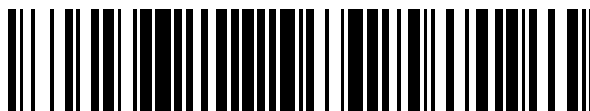


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 364**

21 Número de solicitud: 201100385

51 Int. Cl.:

A23K 1/18

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **29.03.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.10.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (50.0%)
PLAZA DE EL EJIDO, S/N
29071 MÁLAGA, ES y
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (50.0%)**

72 Inventor/es:
**ARIJO ANDRADE, Salvador;
MARTÍNEZ MANZANARES, Eduardo;
BALEBONA ACCINO, María Del Carmen;
CHABRILLÓN POPELKA, Mariana;
LEÓN RUBIO, Juan Manuel;
ALARCÓN, Francisco Javier y
MORIÑIGO GUTIÉRREZ, Miguel Ángel**

74 Agente/Representante:
No consta

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN, CONSERVACIÓN, Y USO EN PECES, DEL PROBIÓTICO SHEWANELLA PUTREFACIENS PDP 11 PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES Y LA MEJORA EN EL CRECIMIENTO.**

57 Resumen:

Procedimiento de preparación, conservación, y uso en peces, del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 para el control de enfermedades y la mejora en el crecimiento. Preferentemente, el probiótico, compuesto por células enteras de la cepa Pdp11, se cultiva en TSAs durante 24 h a 22°C. La preparación de una suspensión del probiótico, preferentemente sin proceso previo de liofilización o de inactivación física o química, se realiza mediante su incorporación en una matriz de alginato, preferentemente alginato sádico al 0,5%. La suspensión preparada se puede conservar sin pérdida significativa de viabilidad durante 20 - 30 días a 4°C. Los productos alimenticios para peces son preparados mediante la adición en agitación de la suspensión de probiótico y, adicionalmente, CaCl₂ 50 mM, preferentemente mediante atomización.

ES 2 389 364 A1

5 PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN, CONSERVACIÓN, Y USO EN PECES, DEL PROBIÓTICO *Shewanella putresfaciens* Pdp1 PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES Y LA MEJORA EN EL CRECIMIENTO.

DESCRIPCION

10 **Sector de la técnica**

El objeto de la presente invención lo constituyen procedimientos de preparación, conservación, y usos en peces, del probiótico *Sewanella putresfaciens* Pdp11 para el control de enfermedades y la mejora en el crecimiento, particularmente mediante la utilización de dicho probiótico en la elaboración de productos alimenticios para peces, particularmente piensos.

15

Estado de la técnica

20 La quimioterapia es una de las estrategias empleadas para la profilaxis y tratamiento de enfermedades bacterianas que afectan a las especies piscícolas cultivadas. Esta aplicación en la que normalmente se emplean grandes cantidades de antibióticos suele solventar situaciones de emergencia. Sin embargo, existen factores que limitan e incluso hacen contraproducente su uso: aparición de cepas resistentes a los antibióticos, acumulación de los antibióticos en los tejidos animales o afectación de la microbiota del entorno.

25 Los probióticos son microorganismos que, administrados en la dieta de los individuos, proporcionan beneficios sobre la salud [Clancy, R. (2003). Immunobiotics and probiotics evolution. FEMS Immunology and Medical Microbiology 38: 9-12.]. Varios son los mecanismos propuestos para el modo de actuación de los probióticos: (i) supresión de los patógenos a través de una exclusión competitiva para la producción de compuestos antimicrobianos, la competición por los nutrientes y por los lugares de adhesión en las superficies mucosas; (ii) un efecto de inmuoestimulación; y (iii) la posible mejora de la nutrición del hospedador, a través de la producción de vitaminas, destoxificación de componentes de la dieta, y por lisis de compuestos
30 no digeribles, que pueden ser posteriormente asimilados por el hospedador.

Sin embargo, el gran problema de su administración oral es que estas bacterias pueden morir antes de llegar al intestino, ya sea por deshidratación al estar en contacto con el pienso o

por la acción de las enzimas digestivas del estómago. El método de la presente invención intenta resolver estos problemas.

