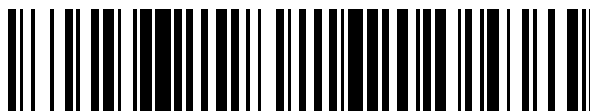


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 022**

51 Int. Cl.:

A23L 17/50 (2006.01)

A23L 33/12 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

A01K 61/54 (2007.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2012** **E 12180725 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 2559342**

54 Título: **Procedimiento para mejorar el valor nutricional de las ostras por estabulación en presencia de microalgas**

30 Prioridad:

16.08.2011 FR 1157359

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

09.07.2020

73 Titular/es:

FERMENTALG (100.0%)
4 rue Rivière
33500 Libourne, FR

72 Inventor/es:

CALLEJA, M. PIERRE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 022 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

Procedimiento para mejorar el valor nutricional de las ostras por estabulación en presencia de microalgas

La invención se refiere a los campos de la ostricultura y de la alimentación.

5 Un molusco filtrador es un molusco de concha tal como un mejillón, una zamburiña, una vieira o concha de peregrino, una ostra, un berberecho o un abulón, que filtra el agua de mar y fija los nutrientes y otros principios activos presentes en las microalgas, es decir que retiene en sus tejidos una parte de dichos nutrientes o principios activos contenidos en las microalgas. En algunos casos, los nutrientes se acumulan en los tejidos y se concentran allí.

10 La invención se refiere por tanto, a un procedimiento para mejorar la carne de las ostras, y más particularmente su valor nutricional, que consiste en enriquecerlas en ciertos nutrientes, especialmente en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoide o carotenoides con ayuda de microalgas, según la reivindicación 1.

Según este procedimiento, las ostras se ponen en estabulación en agua de mar a la que se añaden las microalgas de interés, ricas en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoide o carotenoides, a una concentración que permite a los moluscos fijar en sus tejidos algunos de dichos ácidos grasos poliinsaturados y/o carotenoides.

15 El ácido o los ácidos grasos poliinsaturados contemplados por la invención se eligen entre ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido araquidónico (ARA).

Los carotenoides contemplados por la invención son astaxantina, luteína, fucoxantina, zeaxantina y/o violaxantina.

Las ostras son bivalvos marinos conocidos desde la antigüedad por sus cualidades nutricionales y dietéticas.

En este sentido, son ricas en proteínas y pobres en azúcares, grasas y colesterol, lo que las convierte en un alimento de elección para muchos regímenes alimentarios.

20 La ostra comprende especialmente muchos oligoelementos y minerales esenciales tales como zinc (6,5 mg/100 g), yodo (0,06 mg/100 g), selenio (0,06 mg/100 g), manganeso (1 mg/100 g), hierro (5,8 mg/100 g), así como calcio, magnesio, potasio, flúor y cobre. También es rica en vitaminas B y D, así como, en menor medida, en vitaminas C y E, cuyas vitaminas se conservan por el hecho de que la ostra se consume habitualmente cruda.

25 También comprende ácidos grasos poliinsaturados a razón de una media de 336 mg/100 g de carne cruda de ostra, en particular aproximadamente 146 mg de EPA/100 g de carne cruda de ostra y 71 mg de DHA/100 g de carne cruda de ostra [Composition nutritionnelle des produits aquatiques - <http://www.nutraqua.com>].

Sin embargo, este contenido de ácidos grasos poliinsaturados sigue siendo relativamente modesto con respecto a ciertos peces o crustáceos.

30 La producción francesa de ostras se eleva actualmente a alrededor de 130 000 toneladas anuales, lo que representa la mayor parte de la producción europea (alrededor del 90 %). La mayor parte de esta producción corresponde a la ostra hueca, a veces llamada ostra japonesa, cuyo nombre en latín es *Crassostrea gigas*. La ostra plana, cuyo nombre en latín es *Ostrea edulis*, también se produce ocasionalmente, por ejemplo en Bretaña o en la cuenca de Arcachon.

El cultivo de la ostra generalmente comprende tres etapas principales:

35 - La captación: las larvas (la semilla) que son planctónicas, se fijan sobre los colectores en tejas, madera, pizarra, hierro o plástico, en las zonas marítimas donde las corrientes costeras las concentran. Cuando la semilla ha crecido sobre el colector, es preciso separarla: se trata de despegar las pequeñas ostras así formadas.

