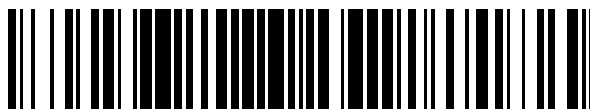


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 428**

21 Número de solicitud: 201100469

51 Int. Cl.:

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A01K 61/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **15.04.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.11.2012

71 Solicitante/s:

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
OTRI-UAL Edif. CAE.CTRA. SACRAMENTO, S/N
04740 ALMERÍA, ES y
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

72 Inventor/es:

**ALARCÓN LÓPEZ, Francisco Javier;
MARTÍNEZ MOYA, Tomás Francisco;
ARIJO ANDRADE, Salvador;
BALEBONA ACCINO, M. Carmen;
LEÓN RUBIO, Juan Manuel;
MORIÑIGO GUTIÉRREZ, Miguel Ángel y
ROSAS LEDESMA, Pablo**

74 Agente/Representante:

No consta

54 Título: **PREPARADO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA SU ADMINISTRACIÓN ORAL A PECES CULTIVADOS BASADO EN LA ENCAPSULACIÓN EN HIDROGELES DE ALGINATO.**

57 Resumen:

La invención consiste en un preparado para la administración oral del probiótico Shewanella PDP11 a peces. El preparado se caracteriza por contener células bacterianas viables de la cepa CECT 7627 encapsuladas en un hidrogel basado en alginato cálcico en forma de partículas esféricas de morfología uniforme y tamaño modificable para adaptarse a peces de distinto tamaño. Las cápsulas contienen aditivos organolépticos y/o nutricionales que actúan como atrayentes para los animales. El preparado mantiene viables a las bacterias durante periodos prolongados, es estable en medios acuáticos, y soporta el paso por el tubo digestivo de los peces, sobre los que ejerce efectos biológicos favorables. Su administración por vía oral es independiente del alimento habitual, evitando así la inactivación del microorganismo durante la fabricación del pienso.

ES 2 390 428 A1

DESCRIPCIÓN

PREPARADO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA SU ADMINISTRACIÓN ORAL A PECES CULTIVADOS BASADO EN LA ENCAPSULACIÓN EN HIDROGELES DE ALGINATO.

5 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

Preparado de bacterias probióticas para su administración oral a peces cultivados basado en la encapsulación en hidrogeles de alginato.

10 Sector de la técnica

La presente invención se enmarca de manera general en el campo de la agricultura, concretamente en la producción animal y específicamente en el sector de la acuicultura.

15 Estado de la técnica

Un probiótico se define como un complemento de determinados microorganismos vivos que, administrados en número suficiente, ejercen efectos beneficiosos sobre el hospedador, modificando en ellos la comunidad microbiana relacionada con él mismo o con el ambiente, asegurando así un uso mejorado del alimento, aumentando su valor nutricional, y/o favoreciendo la respuesta del hospedador frente a las infecciones, o mejorando la calidad del ambiente (Verschuere et al. 2000, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655-671; Schrezenmeir y de Vrese 2001, *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 361S-364S).

25

Circunscribiendo el uso de los probióticos a la producción acuícola, las características fundamentales de los mismos que interesan son: i) por una parte, la mejora de la respuesta de los peces frente a microorganismos potencialmente patógenos, y ii) por otra, favorecer la salud intestinal y el consiguiente mejor aprovechamiento de los nutrientes ingeridos.

30

Las enfermedades infecciosas en acuicultura son uno de los principales problemas que afectan a este sector, siendo habitual abordarlas mediante la prevención (basada tanto en buenas prácticas de manejo en piscifactoría, como en el uso de vacunas) o mediante su control una vez que el patógeno está presente en las instalaciones (basado fundamentalmente en el uso de antibióticos). En el caso de las vacunas, y al contrario que en las especies terrestres, éstas no pueden ser utilizadas como un procedimiento rutinario en acuicultura, debido a que los animales en los estadios más tempranos de su desarrollo no son completamente inmunocompetentes y/o no responden adecuadamente en todos los casos a este tipo de estrategia. Además, la administración de las vacunas se hace generalmente por inyección, y esto dificulta su aplicación masiva en animales de pequeño tamaño o en lotes muy numerosos de peces. Por otra parte, la utilización de antibióticos no está exenta de inconvenientes, y así, el uso masivo de estas sustancias ha producido un notable incremento en la aparición de bacterias resistentes a los mismos, provocando que los tratamientos con sustancias químicas antimicrobianas tengan cada vez menor éxito (Thyssen y Ollevier 2001, *Aquaculture* 200: 259-269; Sarter et al. 2007, *Food Control* 18: 1391-1396). Y no menos importante, su uso inadecuado e