No obstante, en [Salinas, I.; A. Cuesta, M. A. Esteban, J. Meseguer (2005). Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 67-77.] se describen otros métodos de administración de probióticos por vía oral. En todos los casos, los probióticos se añaden o se mezclan con el pienso sin un tratamiento previo. Esto puede generar una elevada tasa de mortalidad en las bacterias (sobre todo aquellas que sean más susceptibles a cambios ambientales) lo que puede reducir su utilidad como probiótico. Existen métodos para aumentar la supervivencia de las bacterias, como la conservación por desecación junto a prebióticos [Corcoran, B.M.; R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C. Stanton (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology* 96: 1024–1039.] pero en el caso de la *Shewanella*, la desecación no es viable.

En [Diez-Rosales, P. et al. (2009). Effects of two closely related prebiotics on respiratory burst activity of *Senegalese Sole* (*Solea Senegalensis*, Kaup) phagocytes and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*. *Aquaculture*, vol. 293: 16-21.] se describe el antecedente más cercano a la presente invención, en donde se relata la encapsulación de bacterias liofilizadas Pdp11 (*Shewanella putresfaciens*) y Pdp13 (*Shewanella baltica*) donde alguna de ellas está suspendida en una solución de alginato sódico. Los resultados obtenidos en este estudio muestran un considerable crecimiento para la especie *Solea Senegalensis* alimentados con comida que incluye *Shewanella putresfaciens* Pdp11 respecto de las especies alimentadas con alginato sódico.

25 **Descripción detallada de la invención**

El probiótico *Shewanella putresfaciens* Pdp11 es una bacteria aislada de la piel de doradas sanas. Se conoce, entre otros, su capacidad de protección en peces (doradas y lenguados) frente a la inoculación con patógenos bacterianos (en concreto frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*).

Constituyen por tanto un primer aspecto de la presente invención un probiótico compuesto por células enteras de la cepa Pdp11 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con referencia CECT 7627, particularmente para la inducción de una mejora en el crecimiento de los peces que los ingieren, para el control de enfermedades en peces, y/o para la

inducción de una mejora en el estado fisiológico de los enterecitos del intestino en peces.

Constituye un segundo aspecto de la invención el procedimiento de cultivo del probiótico antes referido, que comprende la siembra en medio Agar Tripticasa de Soja suplementado con NaCl hasta el 2% de concentración final (TSAs), y la incubación a 15-22 °C durante 24-48 h, más preferentemente a 22 °C durante 24 h.

Constituye un tercer aspecto de la invención el procedimiento de preparación de una suspensión del probiótico antes referido, cultivado o no conforme al procedimiento indicado como segundo aspecto de la invención, que comprende la recogida de la masa bacteriana resultante del cultivo de dicho probiótico, y la incorporación de la misma en una matriz de alginato, preferentemente mediante su resuspensión en alginato sódico al 0,5%, más preferentemente sin ningún proceso de liofilización, o de inactivación física o química, previo a dicha incorporación o suspensión en alginato.

La incorporación en una matriz de alginato protege al probiótico de la deshidratación producida por la propia sequedad del producto alimenticio (pienso) al que es adicionado, al mismo tiempo que facilita la adhesión de las bacterias a su superficie. Además, la incorporación o suspensión en alginato conserva la viabilidad del probiótico a su paso por el estómago del pez. Una vez que las bacterias han superado el proceso de degradación enzimática y ataque ácido del estómago, pueden liberarse y adherirse a la superficie del intestino, donde el probiótico realizará su función.

Constituye un cuarto aspecto de la presente invención un procedimiento de conservación del probiótico, cultivado y/o incorporado en una matriz de alginato conforme a los aspectos segundo y tercero antes comentados, caracterizado porque mantiene el probiótico sin pérdida significativa de viabilidad durante al menos 20 – 30 días y comprende su almacenamiento a 4 °C. Para el caso de probiótico cultivado conforme al segundo aspecto de la presente invención, el procedimiento comprende además la recogida de masa bacteriana cultivada y su resuspensión en una solución de alginato sódico al 0,5%; preferentemente comprende la recogida de un total de 10^{12} ufc que posteriormente se resuspenden en 100 ml de una solución de alginato sódico al 0,5%. En cualquiera de los casos, la recuperación del probiótico conservado conforme al procedimiento que constituye este cuarto objeto de la invención se realiza preferentemente mediante incubación a temperatura ambiente.