40 - La crianza (o el crecimiento) de las ostras: la mayoría de las veces, esta crianza se realiza mediante un cultivo en bolsa. Se ponen las ostras jóvenes en bolsas de plástico instaladas sobre mesas de hierro sumergidas cerca de las costas, a cuyas bolsas se les da la vuelta regularmente para evitar un crecimiento en longitud, y eventualmente se vacían para calibrar las ostras y volver a meterlas en las bolsas limpias. Sin embargo, se ha demostrado que una ostra puede crecer hasta presentar un tamaño importante sin ser sin embargo un producto de calidad, debido a la delgadez de su carne. Parece en efecto, que el crecimiento de la ostra y el engorde de su carne no son necesariamente concomitantes y, a menudo, es necesaria una etapa suplementaria para hacer que se acumulen en el animal las reservas alimentarias necesarias para su engorde. Es la maduración.

45 - La maduración: se puede llevar a cabo en aguas abiertas o en estanques de maduración, generalmente denominados "claros", sobre las ostras cuyo crecimiento está o no acabado. Por maduración en aguas abiertas, se entiende una maduración realizada en un biotopo sometido sin restricción a la acción del mar. Se trata del conjunto de los parques establecidos en estuarios, bahías, puertos o lagunas en comunicación permanente con el mar (a diferencia de los sitios donde los movimientos del agua pueden ser controlados al menos parcialmente). En aguas abiertas, la maduración se puede producir acompañando al crecimiento. En este caso, el engorde depende en gran medida de la densidad de la población de ostras. Alternativamente, las ostras adultas pueden ser maduras en los claros en los últimos meses antes de su comercialización con el fin de alcanzar las cualidades gustativas y un volumen de carne

apropiados. En Francia, durante la maduración, se puede añadir al engorde otro criterio de calidad comercial de las ostras: se trata del enverdecimiento, un fenómeno producido por un alga fitoplanctónica, la *Navicule Blue*.

Es durante el curso de esta maduración cuando la ostra adquiere una tipicidad propia de su región de producción.

5 La región de Marennes-Oléron, que tiene una gran superficie de claros en un medio natural, poco profundos, excavados en un suelo arcilloso y alimentados naturalmente con agua de mar, se ha convertido en la principal región para la maduración de ostras en Francia.

Así, una ostra nacida y criada en Bretaña, en Normandía o el Mediterráneo puede, en los dos últimos meses anteriores a su consumo, ser madurada en Marennes-Oléron.

10 Esta maduración permite obtener un producto de forma homogénea, cuya carne está presente en cantidad suficiente en una forma de translúcida a blanca, a veces teñida de verde, que tiene un olor marino agradable, un gusto refinado, un sabor equilibrado (salado, y después dulce), una consistencia de blanda a ligeramente firme, y una permanencia media en boca.

Como a menudo se consumen crudas, las ostras son objeto de un seguimiento sanitario muy estricto, que implica la vigilancia de la calidad de las aguas en las que maduran.

15 En efecto, las ostras pueden dar lugar a trastornos digestivos, especialmente cuando contienen demasiadas bacterias y más particularmente cuando han filtrado agua que contiene una concentración demasiado alta de microalgas, algunas de las cuales son tóxicas. Las contaminaciones por microalgas a menudo están relacionadas con la contaminación del agua de mar, en particular la de los estanques de maduración, por nitratos de origen continental o por fenómenos de marea de bajo coeficiente que no permite una renovación suficiente del agua del mar de los parques con ostras. Entonces, las ostras concentran toxinas llamadas ficotoxinas que pueden ser tóxicas para el consumidor.

Sin embargo, esta contaminación "natural" de las zonas de crianza es reversible si se mejora la calidad del agua, porque la ostra filtra constantemente el agua de mar y rechaza gradualmente las toxinas producidas por estas algas (principalmente las dinoflageladas y diatomeas tóxicas) cuando estas desaparecen.

25 El cierre preventivo de las zonas de producción es a veces la única posibilidad de evitar las intoxicaciones alimentarias relacionadas con las microalgas.