45

irresponsable representa un potencial peligro para la salud pública. Por todo ello, lejos de estar en auge, la utilización de antibióticos en producción acuícola está cada vez más restringida por la legislación zootécnica comunitaria.

- 5 Por todo lo anterior, la acuicultura moderna demanda estrategias alternativas que mantengan un ambiente microbiológico saludable en las explotaciones acuícolas con el objeto de incrementar la producción y los beneficios obtenidos en las mismas y, al mismo tiempo, desarrollar modelos de producción más acordes con las buenas prácticas de producción.

10

- En este sentido, la utilización de probióticos es una estrategia alternativa muy interesante para la prevención de enfermedades (Balcázar et al. 2006, *Veterinary Microbiology* 114: 173-186; Merrifield et al. 2010, *Aquaculture* 302: 1-18). No obstante, si se compara en la literatura científica y en las bases de datos de patentes el desarrollo de esta rama de la investigación en animales de producción terrestres (básicamente en avicultura y cría de cerdo), puede constatarse el manifiesto retraso en el desarrollo de formulados probióticos destinados a peces. De hecho, las primeras investigaciones realizadas sobre la utilización de probióticos en acuicultura se fundamentaron, precisamente, en los excelentes resultados obtenidos con anterioridad en los animales de producción terrestres. Sin duda, las dificultades de administración en el medio acuático a los peces, criados además en cultivos enormemente masificados, sin posibilidad práctica de control individual de la administración por vía oral, tienen buena parte de la responsabilidad de este retraso.

15

- A pesar de estos limitantes, es palpable el notable incremento de contribuciones científicas en este campo en los últimos 25 años, fruto del enorme esfuerzo de investigación que se está realizando para evaluar el potencial de los probióticos en acuicultura (Verschuere et al. 2000, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655-671). Así, a mediados de los años 90 el número de publicaciones sobre probióticos en acuicultura era de 2 o 3 al año, mientras que en la actualidad este valor ha ascendido ya a 25 publicaciones anuales.

25

- En este sentido, para poseer interés como probióticos, los microorganismos deben de contar con algunas características biológicas concretas, tales como: i) ser capaces de sobrevivir durante su paso por el tracto digestivo del hospedador; ii) poseer capacidad de adhesión y colonización del tracto digestivo; iii) inhibir el crecimiento de bacterias patógenas; iv) ser inocuos para el animal que los ingiere; y iv) potenciar el estado inmune del hospedador. Pero, adicionalmente, si se pretende utilizar a estos microorganismos en condiciones reales de piscifactoría, junto a los anteriores, también han de cumplir con otros requisitos adicionales de tipo tecnológico antes de su aplicación práctica a escala industrial, como: i) permitir su producción a gran escala; ii) ser estables y viables durante tiempos prolongados de almacenamiento para poder comercializarse, iii) demostrar persistencia y viabilidad en el medio acuático; iv) permitir cierto grado de control de la dosis ingerida, mediante su vehiculación en medios inertes hasta los peces, entre otras.