Constituye un quinto aspecto de la presente invención un procedimiento de elaboración de productos alimenticios para peces que comprende el cultivo de un probiótico conforme al primer objeto de la presente invención. Del mismo modo, constituye un sexto aspecto de la

presente invención un procedimiento de elaboración de productos alimenticios para peces que emplea un probiótico cultivado conforme al procedimiento de cultivo correspondiente al segundo aspecto de la presente invención,. Paralelamente, constituye un séptimo aspecto de la presente invención un procedimiento de elaboración de productos alimenticios para peces que emplea una suspensión del probiótico preparada según el procedimiento de preparación correspondiente al tercer aspecto de la presente invención. También constituye un aspecto (octavo) de la presente invención un procedimiento de elaboración de productos alimenticios para peces que emplea un probiótico conservado según el procedimiento de conservación correspondiente al cuarto aspecto de la presente invención. Particularmente, constituye un objeto de la presente invención un procedimiento de elaboración de productos alimenticios para peces que comprende la incorporación del probiótico *Shewanella putresfaciens* Pdp11 sin liofilizar en una matriz de alginato y que se caracteriza porque el probiótico se siembran en medio Agar Trypticase de Soja suplementado con NaCl hasta el 2% de concentración final (TSAs), y se incubaba a 15-22 °C durante 24-48 h (preferentemente a 22 °C durante 24 h); y en donde la masa bacteriana resultante se recoge y se resuspende en alginato sódico al 0,5%; añadiéndose preferentemente dicha suspensión de probiótico en alginato al producto alimenticio mientras éste se mantiene en agitación, preferentemente mediante atomización (por ejemplo mediante un nebulizador); más preferentemente añadiendo CaCl₂ 50 mM al producto alimenticio suplementado con la suspensión de probiótico y aún en agitación, también preferentemente mediante atomización. Más preferentemente, la masa bacteriana resultante del procedimiento de cultivo se recoge y se resuspende en alginato al 0,5% a una concentración final de 10¹⁰ ufc/ml, añadiéndose dicha suspensión al pienso en agitación mediante un nebulizador, utilizándose 100 ml de suspensión de alginato-bacteria por cada kg de pienso; y, en una etapa posterior, y sin dejar de agitar el pienso, se añaden 80 ml de CaCl₂ 50 mM, igualmente mediante atomización.

El producto alimenticio o pienso preparado conforme a lo descrito en el párrafo anterior puede ser conservado en un lugar fresco y seco durante un máximo de 24 – 48 horas antes de ser administrado a los peces. No obstante, es preferible la conservación de la suspensión de probiótico y no del pienso, que preferentemente debe ser elaborado justo antes de su utilización.

Constituyen también aspectos de la presente invención tanto los productos alimenticios que comprenden al probiótico correspondiente al primer aspecto de la presente invención, como los productos alimenticios obtenidos mediante la aplicación de los procedimientos correspondientes al segundo y siguientes aspectos de la presente invención; así como las aplicaciones o usos de dichos productos alimenticios en la alimentación de peces.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes

no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

Descripción de los dibujos

10 FIG. 1 muestra una gráfica con el Decrecimiento de la viabilidad celular de la cepa Pdp11 incluida en el pienso junto con alginato. Se representa el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias por gramo de pienso (ensayo por triplicado).

