Tabla 2: orujo de aceituna de plantas de aceite de pulpa de aceituna: análisis cualitativo		
Humedad 105°C mínimo	%	2-40
Proteínas totales	%	6-15
Lípidos totales	%	3-10
Fibra bruta	%	30-70
Ceniza total	%	3-8
Calcio total Ca	mgramos/100 gramos	100-700
Hierro total Fe	mgramos/100 gramos	10-200

Tabla 3: perfil en ácidos grasos de orujo de aceituna en gramos por 100 gramos de grasa		
Ácido caprílico	C8:0	0,05-0,50
Ácido mirístico	C14:0	0,03-0,50
Ácido palmítico	C16:0	3-23
Ácido palmitoleico	C16:1	0,20-4
Ácido esteárico	C18:0	2-9
Ácido oleico	C18:1	20-150
Ácido linoleico	C18:2	5-20
Ácido linolénico	C18:3	0,02-4
Ácido aracídico	C20:0	0,02-5
Ácido eicosénico	C20:1	0,02-5
Ácido behénico	C22:0	0,02-5
Ácido ketoleico	C22:1	0,02-5

Producción de alimentos para peces con pulpa de aceituna.

La producción de alimento para peces con la adición de orujo de aceituna comienza con la preparación de su fórmula. Dependiendo de las especies de peces a las que se destina el alimento para peces, el orujo de aceituna participa en proporciones que van desde 3,5 a 7,0 gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces (3,1 gramos a 7,7 gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces, teniendo en cuenta las desviaciones en la fabricación industrial). Las tablas 4 y 5 presentan una composición indicativa de alimentos para peces enriquecidos con orujo de aceituna que se usan como dietas de acabado, generalmente durante los últimos 2-3 meses del cultivo de pescado para dorada y lubina, respectivamente.

5

En cada caso, el propósito de preparar la fórmula es el enriquecimiento del alimento con elementos activos derivados del orujo de aceituna. La verificación de la fortificación del alimento para peces se realiza mediante un método químico que determina el perfil de ácidos grasos de alimentos, lípidos totales y lípidos polares y neutros individuales. Además, la verificación del alimento para peces se realiza mediante bioensayos in vitro que usan plaquetas de conejo lavadas y la agregación de las plaquetas se controla en un agregómetro.

10

Tabla 4: composición indicativa de alimento para peces con orujo de aceituna en kilogramos/100 kilogramos para el engorde final de dorada	
Trigo blando	9,5
Gluten de maíz	15,5
Harina de soja procesada térmicamente	22,0
Hemoglobina	7,0
Harina de pescado	22,0
Orujo de aceituna	7,0
Aceite de pescado	16,0
Regulador de fósforo	0,4
Regulador de calcio	0,1
Premezcla de vitaminas – elementos en traza	0,5
TOTAL	100,0

Tabla 5: composición indicativa de alimento para peces con orujo de aceituna en kilogramos/100 kilogramos para el engorde final de lubina	
Trigo blando	10,0
Gluten de maíz	15,4
Harina de soja procesada térmicamente	21,0
Hemoglobina	7,0
Harina de pescado	25,0
Orujo de aceituna	3,5
Aceite de pescado	17,0
Regulador de fósforo	0,4
Regulador de calcio	0,2
Premezcla de vitaminas – elementos en traza	0,5
TOTAL	100,0

15

La producción de alimento para peces con la adición de orujo de aceituna se lleva a cabo a través del proceso de extrusión. El procesamiento del alimento se realiza en una máquina de extrusión con dos tornillos (extrusora de doble tornillo) con control de densidad a 670 kilogramos/m³ (control de densidad) y control de la energía mecánica suministrada, que llega hasta 24 Wh/kilogramo, proporciona el amasado y la cocción del alimento correctos y las propiedades físicas y nutricionales correctas.

Durante estos procesos, la preparación y mezcla de materiales se realiza inicialmente fuera, seguido de cocción con la adición de agua y vapor, aglutinación y conformación del alimento, ya sea por el procedimiento de extrusión o con el de granulación, conformación del alimento, secado, enfriamiento y envasado. A continuación se presentan brevemente las etapas de producción del alimento para peces. Pueden existir ligeras variaciones en las condiciones de producción, como en las fórmulas, dependiendo de las particularidades de las especies de peces cultivados:

- 5 1. Recepción y almacenamiento de materias primas.
2. Pesaje de dosificación de cada materia prima en forma seca, de acuerdo con la fórmula. Ejemplos de fórmulas se muestran en las tablas 3 y 4.
3. Premezcla y molienda fina de materias primas de tamaño inferior a 1 milímetro.
- 10 4. Mezcla completa de materias primas para producir una mezcla.
5. Ajuste de la temperatura de la mezcla a 95°C (°C denota grados Celsius) y la humedad a 30% de la mezcla, al agregar 21% de agua y 7% de vapor, lejos de la formación de la mezcla en pasta.
- 15 6. Aglutinación y formación del alimento por un proceso de extrusión (extrusión) que expone la pasta a condiciones de aumento progresivo de temperatura hasta un máximo de 120°C. y presión: la presión máxima aplicada es 200 bar – durante 40 a 60 segundos en cilindro de extrusión (extrusora).
7. Extrusión de la pasta desde el cilindro de presión a través de una matriz calibrada al diámetro deseado.
8. Corte de la pasta a la longitud deseada.
9. Tamizado.
10. Secado (para ajustar la humedad deseada).
- 20 11. Adición de grasa/aceite, por ejemplo, aceite de pescado, en condiciones de vacío, según la fórmula. Se dan ejemplos de fórmulas en las tablas 3 y 4.
12. Enfriamiento del producto a temperatura ambiente.
13. Tamizado final.
14. Envasado y almacenamiento.
- 25 Ejemplos de especificaciones de alimentos para peces enriquecidos con orujo de aceituna utilizados hasta ahora para dorada y lubina se dan en las tablas 6a y 6b, respectivamente.