30

35

- 45 En este contexto, en la Universidad de Málaga se aisló por primera vez, a partir del mucus de la piel de doradas (*Sparus aurata*) procedentes de acuicultura y en buen estado de salud, una cepa de bacteria identificada como *Shewanella* PDP11, con efecto

antagónico “*in vitro*” frente a varios patógenos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y dorada (Chabrillón et al. 2005, *Journal of Fish Diseases* 28: 531-537). Se ha demostrado que esta cepa cumple con los requisitos biológicos mencionados anteriormente para los microorganismos probióticos, y así, no es patógena para el lenguado senegalés, y es capaz de inhibir el crecimiento “*in vitro*” de bacterias ictiopatógenas (Chabrillón et al. 2005, *Journal of Fish Diseases* 28: 229-237). Asimismo muestra cierta resistencia a las condiciones intestinales de los peces, superando las barreras fisiológicas que se oponen a su colonización (p.ej., la acidez estomacal, la acción de la bilis, la hidrólisis enzimática, etc.), y produce un aumento significativo “*in vitro*” de la inmunidad celular (Díaz-Rosales et al. 2009, *Aquaculture* 293: 16-21). Por otra parte se ha comprobado que esta cepa bacteriana reduce significativamente la mortalidad en ejemplares juveniles del lenguado senegalés cuando son sometidos a una infección experimental con bacterias ictiopatógenas (Díaz-Rosales et al. 2009, *Aquaculture* 293: 16-21; García de la Banda et al. 2010, *Aquaculture* 306: 281-288). Igualmente se ha comprobado que la cepa en cuestión incrementa la tolerancia al estrés en juveniles de dorada mantenidos en altas densidades de cultivo (Varela et al. 2010, *Aquaculture* 309: 265-271) e incrementa los índices de crecimiento y de transformación de alimento en juveniles de lenguado senegalés y dorada (Sáenz de Rodríguez et al. 2009 *Aquaculture Nutrition* 15: 177-185; Varela et al. 2010, *Aquaculture* 309: 265-271) a la vez que modula la microbiota intestinal (Tapia-Paniagua et al. 2010, *Microbiology Ecology* 60: 310-319). Todas estas evidencias biológicas confirman que la cepa bacteriana *Shewanella* PDP11 es un potencial probiótico para acuicultura y en particular para peces marinos.

Desafortunadamente, a pesar de las ventajas anteriores, se han encontrado muchas otras limitaciones a la hora de lograr su administración práctica a los peces en condiciones reales de cultivo, por la extremada sensibilidad del microorganismo a las condiciones externas. En este sentido, la posible utilización a escala industrial no está resuelta, y así, la administración oral de este probiótico a peces cultivados es un problema, ya que su vehiculación en el pienso, bien sea impregnando los gránulos con una suspensión que contiene las bacterias, o bien incorporándolas directamente en el pienso, no aporta todos los beneficios deseables atribuibles a su empleo como probiótico y ha resultado un fracaso cuando se trata de administrar esta cepa en forma viable a escala de piscifactorías, habiéndose comprobado que *Shewanella* PDP11 pierde totalmente su viabilidad a los pocos días, independientemente del procedimiento que se utilice (Díaz-Rosales et al. 2006, *Fish and Shellfish Immunology* 20: 482-492). Así, aunque experimentalmente, a escala de laboratorio, ha demostrado su efectividad “*in vivo*”, la bacteria se muestra muy sensible durante las distintas etapas del proceso tecnológico de la elaboración de los piensos (deshidratación, altas temperaturas, presiones, etc.), cuando ésta se incorpora a los mismos, perdiendo su viabilidad-supervivencia de una manera definitiva. Incluso la administración junto al alimento una vez fabricado éste tiene la desventaja de que la propia naturaleza del pienso (fundamentalmente su alta presión osmótica derivada de su escasa humedad), o los procesos tecnológicos utilizados para su elaboración, inactivan también a las células probióticas en periodos cortos de tiempo (León-Rubio et al. 2005, *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura* pp. 16-17; García de la Banda, 2011, *Tesis Doctoral*, Universidad de León). Este hecho complica su posible utilización comercial, al limitar definitivamente el número de células viables que pueden alcanzar el tracto gastrointestinal del pez, siendo deseable que las células probióticas se mantengan viables en

altas concentraciones hasta que alcancen los tramos del aparato digestivo del pez donde ejercen sus efectos beneficiosos.