Modos de realización de la invención y ejemplos

15

EJEMPLO 1. Viabilidad de las bacterias suspendidas en alginato y administradas en el pienso

Tal como se ha mencionado anteriormente, la cepa Pdp11 se sembró en medio agar soja tripticaseína con un 2% de NaCl de concentración final (TSAs), y se incubó a 22 °C durante 24 h. Una vez recogida la masa bacteriana se hicieron dos tratamientos. En el primero se resuspendió la masa bacteriana en agua a 10^9 ufc/ml y se añadió al pienso (Gemma 0,5) con nebulizador a razón de 100 ml de suspensión por Kg de pienso. En el segundo caso la masa bacteriana se recogió y se resuspendió en alginato al 0,5% a una concentración final de 10^9 ufc/ml. La suspensión se añadió al pienso (Gemma 0,5) mediante un nebulizador, también a razón de 100 ml de suspensión de alginato-bacteria por cada Kg de pienso. Posteriormente, y sin dejar de agitar el pienso, se añadió 80 ml de CaCl_2 50 mM, igualmente con un nebulizador. El pienso preparado se conservó a 22 °C. La viabilidad de las bacterias durante el tiempo se determinó suspendiendo 2g de pienso en 20 ml de PBS. La suspensión fue agitada y luego centrifugada a 300 xg durante 5 min para desechar los gránulos de pienso. Se recogieron muestras del sobrenadante para realizar diluciones que posteriormente se sembraron en placas de TSAs. Tras un periodo de incubación de 24h se contó el número de colonias aparecidas y se calculó el título de unidades formadoras de colonias por gramo de pienso. Los ensayos se realizaron por triplicado.

De los tres ensayos realizados con las bacterias incorporadas directamente en el pienso,

en sólo un caso éstas sobrevivieron más de 24h. En los otros dos casos no se detectó bacterias viables. En el ensayo donde apareció recuento de bacterias su viabilidad no superó las 48 horas de incubación. Esto puede ser debido a que el pienso comercial carece de humedad, lo que genera un choque osmótico en esta cepa que hace que se inactive rápidamente. Sin embargo en los tres ensayos realizados con bacterias previamente incluidas en alginato se pudo observar una viabilidad sostenida en el tiempo, detectándose bacterias viables hasta los 14-18 días, dependiendo de los ensayos (FIG.1). Esto muestra que el alginato evita la deshidratación de la bacteria, lo que permite que ésta siga viable durante mucho más tiempo, permitiendo la posibilidad de que los preparados puedan ser almacenados durante tiempos que no excedan de los 14 días.

También se estudió la viabilidad de la cepa Pdp11 suspendida en alginato al 0,5% durante 7 días. Para ello se suspendió la bacteria en alginato al 0,5% a una concentración final de 10^9 ufc/ml. La suspensión se incubó tanto a 22°C como a 5-10°C, observándose su viabilidad tal como se ha descrito anteriormente. Los experimentos se realizaron por triplicado. Pasado 7-14 días de la incubación se pudo observar una disminución de bacterias viables en torno a uno o dos órdenes de magnitud (Tabla 1 y 2). Estos resultados son muy positivos, ya que permiten almacenar y distribuir a las empresas acuícolas el preparado de bacterias y alginato, siendo las propias piscifactorías las que se encarguen de añadirlas al pienso según sus requerimientos (en base al tipo de pienso empleado, cantidad y tamaño del mismo). Una vez pulverizado en el pienso sólo deben añadir la solución de cloruro cálcico para permitir la solidificación del alginato.

Tabla 1. Supervivencia de los probióticos en solución de 0,5% de alginato e incubados a 22 °C (medido en ufc/ml). NT = no medido

DÍAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
0	3.0×10^{11}	9.1×10^9	3.0×10^7
2	1.3×10^{10}	NT	NT
7	6.4×10^9	3×10^7	4.0×10^7
14	3.0×10^9	4.7×10^7	NT

Tabla 2. Supervivencia de los probióticos en solución de 0,5% de alginato e incubados a 5-10 °C (medido en ufc/ml). NT = no medido

DÍAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
0	3.0×10^{11}	9.1×10^9	3.0×10^7
2	1.0×10^{10}	NT	NT
7	2.3×10^{10}	3.0×10^8	1.0×10^8
14	6.4×10^9	2.0×10^8	NT