Hasta ahora, las propiedades gastronómicas de las ostras son esencialmente las que han guiado a los ostricultores en sus técnicas de crianza, y no la obtención de un valor nutricional particular de las ostras.

30 En este contexto, la maduración tiene esencialmente por objetivo mejorar las propiedades organolépticas de las ostras y acentuar su tipicidad, con el fin de ofrecer al consumidor un producto de calidad homogénea de un año a otro. En particular, la maduración no tiene como objetivo garantizar la composición nutricional de la ostra.

En sentido opuesto a este enfoque, el inventor ha desarrollado un procedimiento de maduración que tiene por objeto mejorar el valor nutricional de las ostras, especialmente en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides.

En contra de las precauciones que se toman habitualmente en la práctica tradicional de los ostricultores, el inventor ha criado las ostras en presencia de concentraciones importantes de diferentes especies de microalgas de interés.

35 De manera sorprendente, el inventor ha podido constatar que una estabulación de las ostras en presencia de microalgas de interés, lejos de hacer que las ostras se vuelvan tóxicas, podía llevar a una mejora del valor nutricional de éstas. En particular, ha podido observar que la estabulación de las ostras en presencia de microalgas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides, permitía la fijación por parte de las ostras de un contenido importante de estos ácidos grasos y/o carotenoides.

40 Por lo tanto, el inventor ha podido establecer que, siempre que las microalgas de interés no sean productoras de toxinas, era posible añadir estas microalgas a los tanques de estabulación y madurar las ostras en buenas condiciones. a fin de obtener un aumento significativo de su contenido de diferentes nutrientes, sin modificar necesariamente sus propiedades organolépticas.

45 El inventor ha podido constatar, además, que las ostras también podían fijar otros nutrientes, tales como oligoelementos, vitaminas, agentes antioxidantes o aminoácidos esenciales, así como polisacáridos, poliósidos o glucósidos, pudiendo tener estos últimos un efecto sobre el gusto o la textura de las ostras.

La invención tiene por tanto como objetivo, un procedimiento de enriquecimiento de las ostras en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides.

50 Como ácidos grasos poliinsaturados, se contemplan el DHA (ácido docosahexaenoico, C22:6 ω 3), el EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5 ω 3) y/o el ARA (ácido araquidónico, C20:4 ω 6). Estos ácidos grasos esenciales son bien conocidos por sus efectos beneficiosos sobre el sistema nervioso y en la prevención de enfermedades cardiovasculares [Von Schacky, S. (2006) A Review of Omega-3 Ethyl Esters for Cardiovascular Prevention and

Treatment of Increased Blood Triglyceride Levels. Vasc Health Risk Manag. 2(3): 251-262]. Como carotenoides, la invención contempla astaxantina, luteína, fucoxantina, zeaxantina y/o violaxantina. Además de sus propiedades de pigmentación (del rojo al verde oscuro, pasando por el naranja y el amarillo), los carotenoides también son conocidos por sus propiedades antioxidantes.

5 El inventor ha descubierto, de forma sorprendente, que era posible aumentar el contenido de las ostras en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides de forma significativa, poniendo los moluscos filtradores en estabulación en un agua de mar que comprende una concentración apropiada de microalgas de interés que contienen tales ácidos grasos y/o carotenoides. En efecto, se puso de manifiesto que las ostras, tenían la capacidad de fijar estos ácidos grasos y/o carotenoides y de acumularlos en sus propios tejidos. El documento XP004926202 (Delaporte Maryse et al.: "Incorporation and modification of dietary fatty acids en gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*" Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology, Elsevier Science, New York, NY, US, vol. 140, nº. 4, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 460-470) describe una puesta a dieta controlada en tipo de microalgas de moluscos filtradores juveniles con el fin de evaluar el impacto de estas dietas sobre la composición en lípidos de las branquias de estos moluscos.

10 Así, según uno de los aspectos principales de la invención, el procedimiento de enriquecimiento de las ostras comprende las etapas de la reivindicación independiente 1.

La estabulación corresponde a una estancia de las ostras en un agua de mar, cuya calidad se controla.