En estas circunstancias, la administración de este probiótico con el pienso no garantiza el cumplimiento de las normativas de la Unión Europea relativas al uso de aditivos para piensos. Por ejemplo, en el Reglamento (CE) nº 2148/2004 de la Comisión de 16 de diciembre de 2004 relativo a las autorizaciones permanentes y provisionales de determinados aditivos y a la autorización de nuevos usos de un aditivo ya permitido en la alimentación animal, se hace referencia a que la concentración de células probióticas viables en piensos para animales monogástricos debe de estar comprendida en el rango de 10^9 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) por kg de pienso y, es evidente que esta concentración no se puede garantizar para el caso concreto de *Shewanella* PDP11. Por otro lado, la manipulación tecnológica del pienso para incorporar a las bacterias acelera la disgregación del mismo en el agua, dificultando un adecuado control de la cantidad total de alimento que es ingerida por los peces, y creando problemas adicionales relacionados con el desperdicio de pienso y con la calidad del agua.

Se han descrito varios preparados para la administración oral de probióticos a peces de cultivo (Salinas et al. 2005, *Fish and Shellfish Immunology* 19: 67-77). En todos ellos, los probióticos se añaden o se mezclan directamente con el pienso sin ningún tratamiento previo. La elevada mortalidad que *Shewanella* PDP11 sufre durante las distintas etapas de fabricación de piensos (p.ej., calentamiento, sobrepresión, deshidratación) reduce su utilidad como probiótico. Existen otros procedimientos para aumentar la supervivencia de las bacterias, como son la conservación por liofilización junto a sustancias prebióticas (Corcoran et al. 2004, *Journal of Applied Microbiology* 96: 1024-1039), pero en el caso de *Shewanella* PDP11, tampoco esta estrategia de conservación ha resultado viable.

A la vista de los antecedentes expuestos, el preparado basado en la encapsulación de la cepa microbiana *Shewanella* PDP11 en alginato cálcico que se presenta pretende resolver estas limitaciones de tipo tecnológico, que deben superarse para su utilización comercial, sin que se pierdan las valiosas propiedades biológicas demostradas en condiciones de laboratorio. También se han descrito otros procedimientos de encapsulación de bacterias en alginato muy similares al presentado, donde la bacteria a administrar se encapsula en alginato. Sin embargo, estas microcápsulas están diseñadas para ser incluidas en los piensos (Romalde et al. 2004, *Aquaculture* 236: 119-129; Rodríguez et al. 2006, *Process Biochemistry* 41: 638-643), y no contemplan la eventualidad de una administración directa a los peces en el medio acuático independientemente del pienso, con las limitaciones que se comentarán más adelante, por lo que tampoco serían apropiadas para la administración oral de *Shewanella* PDP11. La novedad del preparado que se presenta es que, además de solventar la supervivencia de la bacteria específica fuera de su medio de cultivo y de probados efectos probióticos, garantiza su estabilidad en el medio acuático por tiempo suficiente para asegurar su ingesta en las condiciones reales de cultivo que se dan en las piscifactorias, e incluye sustancias atrayentes en la propia cápsula, lo que favorece la ingesta voluntaria por parte del pez sin necesidad de que el probiótico tenga que incorporarse en el alimento habitual.

Por todo esto, si se quieren aprovechar las ventajas anteriormente descritas del probiótico, o para poder producirlo a escala industrial y ser estable y viable por tiempos prolongados de almacenamiento para poder comercializarse, resulta imprescindible desarrollar un preparado específico que permita vehicular por vía oral la cepa microbiana

5 *Shewanella* PDP11 a los peces y que cumpla con los siguientes requisitos específicos;

- 1) que pueda administrarse independientemente del alimento habitual,
- 2) que mantenga la viabilidad-supervivencia de las células hasta que sea administrado a los peces fuera de su medio de cultivo,
- 10 3) que no se diluya o pierda propiedades durante el tiempo que transcurre entre que se añade al medio acuático y el animal lo ingiere,
- 4) que los animales se sientan atraídos por el mismo y lo ingieran, y
- 5) durante su tránsito por el tubo digestivo, se asegure la llegada al intestino de un número suficiente de bacterias para ejercer su efecto.

15

Además, este preparado debe de estar elaborado con ingredientes de grado alimentario, de fácil disponibilidad en el mercado y de bajo coste. Uno de los ingredientes ampliamente utilizados para la inmovilización de células y usado con aglutinante en la fabricación de alimentos es el alginato.