Tabla 6a: especificaciones del alimento para peces con orujo de aceituna para dorada		
Humedad 105°C máximo	%	10,00
Mínimo % participación de proteína en proteínas totales del alimento	%	30
Proporción % de proteína animal (marina + terrestre) sobre la proteína total del alimento	% / %	40/60
Fibra bruta máxima	%	5,0
Ceniza total máxima	%	9,00
Participación de orujo de aceituna	%	7,00
Energía del alimento para peces total	Mj/kilogramos	19,5
Energía del alimento para peces digestible	Mj/kilogramos	17,50
Proporción proteína digestible/energía digestible	gramos/Mj	21-24

Tabla 6b: especificaciones del alimento para peces con orujo de aceituna para lubina		
Humedad 105°C máximo	%	10,00
Mínimo % participación de proteína en proteínas totales del alimento	%	35
Proporción % de proteína animal (marina + terrestre) sobre la proteína total del alimento	% / %	50/50
Fibra bruta máxima	%	3,5

Ceniza total máxima	%	9,00
Participación de orujo de aceituna	%	3,5
Energía del alimento para peces total	Mj/kilogramos	21,5
Energía del alimento para peces digestible	Mj/kilogramos	18,50
Proporción proteína digestible/energía digestible	gramos/Mj	19-24

Los ingredientes de interés para la fortificación/enriquecimiento de alimentos para peces son los lípidos polares que contienen con actividad anti-PAF. La tabla 7 a continuación muestra ejemplos indicativos de las concentraciones de los lípidos polares mencionados anteriormente en alimentos convencionales o alimentos antes de su fortificación/enriquecimiento con orujo de aceituna y aquellos que han sido fortificados con orujo de aceituna. La figura 1 representa el procedimiento experimental de separación de lípidos polares y neutros.

	Alimento convencional	Alimento fortificado
Lípidos polares (LP) gramos por cada 100 gramos de alimento de pescado	0,76 ^a	1,3 ^b

Los valores en la misma línea acompañados, como un superíndice, de una letra diferente tienen diferencia estadística significativa entre ellos (valor $p < 0,05$, es decir niveles de confianza de 95%)

El TPL del orujo de aceituna, el alimento para peces convencional (FO_{alimento}) y el alimento fortificado (OK_{alimento}) se han separado por cromatografía líquida de alto rendimiento y los cromatogramas típicos de estas 3 muestras se presentan en la figura 2, a continuación (orujo de aceituna en la figura 2A, FO_{alimento} en la figura 2B y OK_{alimento} en la figura 2C).

Paralelamente, se evalúa la actividad biológica de las fracciones (ver figura 2 anterior) de los lípidos polares totales (lípidos polares totales, TPL) del orujo de aceituna (OK), el alimento convencional para peces (FO_{alimento}) y el alimento fortificado (OK_{alimento}) y presentado en la tabla 8; estos datos se dan como $\mu\text{eq PAF/gramos}$.

En el caso de un compuesto que actúa como agonista de PAF, la actividad biológica se mide calculando la agregación (medida como distancia, en cm) en un agregómetro que causa el analito específico y se expresa como $\mu\text{eq PAF}$ que causa igual agregación (en cm) por gramo del analito. En el último caso, es decir, de un compuesto que actúa como inhibidor de PAF, la actividad biológica se mide por la inhibición que el analito provoca en la agregación de plaquetas inducida por PAF y se expresa como % de inhibición por gramo de analito. En ambos casos, cuanto más altos son los valores, mejor es la actividad biológica.

En la tabla 8, los agonistas débiles se dan como una cantidad de PAF ($\mu\text{eq PAF}$) que causa la misma agregación de plaquetas que el analito. La cantidad del analito se expresa como la cantidad de la muestra inicial (en gramos) que se ha separado por HPLC. En la tabla 8, se comparan las mismas cantidades de cada fracción (es decir, OK o FO_{alimento} o OK_{alimento}). De la tabla 8, se puede deducir que al comparar las fracciones de HPLC biológicamente más activas derivadas de OK, o FO_{alimento} o OK_{alimento} , las fracciones de OK y OK_{alimento} han demostrado una acción biológica aumentada/enriquecida para actuar como agonistas de PAF débiles en comparación con las fracciones correspondientes de FO_{alimento} .

Fracciones	OK	FO_{alimento}	OK_{alimento}
5	1,01±0,05 ^a	0,04±0,01 [†]	1,24±0,07 [†]
6	0,43±0,02	n.d. ^b	0,56±0,02
7	2,34±0,12	n.d	n.d

a: media de la desviación estándar de las tres mediciones; b: actividad biológica no detectada; †: diferencia estadística importante entre dieta FO y OK, según la prueba de Wilcoxon

Implementación agrícola.

Brevemente, las etapas de producción de peces en acuicultura son las siguientes:

1. Selección de peces para ser fortificados.
2. Adaptación de los peces al nuevo alimento.
- 5 3. Alimentación gradual de peces con cantidades diarias divididas en 2 o más comidas.
4. Control periódico (mensual) del crecimiento de peces con muestreo de peso.
5. Recolección frecuente de mortalidades (peces muertos).
6. Captura de pescado cercano al tamaño comercializable: verificación del progreso de fortificación de carne.
7. Captura de peces.

10 Dorada

Para dorada la intervención dietética inicial se llevó a cabo en tanques terrestres, así como en jaulas flotantes en el mar con las mismas especificaciones, es decir, fórmula de alimento, período de cultivo. En ambos casos, es decir, en tierra y en agua, los resultados fueron los mismos. A continuación se muestra una descripción del cultivo en tanques terrestres.

- 15 Las doradas con un peso promedio inicial de 280 gramos alimentadas hasta ahora con alimento artificial común para peces se colocaron en tanques de 15 m³ con almacenamiento inicial de densidad de peces de 7 kilogramos/m³ y final 12,5 kilogramos/m³. Hasta la fase de fortalecimiento/enriquecimiento, los peces se alimentaron con alimento común para peces. La temperatura del agua durante el experimento varió de 19°C a 24°C -°C denota grado Celsius-
- 20 aumentando gradualmente de abril a agosto. La salinidad del agua salada era del 0,32% y el agua se intercambiaba cada hora. Los peces se alimentaron con dos comidas diarias, con una cantidad de alimento de 0,8%-1,16% de su peso. El alimento se administra con baja velocidad y precaución adicional para asegurarse de que sea aceptable para los peces. Después de la densidad inicial, se realizó un muestreo para controlar su peso en 79 días, mientras que la captura de peces se realizó en 117 días. Las doradas aceptaron su alimentación sin problemas particulares y mostraron muy buena velocidad de crecimiento. La tasa de conversión de alimento (FCR), es decir, la masa de
- 25 alimento para peces que se convierte en biomasa de peces, fue igual a 1,82 y la mortalidad fue baja, igual a 0,2%.