Un estanque de agua de mar es preferiblemente una construcción que permite mantener un volumen de agua de mar relativamente constante a lo largo del tiempo, incluso en presencia de marea. Si fuera necesario, la marea puede permitir la renovación de una parte del volumen de agua de mar presente en el estanque, lo que puede requerir, según las circunstancias, tener que añadir regularmente microalgas de interés en el estanque, si la concentración de éstas disminuye. Ventajosamente, el volumen de agua de mar contenido en el estanque de agua de mar es de 1 m³ a 100 m³. El estanque de agua de mar también puede presentar la forma de una masa de agua natural, por ejemplo, con una superficie que varía de 100 m² a 1 o 2 ha.

25 Por microalgas de interés se entiende las microalgas que se seleccionan y cultivan previamente en aparatos de cultivo que permiten obtener cultivos concentrados. Las técnicas de cultivo son conocidas por los expertos en la materia. Las microalgas se pueden producir en modo autotrófico, heterotrófico o mixotrófico, según la especie. Muy a menudo, el modo de cultivo se elige para poder obtener microalgas que tengan un contenido suficiente de ácidos grasos poliinsaturados [Bahnweg, G. (1979) Studies on the physiology of *Thraustochytriales* I. Growth requirements and nitrogen nutrition of *Thraustochytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japonoichytrium* sp., *Ulkenia* spp. and *Labyrinthuloides* spp. Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 17: 245-268] [Ceron Garcia, M.C. et al. (2005) Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. Process Biochemistry 40(1):297-305].

35 Se ha determinado que un contenido de al menos 2 %, preferiblemente de al menos 5 %, y más preferiblemente de al menos 10 % de ácidos grasos poliinsaturados en peso seco sobre la materia seca de las microalgas, era deseable para que el proceso de transferencia de los ácidos grasos de las microalgas al molusco filtrador sea suficiente para obtener el enriquecimiento del molusco filtrador en un período dado.

Asimismo, un contenido de al menos 1 %, preferiblemente de al menos 2 %, más preferiblemente de al menos 3 %, incluso más preferiblemente de al menos 3,5 % en peso seco sobre la materia seca de microalgas de al menos un carotenoide, era deseable para obtener el enriquecimiento del molusco filtrador en un período dado.

Aparte de sus cualidades nutricionales como antioxidante, la fijación del carotenoide en la carne de una ostra permitirá colorear esta carne. Esto puede ser particularmente ventajoso en el caso de la fucoxantina, que contribuirá al enverdeamiento de la ostra. Además, es posible, a través de ciertos carotenoides de color anaranjado o rosado, aportar un tinte asalmonado o rosado a la ostra. Finalmente, con respecto a los mejillones, los carotenoides anaranjados pueden permitir reforzar el color anaranjado de su carne.

Además, es posible también modificar el gusto de las ostras, aportando una nota afrutada (tal como de albaricoque) y/o floral gracias al aporte de al menos un carotenoide. Finalmente, la textura de la carne de las ostras también se vuelve más blanda gracias a este aporte.

Según un modo de realización preferido, las microalgas de interés se seleccionan con ayuda de un procedimiento de cultivo en modo mixotrófico en la oscuridad pero con un aporte de luz discontinuo o variable a lo largo del tiempo y cuya intensidad en micromoles de fotones varía en una amplitud igual o mayor a 10 µmol. m⁻².s⁻¹ a razón de varias veces por hora. Tal procedimiento de cultivo permite obtener microalgas enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides. Tal procedimiento de cultivo está descrito, por ejemplo, en la solicitud WO 2012/035262.

Según la invención, la ostra está enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados y en carotenoides. En efecto, de manera ventajosa, la presencia del carotenoide en la carne del molusco filtrador (de la ostra) permite estabilizar los ácidos grasos poliinsaturados.

Ventajosamente, las microalgas de interés pueden consistir en una mezcla de diferentes especies que tengan las propiedades definidas anteriormente.

Preferiblemente, las microalgas se aportan en forma de cultivos concentrados, producidos previamente según las reglas de la técnica, especialmente para asegurar que no están contaminadas por microalgas tóxicas. A este respecto, se recomienda un control previo de la calidad del agua de mar para asegurar que no estén presentes microalgas tóxicas indeseables antes de añadir las microalgas de interés.

Se ha determinado también que las microalgas debían encontrarse preferiblemente en dicho estanque de agua de mar a una concentración óptima de al menos 10^4 células/mL para obtener un enriquecimiento rápido de las ostras en ácido o ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoide o carotenoides. Sin embargo, esta concentración puede variar según las especies de microalgas introducidas en el estanque de agua de mar.