20

El alginato es un heteropolisacárido aniónico natural que se extrae de varias especies de algas, constituido por ácido D-manurónico y L-gulurónico y que en presencia de calcio puede producir geles. Los iones divalentes, como el Ca^{2+} , se unen preferentemente al polímero de ácido L-gulurónico. Como polímero para formar hidrogeles, el alginato cálcico es muy apropiado debido a su simplicidad, ausencia de toxicidad, biocompatibilidad y bajo coste (Sheu y Marshall 1993, *Journal of Food Science* 54: 557-561). La solubilización de la matriz de alginato cálcico cuando los iones calcio son secuestrados es otra ventaja de este ingrediente. Esta propiedad lo hace especialmente valioso para la administración oral, puesto que el pH alcalino del intestino solubiliza el polímero, y permite la liberación de su contenido.

30

La encapsulación o inmovilización mejora la viabilidad de las bacterias probióticas en los alimentos y durante su tránsito por el tracto gastro-intestinal (Chandramouli et al. 2004, *Journal of Microbiological Methods* 56: 27–35). La patente estadounidense nº

35 US2007/0048295 presenta un método para la inmovilización de células en matrices basadas en alginato cálcico mediante el proceso denominado de gelificación externa. Sin embargo, las cápsulas obtenidas con dicho procedimiento no satisfacen los requisitos anteriormente expuestos para vehicular por vía oral el probiótico *Shewanella* PDP11 a peces de acuicultura. Utilizando una adaptación del proceso de encapsulación descrito

40 en la patente anteriormente citada se ha elaborado un preparado, basado en la encapsulación del probiótico *Shewanella* PDP11 en hidrogeles de alginato como vehículo para su administración oral en peces cultivados que i) mantiene la viabilidad del probiótico dentro del preparado durante periodos de almacenamiento de al menos un mes, ii) que puede administrarse independientemente del alimento, ii) que mantiene la

45 cantidad y la vitalidad de las células probióticas en el medio acuático hasta que los peces lo ingieren, iii) que los animales se sienten atraídos hacia él y lo ingieren, iv) que protege al probiótico durante su tránsito por el tracto gastro-intestinal de los peces, y v) que

permite vehicular a las bacterias viables hasta tramos posteriores del tubo digestivo de los peces. La presente invención satisface todas estas necesidades.

Descripción de la invención

5

La invención consiste en un preparado constituido por cápsulas basadas en alginato cálcico que contienen células viables de *Shewanella* PDP11. Esta cepa microbiana es una bacteria probiótica para peces de acuicultura. Se ha demostrado su efectividad tanto *in vivo* como *in vitro*, pero esta cepa es muy sensible cuando se incorpora a los piensos, perdiendo drásticamente su viabilidad-supervivencia y, por lo tanto, los efectos beneficiosos del probiótico sufren serias limitaciones cuando se administra de esta forma. Por el contrario, las ventajas biológicas de *Shewanella* PDP11 pueden aprovecharse si el probiótico es vehiculado en el preparado que se describe.

10

15

El preparado se formula mezclando las bacterias a la concentración deseada con un volumen adecuado de la sustancia que va a originar las cápsulas de hidrogel (que comprende como componente principal al alginato, pero que puede incluir también quitosano, gelatina o una mezcla de ellas) en proporciones variables (típicamente de 0,5 a 4%, en relación peso/volumen, p/v), así como una cantidad de una o varias sustancias atrayentes (típicamente en proporción 1:4 p/v), empleadas de forma aislada o en combinación, autorizadas para uso alimentario, que comprenden harina de crustáceo, harina de mejillón, harina de calamar, harina de pescado y/o aceite de pescado, a unas concentraciones tales que no dificulten la elaboración de las cápsulas. Las cápsulas pueden elaborarse de manera sencilla extrusionando la mezcla anterior gota a gota a través de una aguja sobre una solución de cloruro cálcico (CaCl_2) (típicamente de 0,5 a 3% p/v) de tal modo que, cuando las gotas caen en el fluido en agitación continua, tiene lugar la gelificación de la superficie, formándose cápsulas esféricas y sólidas (de diámetro variable normalmente entre 0,5 y 7 mm) que pueden ser almacenadas en un ambiente húmedo hasta su administración a los peces.