EJEMPLO 2. Viabilidad y colonización de las bacterias en el intestino de lenguado (*solea senegalensis*)

5

Para estos ensayos se utilizaron lenguados (*Solea Senegalensis*) de 35-45g de peso distribuidos en tres tanques de 50 l. Los peces se alimentaron siguiendo dos tratamientos diferentes: (1) dieta normal a base de pienso comercial, (2) alimentados con pienso con alginato y probióticos de la cepa Pdp11 (109 ufc/g). Estos probióticos fueron transformados para que expresaran RFP, de tal manera que pudiesen ser diferenciados del resto de las bacterias por su capacidad fluorescente y también por su resistencia al cloranfenicol.

10

Una vez alimentados los peces se anestesiaron y sacrificaron para la extracción de intestino. De aquí se extrajeron muestras para su cultivo y recuento en placas de TSAs con cloranfenicol ($20 \mu\text{g/ml}$). A partir de estos cultivos se pudo hacer recuentos de colonias de la cepa Pdp11 transformada. Así mismo se pudo comprobar la presencia de la cepa Pdp11 transformada mediante la observación de las muestras intestinales por microscopía de fluorescencia (Multizoom Nikon AZ100).

15

Los resultados mostraron la existencia de probióticos transformados en el intestino de los peces alimentados con el probiótico un día y cuatro después de la alimentación con el preparado. En los peces controles no se detectaron bacterias.

20

Tabla 3. Recuentos de bacterias de la cepa Pdp11 transformadas (resistentes a cloranfenicol) presentes en muestras de peces tras la alimentación con piensos enriquecidos con la mezcla Pdp11-alginato (medias de recuentos expresados en ufc/ml).

25

DÍAS	INTESTINO ANTERIOR	INTESTINO POSTERIOR
1	$1,1 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
4	22	3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de cultivo de un probiótico compuesto por células enteras de *Shewanella putresfaciens* depositada en la colección Española de Cultivos Tipo con referencia CECT 7627 que comprende:
 - a. Siembra en medio Agar Tripticasa de Soja suplementado con NaCl hasta el 2% de concentración final (TSAs), e
 - b. Incubación a 15-22 °C durante 24-48 h.
- 10 2. Procedimiento de cultivo de un probiótico según la reivindicación 1, caracterizado porque la incubación se realiza a 22 °C durante 24 h. que comprende:
3. Procedimiento de cultivo de un probiótico según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende un paso adicional c) de recogida de la masa bacteriana resultante de dicho cultivo.
- 15 4. Procedimiento de cultivo de un probiótico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende un paso adicional de conservación de la masa bacteriana resultante de dicho cultivo a 4 °C.
5. Uso de la masa bacteriana obtenida mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la elaboración de una suspensión probiótica que comprende la
- 20 incorporación de la masa bacteriana en una matriz de alginato.
6. Uso de la masa bacteriana según la reivindicación 5 donde la masa bacteriana no es sometida, previo a su incorporación en la matriz de alginato, a ningún proceso de liofilización o de inactivación física o química.
7. Uso de la masa bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, caracterizado
- 25 porque la incorporación en la matriz de alginato se realiza mediante su resuspensión en alginato sódico al 0,5%.
8. Uso según la reivindicación 7 donde la suspensión probiótica obtenida es conservada a 4 °C.
9. Uso de la suspensión probiótica obtenida según cualquiera de las reivindicaciones 5-8,
- 30 para la elaboración de productos alimenticios para peces.
10. Uso según la reivindicación 9, donde la suspensión probiótica es añadida a un pienso en agitación.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde el pienso en agitación, es suplementado con CaCl₂ 50 mM.

12. Uso según la reivindicación 11, donde el pienso en agitación, es suplementado con 80 ml de CaCl_2 50 mM.
- 5 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde la suspensión probiótica es añadida en una cantidad de 100 ml de suspensión por cada kg de pienso.
14. Uso de la masa bacteriana obtenida mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la elaboración de productos alimenticios para peces.
15. Producto alimenticio para peces que comprende la masa bacteriana obtenida mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 10 16. Producto alimenticio para peces que comprende una suspensión probiótica según cualquiera de las reivindicaciones 5-8.