Lubina

- Se colocaron lubinas con un peso promedio inicial de 150 gramos alimentados hasta ahora con alimento común artificial para peces en una jaula flotante de peces de 4 m x 4 m y 3,5 m de profundidad en agua de mar con salinidad del 0,32%. Hasta la fase de fortificación/enriquecimiento, los peces se alimentaron con alimento común para peces.
- 30 Los peces se alimentaron con dos comidas diarias, con una cantidad de alimento de 0,65%-1,59% de densidad de su peso. La alimentación se da a baja velocidad en este caso también y precaución adicional para asegurarse de que sea aceptable para los peces. Después de la densidad inicial, se realizó un muestreo mensual para controlar el peso y la finalización de la intervención nutricional fue de 190 días después de su inicio. La lubina mostró una aceptación relativamente menor del alimento en relación con la dorada y una alta tasa de conversión de alimento (FCR = 3,42).
- 35 También mostró una mayor mortalidad del 20%. Una vez finalizado el cultivo experimental, se realizó un control de calidad de las grasas como una evaluación inicial del progreso de la fortificación de la carne. Incluso con el índice FCR más alto y la mortalidad significativamente más alta comparado con la dorada, el ensayo se evaluó como positivo, incluso en comparación con otros en los que no tuvo éxito el crecimiento de biomasa y se registraron mayores mortalidades.
- 40 La tabla 9 muestra los datos agregados del proceso de cultivo de fortificación de peces llevado a cabo. Resultados positivos en términos de tasa de crecimiento específico (SGR), tasa de conversión alimenticia (FCR) y tasa de mortalidad, aunque los resultados de FCR y tasa de mortalidad de la lubina no es tan buena como la de dorada.

Tabla 9: datos de cultivo		
	Dorada	Lubina
Densidad inicial de stock de peces (kilogramos/m ³)	11,7	6,19
Densidad final de stock de peces (kilogramos/m ³)	20,8	11,50
Tasa de crecimiento específica (SGR %)	0,57	0,49
Tasa de alimentación (FR %)	0,8-1,16	0,65-1,59
Tasa conversión alimento (FCR)	1,82	3,42

Tasa mortalidad (%)	0,2	20
Peso medio inicial (gramos)	284	150
Peso medio final (gramos)	506	390

Una nota explicativa en lo anterior es que la tasa de alimentación, como se indica en la tabla 9, depende del peso del pez y la temperatura del agua del hábitat del pez. La aceptación del alimento del pez no es un proceso automático. Se ve afectado por la fisiología de los peces. Además, se ve afectado por la composición del alimento y depende de cuántos días le llevará completar la fortificación.

- 5 La duración del cultivo para una fortificación exitosa depende del pez, el alimento y el resultado final, es decir, 40-190 días para dorada y 90-250 días para lubina. El resultado técnico de la fortificación de peces implica una técnica en términos del tipo de alimento que se administra, su composición y su duración.

- 10 Con la finalización del proceso de producción, se realizó una primera verificación del éxito de la fortificación de carne en dorada. Esta prueba está relacionada con la comparación del perfil de ácidos grasos en la carne de pescado al principio y al final del experimento. La tabla 10 presenta el efecto del alimento sobre el perfil de ácidos grasos en la carne de dorada y lubina se muestran con el aumento de ácidos grasos monoinsaturados y la reducción correspondiente de ácidos grasos poliinsaturados.

	Dorada		Lubina	
	Principio	Final	Principio	Final
Palmítico C 16:0	6,44 ^a	14,51 ^b	7,2 ^a	17,27 ^b
Oleico C 18:1	16,02 ^a	31,86 ^b	16,85 ^a	22,20 ^b
Linoleico C 18:2	12,76	12,05	11,78	11,27
EPA C 20:5 ω 3	10,02 ^a	2,44 ^b	11,56 ^a	7,94 ^b
OPA C 22:5 ω 3	6,26 ^a	1,85 ^b	6,87 ^a	1,10 ^b
OHA C 22:6 ω 3	18,74 ^a	7,24 ^b	19,51 ^a	7,39 ^b
Saturados	9,88 ^a	21,90 ^b	12,56 ^a	26,19 ^b
Monoinsaturados	48,26	48,26	40,93	39,28
Poliinsaturados	59,65 ^a	29,83 ^b	51,63 ^a	34,53 ^b

Los valores en la misma línea acompañados de una letra diferente tienen una diferencia estadística significativa entre ellos ($p < 0,05$, es decir niveles de confianza de 95%)

Eficacia verificación de la fortificación de carne de pescado.

- 15 Los ingredientes de interés para la fortificación de peces y la mejora de su acción contra la aterogénesis son los lípidos polares que contienen. Los análisis realizados para confirmar la fortificación se relacionan con la concentración de lípidos totales y lípidos polares, así como a la actividad biológica de fracciones de agonista de PAF e inhibidor de PAF. En el primer caso, la actividad del agonista de PAF se evalúa por los cm de agregación plaquetaria. En el caso del inhibidor de PAF, la actividad biológica se evalúa mediante el% de inhibición de la agregación plaquetaria inducida por PAF. La tabla 11, a continuación, presenta ejemplos de la concentración de lípidos polares total por cada 100 gramos de filete de pescado comestible para las especies dorada y lubina.
- 20

	Dorada	Lubina
	LP (gramos)/ 100 gramos carne	LP (gramos)/100 gramos carne
Convencional	0,51	0,90
Fortificado	0,80	1,59

Las tablas 12 y 13 muestran ejemplos de la actividad biológica de fracciones en términos de agonistas de PAF expresados como μ g PAF/gramo de muestra inicial antes de la separación por HPLC y actividad biológica de

5 fracciones en términos de inhibidores de PAF expresados como % de inhibición de la agregación inducida por PAF/gramo de muestra inicial antes de la separación por HPLC. En la tabla 12, la actividad biológica se midió en lípidos polares totales obtenidos/extraídos de la carne de pescado convencional (inicial) y fortificado (final) mientras que en la tabla 13, la actividad biológica se midió en lípidos polares totales obtenidos/extraídos de la carne de peces alimentados con FO_{alimento} y peces alimentados con OK_{alimento}. La tabla 12 muestra que las fracciones correspondientes de peces enriquecidos han mostrado una mayor actividad biológica como agonistas débiles de PAF. Como se explicó anteriormente, los agonistas de PAF finalmente actúan como inhibidores de PAF ya que compiten con PAF para "ocupar" los mismos "bolsillos" del receptor e inhibir así la acción de PAF y posteriormente actuar como agentes antiinflamatorios.