20

25

30

El preparado específico permite vehicular oralmente el probiótico *Shewanella* PDP11 a peces de acuicultura y presenta las siguientes ventajas respecto a su administración conjunta con el alimento:

35

1) mantiene la viabilidad del probiótico dentro del preparado durante periodos de almacenamiento de al menos un mes, sin requisitos especiales.

2) se administra independientemente del alimento,

3) la cantidad y la viabilidad de las bacterias probióticas se mantienen estables dentro del preparado durante su permanencia en el medio acuático,

40

4) los animales se sientan atraídos por él y lo ingieren,

5) el preparado soporta el ambiente adverso para la supervivencia de las bacterias desnudas durante su tránsito por el tubo digestivo (condicionado por valores extremos de pH e hidrólisis enzimática), y

45

6) permite vehicular a las bacterias viables hasta tramos posteriores del tubo digestivo de los peces, donde ejercen efectos beneficiosos.

Breve descripción de las figuras

Para la mejor comprensión de cuanto queda descrito en la presente memoria, se acompañan unos dibujos en los que, tan sólo a título de ejemplo, se incluyen las figuras 1 a 6.

Figura 1. Aspecto morfológico del preparado del probiótico *Shewanella* PDP11 basado en la encapsulación en hidrogeles de alginato según el ejemplo 1 descrito en el presente invento. Las cuadrículas menores a la izquierda de la figura representan 1 mm².

Figura 2. Viabilidad de las células probióticas *Shewanella* PDP11 encapsuladas en un hidrogel de alginato cálcico y almacenadas a 4 y 22 °C durante 30 días.

Figura 3. Viabilidad de las células probióticas *Shewanella* PDP11 en las cápsulas sumergidas en agua de mar durante distintos tiempos.

Figura 4. Liberación de las células probióticas *Shewanella* PDP11 (log UFC/mL) desde las cápsulas de alginato a diferentes tiempos en condiciones intestinales simuladas a distintos valores de pH. El control representa el número máximo de células viables que pueden liberarse desde las cápsulas.

Figura 5. Supervivencia de las bacterias *Shewanella* PDP11 encapsuladas en alginato durante su exposición a condiciones gástricas (pH 4) e intestinales (pH 9) de pez simuladas y de forma secuencial a 25 °C.

Figura 6. Presencia de células viables de *Shewanella* PDP11 en el tracto intestinal de lenguado senegalés según la pauta de administración del probiótico. Tratamiento A: administración durante 7 días de un alimento suplementado con el probiótico *Shewanella* PDP11 incorporado directamente al pienso mediante pulverización. Tratamiento B: administración de cápsulas con probiótico durante 7 días. Tratamiento C: administración durante 7 días de un alimento control que no contiene células probióticas. En todos los casos, los valores en la ordenada de la gráfica representan el porcentaje de peces de cada tratamiento que presentaron células viables de *Shewanella* PDP11 en sus intestinos en los distintos días analizados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En ensayos previos se ha confirmado que *Shewanella* PDP11 es un potencial probiótico para peces de acuicultura. Sin embargo, cuando se incorpora en el pienso para su administración oral a los animales pierde completamente su viabilidad después de cortos periodos.

Se ha considerado que es necesario la elaboración de un preparado que mantenga su viabilidad y permita su administración a los peces de forma independiente del pienso. Se han tenido en cuenta los avances que se están produciendo en la encapsulación o inmovilización de células probióticas en las áreas de alimentación humana y animal, para

la consecución de un preparado que incluya a este probiótico y que lo mantenga viable hasta que los peces lo ingieran y que, además, este compuesto por sustancias no tóxicas, compatibles con el uso alimentario, y que puedan ser utilizables en condiciones reales de acuicultura.