El procedimiento de enriquecimiento según la invención se realizará justo antes de la comercialización de las ostras, más particularmente en las semanas 1 a 10 anteriores al consumo de dichas ostras. La duración del procedimiento de enriquecimiento según la invención estará ventajosamente comprendida entre 2 días y 10 semanas, preferiblemente 2 a 60 días, más preferiblemente 1 a 5 semanas.

El procedimiento de enriquecimiento según la invención se aplica al cultivo de las ostras, ya sea durante la crianza (crecimiento) de las ostras, o ya sea, de manera preferida, durante la etapa de maduración.

En este caso, el procedimiento de enriquecimiento es un procedimiento de maduración de una ostra de consumo que comprende un enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides que comprende las etapas de la reivindicación independiente 1.

El procedimiento de maduración de una ostra se puede realizar durante un período que varía de 2 días a 10 semanas, preferiblemente de 2 a 60 días, y aún más preferiblemente de 1 a 5 semanas. Esta duración generalmente está en línea con la de una maduración tradicional, sin adición de microalgas de interés.

Preferiblemente, las microalgas de interés utilizadas en los procedimientos según la invención se seleccionan entre las especies del siguiente género: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nanochloris*, *Crypthecodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Euglena*, *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Aurantiochytrium*, *Scenedesmus* y/o *Tetraselmis*. Más preferiblemente, las microalgas de interés se eligen entre las especies de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nanochloris*, *Crypthecodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Euglena*, *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Aurantiochytrium*, *Scenedesmus*, y aún más preferiblemente entre las especies de los géneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nanochloris*, *Crypthecodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*.

Dependiendo del tipo de enriquecimiento que se desee, es posible en efecto elegir una o varias microalgas entre las indicadas anteriormente. En particular, para obtener un enriquecimiento en DHA, puede ser ventajoso introducir las microalgas de interés de los géneros *Schizochytrium*, *Odontella*, *Isochrysis*, *Cyclotella* o *Nitzschia*. Del mismo modo, para obtener un enriquecimiento particularmente ventajoso en EPA, se pueden introducir las siguientes microalgas: *Odontella*, *Monodus*, *Isochrysis*, *Euglena* o *Cyclotella*. Finalmente, la microalga *Euglena* permite obtener enriquecimiento en ARA.

Con respecto a los carotenoides, las siguientes microalgas son particularmente ventajosas: *Schizochytrium* (astaxantina), *Nitzschia* (fucoxantina), *Aurantiochytrium* (violaxantina) y *Scenedesmus* (luteína).

Finalmente, la invención se refiere a la utilización de las microalgas depositadas en la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, Escocia) con los números de acceso indicados a continuación, para enriquecer a los moluscos filtradores y más particularmente a las ostras en ácidos grasos poliinsaturados y/o en carotenoides según el procedimiento de la invención:

- *Schizochytrium*: CCAP nº 4087/1,
- *Odontella*: CCAP nº 1054/5;
- *Monodus* sp. : CCAP nº 848/3;
- *Isochrysis*: CCAP nº 927/16.
- *Euglena gracilis*: CCAP nº 1224/49;
- *Cyclotella cryptica*: CCAP nº 1070/7;
- *Nitzschia brevirostris*: CCAP nº 1052/21;
- *Scenedesmus*: CCAP nº 276/75.

Según un ejemplo no limitativo de la invención, la estabulación de las ostras se hace en estanques de cemento, cuyas dimensiones son de aproximadamente 20 m × 10 m para 1,50 m de profundidad. Las microalgas se producen por separado en el laboratorio por heterotrofia o mixotrofia, en biorreactores de 30 litros con agitación y después se transportan en contenedores de 20 litros en los que las microalgas se concentran a razón de 60 g a 120 g de materia seca por litro. La cepa de *Schizochytrium* ha sido cultivada en un fermentador de 30 L en un medio de cultivo rico [Bahnweg, G. (1979) Studies on the physiology of *Thraustochytriales* I. Growth requirements and nitrogen nutrition of *Thraustochytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japonochytrium* sp., *Ulkenia* spp. and *Labyrinthuloides* spp. Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 17: 245-268] a pH constante. Después de aproximadamente 144 horas de fermentación, se pueden obtener 80 g/l de biomasa (peso seco) para las células con un contenido lipídico de aproximadamente 45 %, donde el DHA representa aproximadamente el 50 % entre los triglicéridos.