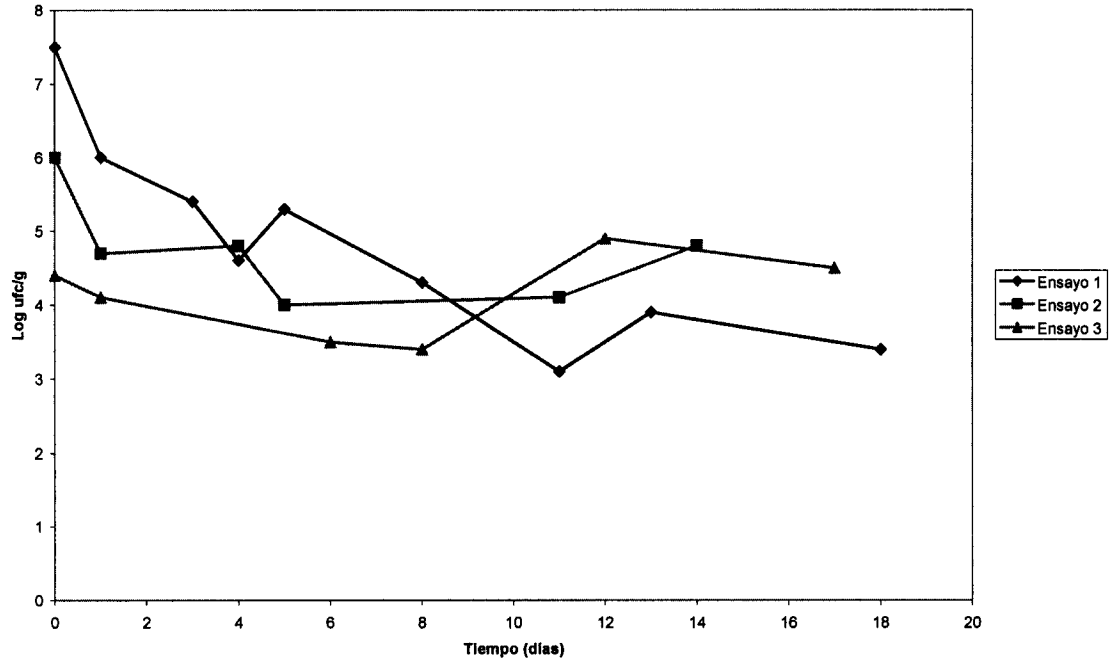


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100385

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.03.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A23K1/18** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SAENZ DE RODRIGÁÑEZ et al. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (<i>Solea senegalensis</i> , Kaup, 1858). Aquaculture nutrition, 2009, vol. 15, página 177-185.	1-16
X	GARCÍA DE LA BANDA et al. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (<i>Solea senegalensis</i> , Kaup 1858) performance and protection against <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . Aquaculture, 2010, vol. 306, páginas 281-188.	1-16
X	DÍAZ ROSALES, et al. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of senegalese sole (<i>Solea senegalensis</i> , Kaup) phagocytes and protection against <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . Aquaculture, 2009, vol. 293, páginas 16-21.	1-16
A	MORTAZAVIAN et al. principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Review article. Iranian Journal of Biotechnology, 2007, vol. 5 (1) páginas 1-18.	7,8
A	MORTAZAVIAN, et al. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. International journal of dairy technology, 2007, vol. 60 (2), páginas 123-127.	4
A	ANNAN, et al. Encapsulation in alginate-coated gelatin microsphere improves survival of the probiotic <i>Bifidobacterium adolescentis</i> 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food research international, 2008, vol. 41, páginas 184-193.	4,6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.03.2012

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, HCAPLUS, OCEAN, AQUASCI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4, 6, 7, 8, 12, 13	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5, 9-11, 14-16	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SAENZ DE RODRIGÁÑEZ et al.	2009
D02	GARCÍA DE LA BANDA et al.	2010
D03	DÍAZ ROSALES, et al.	2009
D04	MORTAZAVIAN et al.	2007
D05	MORTAZAVIAN, et al.	2007
D06	ANNAN et al.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención, según la reivindicación 1 de la solicitud, se refiere a un procedimiento para cultivar células enteras del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (CECT 7627) que comprende:

- siembra en medio agar tripticasa de soja con hasta un 2% de CINa.
- incubación a 15-22°C durante 24 a 48 h.