Tabla 12: resultados de la prueba de actividad biológica en dorada al principio y final de la fortificación

Fracción polar HPLC	Convencional (principio) dorada peq PAF/gramos	Fortificado (final) dorada peq PAF/gramos
1	0,13±0,01 ^{a,†}	0,30±0,01 [†]
3	0,04±0,01	n.d. ^b
4	0,11±0,01 [†]	0,25±0,01 [†]
5	0,11±0,01 [†]	0,24±0,01 [†]
6	n.d.	0,23±0,01
7	0,11±0,01 [†]	0,26±0,01 [†]
8	0,16±0,01 [†]	0,28±0,02 [†]

a: media de las tres mediciones + DE; b: actividad biológica no detectada; †: diferencia estadística importante entre principio y final de la fortificación, según la prueba de Wilcoxon

10

Tabla 13: Resultados de la prueba de actividad biológica en cultivo de lubina con FO_{alimento} y OK_{alimento}

Fracción de lípidos polares HPLC	Tiempo de retención (Tr, min)	Peces alimentados con FO _{alimento}		Peces alimentados con OK _{alimento}	
		Agregación peq PAF/gramos	% inhibición	Agregación peq PAF/gramos	% inhibición
1	0-4	0,0±0,0	100±8,0	0,0±0,0	100±9,1
2	4-5	0,0±0,0	91±7,8	0,0±0,0	80±6,7
3	5-12	0,0±0,0	40±3,6	0,0±0,0	27±2,2
4	12-18	0,0±0,0	56±4,1	0,0±0,0	73±5,7
5	18-28,5	0,0±0,0	56±4,6	0,0±0,0	72±5,9
6	28,5-39,5	0,0±0,0	68±7,3	0,0±0,0	24±3,5
7	39,5-47	0,0±0,0	71±7,1	1,3±0,3	0,0±0,0
8	47-58	0,0±0,0	35±3,1	0,0±0,0	36±2,9
9	58-62	0,0±0,0	32±2,8	6,5±2,1	0,0±0,0
10	62-68,3	0,0±0,0	56±4,8	0,0±0,0	5,0±1,2
11	68,3-70,9	0,0±0,0	32±2,2	0,0±0,0	70±5,3
12	70,9-71,3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	47±3,9
13	71,3-75,2	0,0±0,0	17±2,2	0,0±0,0	100±8,9
14	75,2-77,1	0,0±0,0	66±6,9	0,0±0,0	80±7,3
15	77,1-78,3	0,0±0,0	93±7,9	2,9±0,7	0,0±0,0
16	78,3-84	0,0±0,0	97±8,2	0,0±0,0	100±9,5

Tabla 13: Resultados de la prueba de actividad biológica en cultivo de lubina con FO_{alimento} y OK_{alimento}

Fracción de lípidos polares HPLC	Tiempo de retención (Tr, min)	Peces alimentados con FO _{alimento}		Peces alimentados con OK _{alimento}	
		Agregación peq PAF/gramos	% inhibición	Agregación peq PAF/gramos	% inhibición
17	84-88	0,0±0,0	100±9,3	10,9±1,8	100±9,9
18	88-105	0,0±0,0	100±8,7	0,0±0,0	0,0±0,0

*Agregación: peq PAF/gramos en la muestra inicial antes de separación HPLC
 **% inhibición: %/gramos en la muestra inicial antes de separación HPLC

De la tabla 13, se puede deducir que, en general, las actividades biológicas de las fracciones de HPLC de los lípidos polares de los peces enriquecidos son más altas/más fuertes que las de las fracciones de HPLC correspondientes de los lípidos polares de los peces convencionales, dado que la actividad inhibitoria es mayor en la mayoría de las fracciones, y también en otras 3 fracciones, los lípidos polares de peces enriquecidos también tienen actividades de agregación que actúan como agonistas de PAF; como se explicó antes, estas actividades de agregación son positivas en términos de propiedades antiinflamatorias.

Se descubrió que los peces que se alimentan con un alimento para peces que contiene orujo de aceituna están fortificados con nutrientes deseables. Las concentraciones, especialmente estas de lípidos polares, aumentan significativamente en la carne de pescado y es posible convertirse en alimentos funcionales para la protección contra la aterogénesis (dos columnas a la derecha en la tabla 13 anterior). El método de alimentación depende de las especies de peces. Ejemplos de resultados de pruebas con dorada (*Sparus aurata*) de la familia Sparidae y lubina (*Dicentrarchus labrax*) de la familia Moronidae ilustraron las ventajas del alimento para peces, incluido orujo de aceituna seco. La misma metodología para enriquecer la carne de pescado con lípidos polares se utiliza en el caso de especies de agua dulce, con adaptaciones en la formulación del alimento y técnicas de cultivo. Los peces enriquecidos con lípidos polares de orujo de aceituna son excelentes para inhibir la aterogénesis.

La invención permite la incorporación de orujo de aceituna en alimentos para peces sin presentar problemas importantes de crecimiento. Para una fortificación muy ventajosa de carne de pescado con lípidos polares la combinación de la participación máxima permitida en las raciones, el contenido de orujo de aceituna seco en el alimento para peces, la ingesta diaria de alimento por pez y el período de esta intervención nutricional deben seleccionarse de acuerdo con las especies de peces. Debido al hecho de que el alimento específico se administra solo en la etapa final del crecimiento de los peces y en un período de tiempo específico, el período de fortificación varía dependiendo de las especies de peces y la composición del alimento para peces. En cada caso, se requiere un período de ajuste.

Experimentos en vivo con dorada con OK_{alimento}

Con experimentos se ha concluido que al estudiar conejos alimentados con una dieta aterogénica (es decir, alimento para conejos suplementado con 1% de peso/peso de colesterol) durante 45 días suplementados con los lípidos polares totales de peces cultivados usando OK_{alimento}, la formación de lesiones ateroscleróticas se ha reducido a diferencia de conejos alimentados solo con una dieta aterogénica (es decir, alimento para conejos suplementado con 1% de peso/peso de colesterol). Estos experimentos se explican a continuación.