Las microalgas se vierten directamente en los estanques llenos de agua de mar, en presencia de los moluscos, para una fase de maduración comprendida entre 2 días y 60 días, dependiendo de la concentración de nutrientes deseada. Las microalgas se aportan entonces a razón de aproximadamente 10^4 células/mL de agua de mar.

La invención tiene también como objetivo una ostra obtenida según el procedimiento de enriquecimiento según la invención, conforme a la reivindicación independiente 9, cuya concentración de EPA y/o de DHA es superior a la de las ostras criadas según los métodos tradicionales, a saber:

- un contenido de DHA superior a 100 mg/100 g, preferiblemente superior a 120 mg/100 g, y más preferiblemente superior a 150 mg/100 g en peso seco, y/o
- un contenido de EPA superior a 200 mg/100 g, preferiblemente superior a 220 mg/100 g, más preferiblemente superior a 250 mg/100 g en peso seco, estando indicados los contenidos por 100 g de peso seco de carne cruda.

Los contenidos de ácidos grasos indicados en la presente solicitud se determinan preferiblemente mediante el método denominado de Folch por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos según las recomendaciones de AFNOR (NF EN ISO 5509 y NF EN ISO 5508).

La invención se definirá mejor a la luz de los ejemplos que siguen, dados solo a título ilustrativo.

Ejemplo 1: Enriquecimiento de una ostra por estabulación en presencia de la microalga *Nitzschia brevirostris*

1. Selección de la microalga de interés.

Se realiza un cultivo de *Nitzschia brevirostris* en un biorreactor de 2 litros con autómatas dedicado y supervisión por estación informática. El sistema se regula en pH mediante la adición de una base (solución de hidróxido de sodio 1 N) y/o de un ácido (solución de ácido sulfúrico 1 N).

La temperatura del cultivo se fija a 23 °C, y el cultivo se somete a una agitación controlada.

El biorreactor está equipado con un sistema de iluminación externa que rodea el tanque transparente. Este sistema de iluminación externa está compuesto por lámparas LED distribuidas alrededor de la pared externa del tanque del biorreactor. La intensidad así como los ciclos de luz son controlados por el autómata. El cultivo es alimentado con glucosa a una concentración entre 100 mM y 150 mM. El cultivo se efectúa durante al menos 7 días, preferiblemente de 7 a 10 días.

El cultivo se ilumina con 30 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 30 segundos y una intensidad de $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se seleccionan así las microalgas de interés de la cepa *Nitzschia brevirostris* capaces de crecer en condiciones de cultivo mixotrófico y cuyo contenido en ácidos grasos poliinsaturados, en particular EPA y DHA, y en carotenoides, en particular fucoxantina, es significativamente más importante que el de una cepa de *Nitzschia brevirostris* no seleccionada.

A modo de ejemplo, una cepa de *Nitzschia brevirostris* seleccionada de este modo puede ser la cepa FCC810 depositada en la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, Escocia) con el número de acceso CCAP 1052/21.

2. Enriquecimiento de las ostras por la microalga *Nitzschia brevirostris* seleccionada

Las ostras de la especie *Crassostrea gigas* se ponen en estabulación en un estanque de agua de mar y se añade la microalga *Nitzschia brevirostris* seleccionada en el punto 1 a razón de 6 g de materia seca por litro durante 24 horas.

Las ostras se almacenan en bolsas de malla de plástico, a razón de una treintena de ostras por bolsa. El volumen de agua contenida en el estanque de agua de mar es de 1 a 100 m³. Se colocan de 2 a 3 bolsas por m³ de agua de mar. El experimento se repite 5 veces (5 lotes) en condiciones idénticas.

3. Resultados

Los métodos para la extracción selectiva de lípidos, incluidos EPA y DHA, son conocidos por los expertos en la técnica y, por ejemplo, están descritos por Bligh, EG et Dyer, WJ (1959) (« A rapid method of total lipid extraction and purification », Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-917) o por McCreary DK, Kossa WC, Ramachandran S, Kurtz RR. (1978) ("A novel and rapid method for the preparation of methyl esters for gas chromatography: application to the determination of the fatty acids of edible fats and oils", J Chromatogr Sci. 1978 Aug 10;16(8):329-31).

Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides también son conocidos por los expertos en la técnica y, por ejemplo, están descritos por SW Wright, SW Jeffrey, RFC Mantoura, CA Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer: Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Marine ecology progress series : Vol. 77 : 183-196, 1991.

Los resultados indicados en la tabla que sigue se dan en mg de ácidos grasos por gramo (mg/g) de carne cruda en peso seco de *Crassostrea gigas*.

Lote	Duración	EPA	mg/g
Lote 1	12 horas	EPA 20:5 N-3	2,30
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
	48 horas	EPA 20:5 N-3	2,55
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
Lote 2	12 horas	EPA 20:5 N-3	1,90
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
	48 horas	EPA 20:5 N-3	2,30
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
Lote 3	12 horas	EPA 20:5 N-3	2,80
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
	48 horas	EPA 20:5 N-3	3,10
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
Lote 4	12 horas	EPA 20:5 N-3	2,20
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
	48 horas	EPA 20:5 N-3	2,50
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
Lote 5	12 horas	EPA 20:5 N-3	2,60
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	
	48 horas	EPA 20:5 N-3	3,00
Flucoxantina	Color	Verde oscuro	

Ejemplo 2: Enriquecimiento de una ostra por estabulación en presencia de la microalga *Schizochytrium mangrovei*

1. Selección de la microalga de interés.

Se realiza un cultivo de *Schizochytrium mangrovei* en un biorreactor de 2 litros con autómata dedicado y supervisión por estación informática. El sistema se regula en pH mediante la adición de una base (solución de hidróxido de sodio 1 N) y/o de un ácido (solución de ácido sulfúrico 1 N).

La temperatura del cultivo se fija a 23 °C, y el cultivo se somete a una agitación controlada.

El biorreactor está equipado con un sistema de iluminación externa que rodea al tanque transparente. El sistema de iluminación externa está compuesto por lámparas LED distribuidas alrededor de la pared externa del tanque del biorreactor. La intensidad así como los ciclos de luz son controlados así por el autómata dedicado. El cultivo es alimentado con glucosa a una concentración entre 30 mM y 1 M. El cultivo se lleva a cabo durante al menos 7 días, preferiblemente de 7 a 10 días.

El cultivo se ilumina con 30 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 30 segundos y una intensidad de 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se seleccionan así las microalgas de interés de la cepa *Schizochytrium mangrovei* capaces de crecer en condiciones de cultivo mixotrófico y cuyo contenido en ácidos grasos poliinsaturados, en particular EPA y DHA, y en carotenoides,

en particular astaxantina, es significativamente más importante que el de una cepa de *Schizochytrium mangrovei* no seleccionada.

A modo de ejemplo, una cepa de *Schizochytrium mangrovei* seleccionada de este modo puede ser la cepa FCC1104 depositada en la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, Escocia) con el número de acceso CCAP 4087/1.

2. Enriquecimiento de las ostras por la microalga *Schizochytrium mangrovei* seleccionada

Las ostras de la especie *Crassostrea gigas* se ponen en estabulación en un estanque de agua de mar y se añade la microalga *Schizochytrium mangrovei* seleccionada en el punto 1 a razón de 6 g de materia seca por litro y en 24 horas.

Las ostras se almacenan en bolsas de malla de plástico, a razón de una treintena de ostras por bolsa. El volumen de agua contenida en el estanque de agua de mar es de 1 a 100 m³. Se colocan de 2 a 3 bolsas por m³ de agua de mar. El experimento se repite 5 veces (5 lotes) en condiciones idénticas.

3. Resultados

Los métodos para la extracción selectiva de lípidos, incluidos EPA y DHA, son conocidos por los expertos en la técnica y, por ejemplo, están descritos por Bligh, EG et Dyer, WJ (1959) (« A rapid method of total lipid extraction and purification », Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-917) o por McCreary DK, Kossa WC, Ramachandran S, Kurtz RR. (1978) ("A novel and rapid method for the preparation of methyl esters for gas chromatography: application to the determination of the fatty acids of edible fats and oils", J Chromatogr Sci. 1978 Aug 10;16(8):329-31).

Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides también son conocidos por los expertos en la técnica y, por ejemplo, están descritos por SW Wright, SW Jeffrey, RFC Mantoura, CA Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer: Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Marine ecology progress series : Vol. 77 : 183-196, 1991.

Los resultados indicados en la tabla que sigue se dan en mg de ácidos grasos por gramo (mg/g) de carne cruda en peso seco de *Crassostrea gigas*.

Lote	Duración	EPA	mg/g	DHA	mg/g
Lote 1	12 horas	EPA 20:5 N-3	0,3	DHA 22:6 N-3	3,20
Astaxantina	Color	Salmón			
	48 horas	EPA 20:5 N-3	0,4	DHA 22:6 N-3	3,50
Astaxantina	Color	Salmón			
Lote 2	12 horas	EPA 20:5 N-3	0,2	DHA 22:6 N-3	3,90
Astaxantina	Color	Salmón			
	48 horas	EPA 20:5 N-3	0,3	DHA 22:6 N-3	4,10
Astaxantina	Color	Salmón			
Lote 3	12 horas	EPA 20:5 N-3	0,2	DHA 22:6 N-3	3,70
Astaxantina	Color	Salmón			
	48 horas	EPA 20:5 N-3	0,4	DHA 22:6 N-3	4,00
Astaxantina	Color	Salmón			
Lote 4	12 horas	EPA 20:5 N-3	0,2	DHA 22:6 N-3	3,30
Astaxantina	Color	Salmón			
	48 horas	EPA 20:5 N-3	0,4	DHA 22:6 N-3	3,50
Astaxantina	Color	Salmón			
Lote 5	12 horas	EPA 20:5 N-3	0,1	DHA 22:6 N-3	3,60
Astaxantina	Color	Salmón			
	48 horas	EPA 20:5 N-3	0,2	DHA 22:6 N-3	3,8
Astaxantina	Color	Salmón			

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de enriquecimiento de las ostras en ácidos grasos poliinsaturados, comprendiendo estos ácidos poliinsaturados DHA, EPA y/o ARA, y/o en carotenoide o carotenoides elegidos entre astaxantina, luteína, fucoxantina, zeaxantina y/o violaxantina, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 – la puesta en estabulación de las ostras en un estanque de agua de mar, y
 - la adición de microalgas de interés a dicho estanque de agua de mar, siendo dichas microalgas de interés previamente seleccionadas y cultivadas para contener al menos 2 % en peso seco de los ácidos grasos poliinsaturados mencionados antes y/o al menos 1 % en peso seco de al menos uno de los carotenoides mencionados antes,
- 10 siendo realizado el procedimiento en las semanas 1 a 10 anteriores al consumo de dichas ostras.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde dichas microalgas de interés consisten en una mezcla de diferentes especies.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde las microalgas de interés se añaden al estanque de agua de mar en forma de un cultivo concentrado.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración celular de microalgas en el estanque de agua de mar es de al menos 10^4 células por mililitro.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las microalgas de interés se seleccionan entre las especies de los siguientes géneros: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nanochloris*, *Crypthecodinium*, *Monodus*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Euglena*, *Cyclotella*, *Nitzschia*,
20 *Aurantiochytrium*, *Scenedesmus* y/o *Tetraselmis*.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde las microalgas de interés se seleccionan entre las especies de los siguientes géneros: *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Odontella*, *Phaeodactylum*, *Nanochloris*, *Crypthecodinium*, *Monodus* y/o *Nannochloropsis*.
7. Procedimiento de maduración de ostras de consumo que comprende el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, efectuándose la maduración de las ostras en el estanque de agua de mar en presencia de
25 dichas microalgas de interés, durante un tiempo suficiente para que dichas ostras fijen los ácidos grasos poliinsaturados y/o el o los carotenoides contenidos en dichas microalgas.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en donde la duración de la maduración de las ostras es de dos días a diez semanas.
- 30 9. Ostras obtenidas según el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizadas porque tienen un contenido en DHA superior a 100 mg/100 g en peso seco, y/o un contenido en EPA superior a 200 mg/100 g en peso seco, estando indicados los contenidos para 100 g de peso seco de carne cruda.