También son objeto de la invención el producto alimenticio que comprende la masa bacteriana obtenida mediante el procedimiento anterior (reivindicación 15) y el uso de dicha masa bacteriana para elaborar productos alimenticios para peces (reivindicación 14).

Además, se reivindica el uso de la masa bacteriana obtenida según la reivindicación 1 para elaborar una suspensión que comprende la incorporación de dicha masa en una matriz de alginato (reivindicación 5), el uso de dicha suspensión para la elaboración de productos alimenticios para peces (reivindicación 9) así como el producto alimenticio que comprende la suspensión anterior (reivindicación 16).

Las reivindicaciones dependientes (2-4, 6-8, 10-13) dan detalles de los anteriores procedimientos y usos.

Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la LP)

Los documentos D1 a D3 describen el cultivo de la misma cepa bacteriana *Shewanella putrefaciens* Ppd11 y su utilización como probiótico en alimentación de peces.

En el documento D1 el cultivo se realiza en agar triptonsoja con 15 g/l de CINa a 22°C durante 24 horas. La masa celular obtenida se suspende en alginato sódico, se añade a un pienso en agitación y se suplementa con CaCl₂ (ver material y métodos)

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1-3, 5, 9-11, 14-16

En D2, el cultivo se lleva a cabo en agar triptonsoja con 1,5% de CINa a 22°C durante 48 horas. Luego se suspende en alginato al que se le añade CaCl₂ (ver material y métodos)

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1, 3, 5, 9-11, 14-16.

Por último, en el documento D3 se describe el cultivo en agar triptonsoja con 1,5% de CINa. La masa bacteriana se suspende en alginato (ver material y métodos)

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 5, 9-11, 14-16.

Por tanto, teniendo en cuenta los documentos D1 a D3, las reivindicaciones 1-3, 5, 9-11, 14-16 no cumplen el requisito de novedad.

Las reivindicaciones dependientes 4, 6-8, 12 y 13 contienen características que no se han divulgado exactamente en los documentos antes citados, y, por tanto son nuevas en el sentido del artículo 6 de la L.P.

Sin embargo dichas reivindicaciones no contienen ninguna característica que, en combinación con las reivindicaciones de las que dependen, les otorguen actividad inventiva, ya que o bien se trata de meras alternativas de diseño o experimentación, o bien son características ya utilizadas con la misma finalidad en el estado de la técnica. En ambos casos se considera que no cumplen el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la L.P.

Por ejemplo, las reivindicaciones 4 y 8 se refieren a la posibilidad de conservar tanto la masa bacteriana como la suspensión en alginato a 4°C, es decir, refrigeradas. La conservación de probióticos solos o microencapsulados a temperaturas de refrigeración (alrededor de 4°C) ha sido divulgada en los documentos D4-D6.

El procedimiento de suspender la masa bacteriana en el alginato, sin someterla previamente a ningún procedimiento de inactivación física, química o liofilización, tal y como se menciona en la reivindicación 6 de la solicitud, es una posibilidad, que aparentemente es evidente para un experto en la materia. La liofilización o cualquier inactivación química o física de la masa celular no parece necesaria para la suspensión en alginato, sino que es una etapa que posibilita la conservación o el mantenimiento de la masa celular y, que se puede obviar, si la suspensión en alginato se realiza a continuación del cultivo celular.

En cuanto a las reivindicaciones 7, 12 y 13 se refieren a proporciones y cantidades de alginato y CaCl₂, elegidas de modo arbitrario, dentro de los límites utilizados habitualmente en el estado de la técnica. La elección de dichas proporciones, sin llevar asociado un efecto técnico inesperado, se considera que no conlleva actividad inventiva.