En un experimento in vivo, el TPL obtenido de la dorada alimentada con OK_{alimento} se ha alimentado a conejos y se han estudiado sus efectos sobre el desarrollo de enfermedades del corazón, midiendo el grosor de la lesión ateromática.

En resumen, siguiendo el procedimiento de extracción experimental como se describe en la figura 1 anterior, se han utilizado 12,3 kilogramos de filetes magros de dorada alimentada con OK_{alimento} y se han extraído los lípidos totales (TL) utilizando el método Bligh-Dyer. TL se han separado además de los lípidos polares totales (TPL) y los lípidos neutros totales (TNL) por distribución a contracorriente (ver figura 1, anterior).

Se han obtenido 97,6 gramos de TPL y durante el experimento in vivo se han suplementado 0,48 gramos a cada conejo diariamente; el concepto científico detrás de estas cantidades se basa en el hecho de que 0,48 gramos de TPL son equivalentes a 60 gramos de filete de pescado por día por conejo.

Se han utilizado 12 conejos sanos de Nueva Zelanda machos. Los animales se mantuvieron en jaulas inoxidables especiales a temperatura constante (19±1°C), humedad relativa (55±5%), aireación (12 cambios completos de aire por hora) y relación de luz/oscuridad (12h/12h). El experimento in vivo se realizó bajo los requisitos legales de EC 609/86is en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Atenas.

- 5 Los animales utilizados en el experimento in vivo son conejos machos de Nueva Zelanda ya que el metabolismo de estos animales es lo más cercano posible para el metabolismo humano. Por ejemplo, las lipoproteínas de conejo que contienen apo-lipoproteína B (apo-B) son similares a las humanas. Además, el hígado de conejo y el hígado humano producen lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que contienen apo-B100. Finalmente, las proteínas de transferencia de éster de colesterol (CETP) abundan tanto en conejos como en humanos. Debido a los altos niveles de CETP, estos animales son capaces de desarrollar lesiones ateroscleróticas en solo 6 semanas cuando se les alimenta con una dieta aterogénica adecuada (es decir, alimento para conejos enriquecido con 1% de peso/peso de colesterol).
- 10 En el experimento in vivo de la presente invención, los conejos se han separado en 2 grupos como se muestra en la figura 3.
- Características bioquímicas de los conejos al comienzo de la intervención dietética (t = 0 días).
- 15 Al comienzo del experimento, se midieron los siguientes parámetros bioquímicos: colesterol total (CHOL), colesterol de alta densidad (HDL), colesterol de baja densidad (LDL), triglicéridos (TRIG), glucosa (GLUC), fosfatasa alcalina (ALP) y también las enzimas hepáticas SGOT, SGPT y γ -GT (figura 4). De la figura 4, se puede deducir que las características bioquímicas de la sangre de los conejos de los dos grupos no difieren.
- Características bioquímicas de los conejos al final de la intervención dietética (t = 45 días).
- 20 Durante la intervención dietética, los animales no desarrollaron ninguna enfermedad (p. ej., padecimiento, diarrea) que pudiera estar relacionada con la suplementación de los lípidos polares totales de la dorada alimentada con OK_{alimento}. Por el contrario, hubo una tendencia de preferencia de conejos hacia la dieta que contiene los lípidos polares totales de los peces.
- Al final de la intervención dietética, se han medido los mismos parámetros bioquímicos que en el tiempo t = 0 y los resultados se muestran en la figura 5. De la figura 5, se puede deducir que los parámetros bioquímicos en ambos grupos no muestran diferencias estadísticamente significativas.
- 25 Los niveles de colesterol total y lipoproteína de baja densidad se han medido en t = 45 días y estos resultados también se muestran en la figura 5. No se han observado diferencias estadísticamente significativas.
- La influencia de la intervención dietética en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.
- Al final del experimento, los animales se han sometido a eutanasia y se han obtenido sus arterias sanguíneas. Se ha llevado a cabo análisis morfométrico de arterias las lesiones midiendo el grosor de la placa ateromática (es decir, desde la parte sana del endotelio hasta el borde de las células de espuma); todas las medidas están en nm.
- 30 El consumo de lípidos polares totales de peces alimentados con OK_{alimento} ha beneficiado a los animales del grupo B ya que se ha encontrado que las lesiones ateroscleróticas del grupo B son más delgadas en un 59% en comparación con las correspondientes del grupo A (véase la figura 6, a la izquierda una arteria del grupo A y a la derecha una arteria del grupo B).
- 35 Los peces que se alimentan con alimento para peces enriquecido con orujo de aceituna según la presente invención pueden inhibir la aterosclerosis in vivo y, por lo tanto, este pescado tiene fuertes propiedades cardioprotectoras in vivo. Con la presente invención, la inclusión del orujo de aceituna en los alimentos para peces de acuicultura se realizó de tal manera que se equilibren los efectos negativos sobre la mortalidad de los peces debido al alto contenido de fibra del orujo de aceituna. Cabe señalar que los datos que se refieren a procesos industriales, es decir, la preparación de alimentos para peces y el proceso de enriquecimiento de peces, pueden variar en un intervalo $\pm 10\%$ debido a desviaciones en la fabricación industrial y precisión limitada de los equipos de pesaje y mezcla.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Alimento para peces de especies marinas y de agua dulce enriquecido con lípidos polares, el alimento para peces incluye sustancias procedentes de aceitunas caracterizadas porque el alimento para peces contiene además orujo de aceituna, que incluye lípidos polares con acción factor de activación anti plaquetas y el contenido en peso del orujo de aceituna en el alimento para peces está en un intervalo de 3,1% a 7,7% del peso del alimento para peces.
2. Alimento para peces según la reivindicación 1, en donde el alimento para peces incluye orujo de aceituna que tiene humedad en un intervalo de 2% a 40%, preferiblemente de 6% a 15%.
3. Alimento para peces según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la única sustancia en el alimento para peces, que se origina en las aceitunas es dicho orujo de aceituna.
4. Alimento para peces según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el alimento para peces incluye los siguientes ácidos grasos: ácido caprílico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido linoleico y ácido linolénico.
5. Alimento para peces según la reivindicación 4, en donde el alimento para peces incluye los siguientes ácidos en gramos por 100 gramos de grasas:
 - ácido caprílico: 0,05 gramos a 0,50 gramos
 - ácido palmítico: 3 gramos a 23 gramos
 - ácido palmitoleico: 0,20 gramos a 4 gramos
 - ácido esteárico: 2 gramos a 9 gramos
 - ácido linoleico: 5 gramos a 20 gramos
 - ácido linolénico: 0,02 gramos a 4 gramos
6. Alimento para peces según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el alimento para peces incluye 7±10% gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces o 3,5±10% gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces.
7. Método de producción de alimento para peces, que incluye la mezcla de orujo de aceituna con comidas vegetales y/o comidas animales, en donde el peso del orujo de aceituna está en el intervalo de 3,1 gramos a 7,7 gramos por 100 gramos de alimento para peces.
8. Método de producción de alimento para peces según la reivindicación 7, en donde el orujo de aceituna se obtiene del procesamiento de pulpa de aceituna y tiene las siguientes características:
 - humedad de 6% a 15% a 105 grados Celsius,
 - sustancias nitrogenadas totales, es decir, cantidad de nitrógeno multiplicada por 6,25, de 6% a 15%,
 - grasa total después de hidrólisis con ácido clorhídrico de 3% a 10%,
 - fibras crudas de 30% a 70%,
 - ceniza total de 3% a 8%,
 - Ca calcio total de 100 a 700 gramos por 100 gramos de orujo de aceituna,
 - Fe hierro total de 10 gramos a 200 gramos por 100 gramos de orujo de aceituna.
9. Método de producción de alimento para peces según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la temperatura máxima durante la producción de alimento para peces es de 120 grados Celsius (°C).
10. Método de producción de alimento para peces según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el orujo de aceituna enriquece el alimento para peces con lípidos polares, preferiblemente con ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido palmitoleico.
11. Método de enriquecimiento de peces de la familia de Sparidae o de la familia de Moronidae con lípidos polares obtenidos de productos de aceituna al alimentar a los peces con alimento para peces, caracterizado porque el alimento para peces contiene de 3,1 gramos a 7,7 gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces.
12. Método de enriquecimiento de peces según la reivindicación 11, en donde el método incluye i) almacenar los peces en medios de almacenamiento de peces con una densidad en el intervalo de 6,19 kg/m³ a 11,77 kg/m³, ii) la

temperatura del agua en el medio de almacenamiento de peces está entre 19°C y 24°C y iv) los peces se cosechan cuando la densidad de los peces en el medio de almacenamiento de peces está entre 11,5 kg/m³ y 20,8 kg/m³.

- 5 13. Método de enriquecimiento de peces según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde los peces se alimentan con alimento para peces dos veces al día y el alimento para peces que se proporciona cada vez a los peces es entre 0,65% y 1,59% del peso de los peces, preferiblemente entre 0,8% y 1,16% del peso de los peces
14. Método de enriquecimiento de peces según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde los peces son dorada o lubina y el contenido de orujo de aceituna es $7\pm 10\%$ gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces en caso de que el pescado sea dorada y $3,5\pm 10\%$ gramos de orujo de aceituna por 100 gramos de alimento para peces en caso de que el pescado sea lubina.
- 10 15. Método de enriquecimiento de peces según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la alimentación de los peces con dicho alimento para peces dura de 40 a 250 días.
16. Método de enriquecimiento de peces según la reivindicación 15, en donde la alimentación de los peces con dicho alimento para peces dura de 40 a 190 días en caso de que el pez sea dorada y de 90 a 250 días en caso de que el pez sea lubina.
- 15 17. Método de cultivo de peces de la familia de Sparidae o la familia de Moronidae, en donde el método incluye una fase inicial de pre-crecimiento y un proceso de enriquecimiento, y en donde el proceso de enriquecimiento es según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 11 a 16.

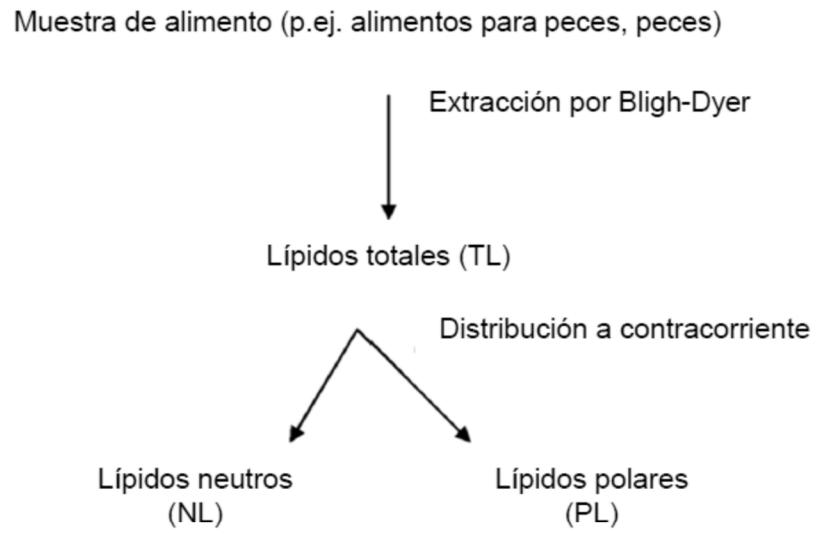


FIGURA 1

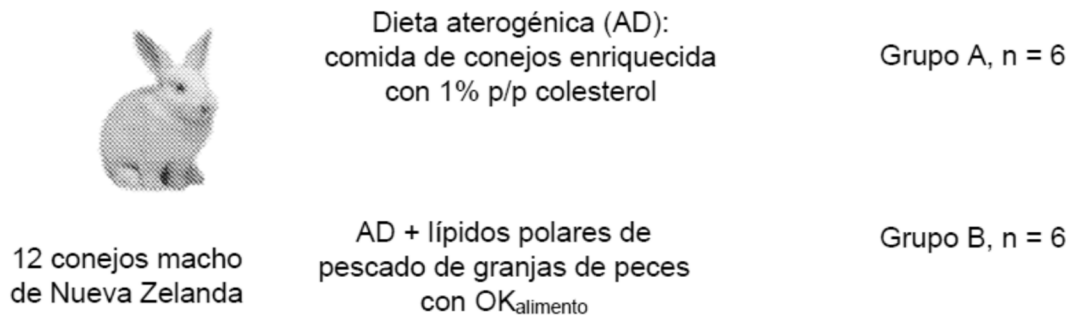
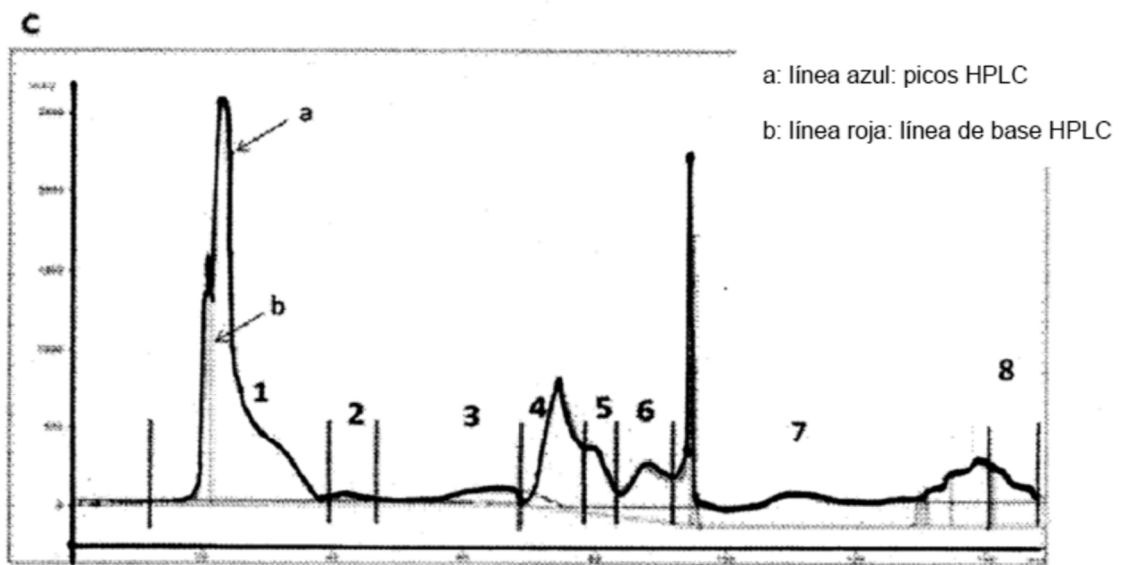
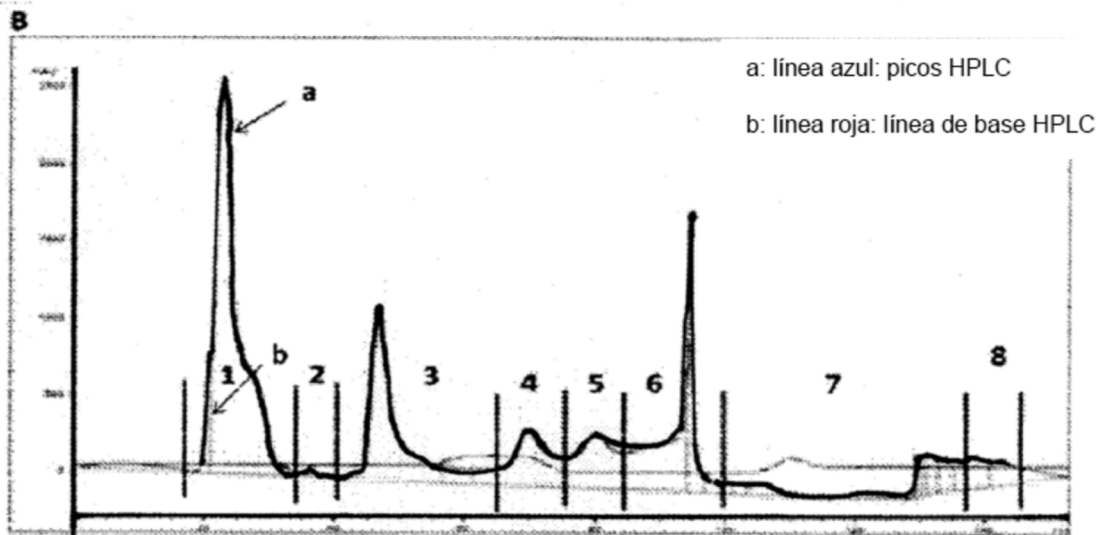
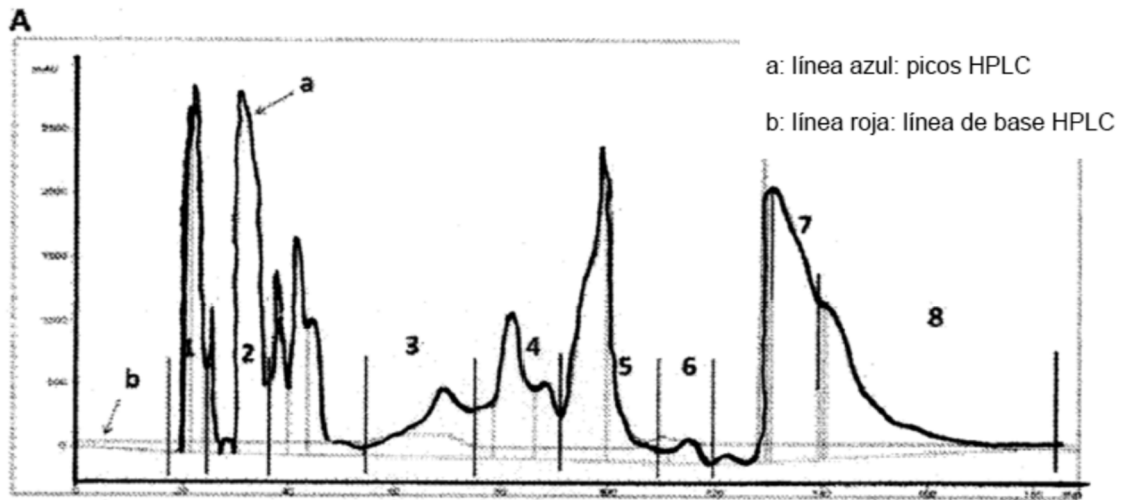


FIGURA 3



FIGURAS 2A, 2B, 2C (A: arriba, B: centro, C: abajo)

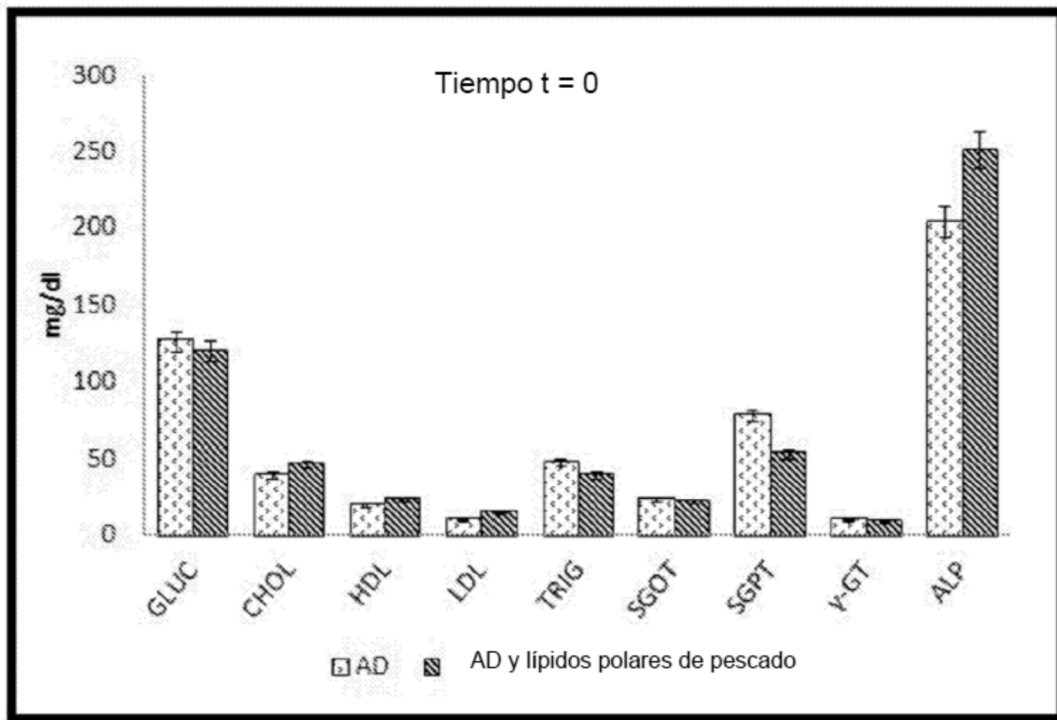


FIGURA 4

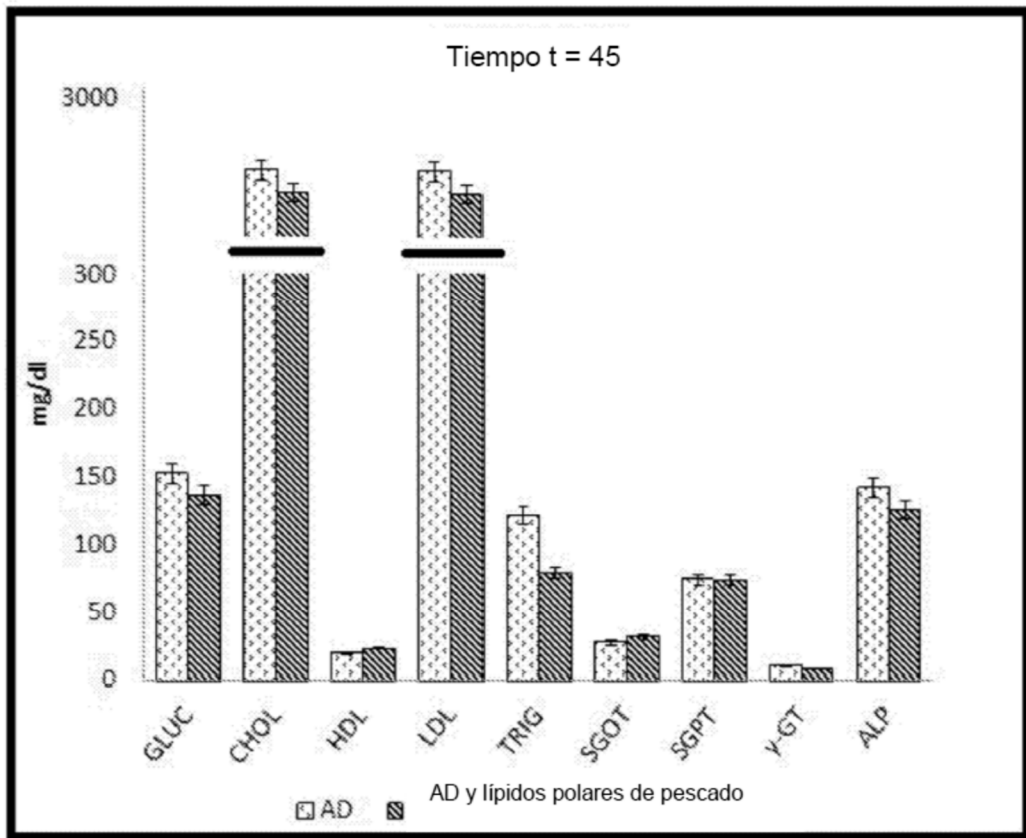


FIGURA 5

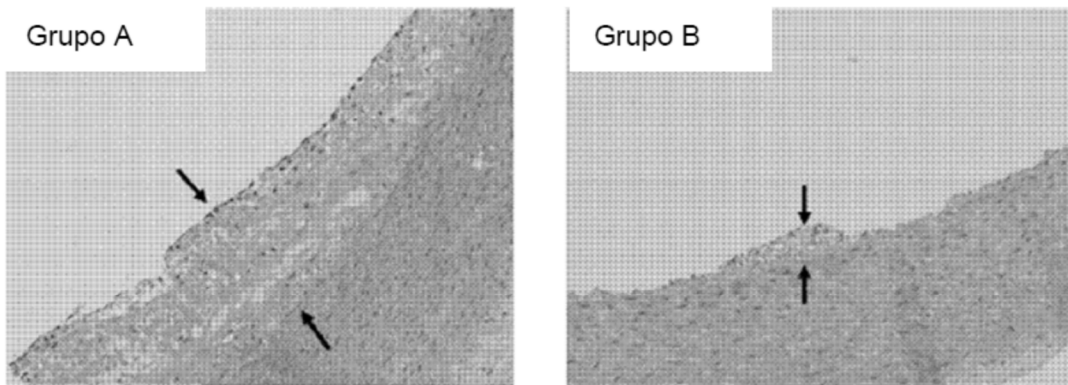


FIGURA 6