5

El método para elaborar el preparado de células de *Shewanella* PDP11 viables en la presente invención se basa en una modificación del proceso de encapsulación descrito en la patente estadounidense US2007/0048295 A1, que se ha optimizado para conseguir superar los requisitos tecnológicos específicos para su utilización en el medio acuático y en el tracto intestinal de los peces, y además, incorpora ingredientes nutritivos en el interior de las cápsulas que actúan como atrayentes químicos y/o visuales para los peces. La obtención de este preparado de *Shewanella* PDP11 comprende las siguientes etapas:

- 15 a) Preparar la solución gelificante que contiene las bacterias probióticas y los ingredientes atrayentes.
- b) Extruir dicha solución gota a gota.
- c) Introducir las gotas extruídas en una solución gelificadora para formar las cápsulas
- d) Permitir que las cápsulas formadas solidifiquen adecuadamente.
- e) Recuperar las cápsulas y almacenarlas hidratadas hasta su uso.

20

La cepa *Shewanella* PDP11 empleada en este preparado ha sido aislada en España a partir de mucosa de la piel de dorada (*Sparus aurata*). La cepa está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT 7627. Las células crecidas en caldo triptona de soja (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) suplementado con 15 g/L NaCl tienen morfología de bacilos móviles, tinción gram negativa y son oxidasa y catalasa positivas. Son sensibles al agente vibriostático O/129 y capaces de crecer a 4° y 37 °C así como en ausencia de cloruro sódico (NaCl) y en medios conteniendo 6% de NaCl. Igualmente, la cepa PDP11 ha sido identificada como *Shewanella putrefaciens* mediante amplificación y secuenciación de un fragmento de ácido desoxinucleico (DNA) ribosómico correspondiente a la subunidad 16S. Para ello se han utilizado los siguientes primers universales: S D-Bact-0008-a-S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y SD-Bact-1492-a-A-19 (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), tal como se especifica en el artículo de Díaz-Rosales et al. 2009, *Aquaculture* 293: 16-21.

35 A partir de preinóculos de la cepa en fase logarítmica de crecimiento se inoculan tubos de ensayo con 5 mL de caldo de TSB suplementado con 15 g/L NaCl por un periodo de 24 horas a 22°C y en agitación continua. Posteriormente, diluciones apropiadas del cultivo líquido se distribuyen en placas de agar con triptona de soja (TSA; Oxoid) y 15 g/L NaCl utilizando un hisopo de algodón estéril. Seguidamente las placas se incuban a 22°C durante 24 h. Las suspensión bacteriana se prepara tras raspado de las células de las placas con un portaobjetos estéril para obtener la masa bacteriana y, posteriormente, se añade solución salina estéril hasta obtener una concentración final de bacterias de aproximadamente 10¹¹ UFC/mL. A partir de esta suspensión celular se elabora el preparado de la presente invención.

45

Los ingredientes utilizados en la elaboración de las cápsulas del presente invento están autorizados para su uso en alimentación animal, están disponibles en el mercado y son

de bajo coste. El alginato presente en la mezcla reacciona con las sales de calcio mediante un proceso de polimerización iónica formando un hidrogel en el cual quedan englobadas las bacterias probióticas y el resto de ingredientes que actúan como atrayentes para los peces de acuicultura.

5

Si es necesario (en particular en el caso de que la utilización de las cápsulas no sea inmediata), los ingredientes utilizados para la elaboración de las cápsulas, a excepción de la suspensión de células bacterianas, deben de ser esterilizados antes de su uso mediante autoclave o, en el caso de los ingredientes sólidos por radiación UV. Esta precaución no

10

será necesaria si transcurre poco tiempo entre la preparación y la utilización.

La forma de preparar las cápsulas es mezclando la suspensión bacteriana a encapsular con un volumen adecuado de alginato, típicamente en proporción 1:10 (v/v), así como una cantidad de una o varias sustancias atrayentes, autorizadas para uso alimentario, a

15

unas concentraciones tales que se muestren efectivas para la especie concreta a la que vayan destinadas las cápsulas, y que no dificulten la elaboración de éstas (típicamente en proporción 1:4 p/v).

La concentración final de alginato utilizada en la presente invención es preferiblemente

20

de 0,5 a 4% (p/v), si bien concentraciones comprendidas entre 1-2% son más recomendables para maximizar la esfericidad de las cápsulas y su capacidad para mantener la viabilidad de las células probióticas durante el almacenamiento, distribución en el agua, de las mismas, o durante su tránsito por el tracto gastrointestinal.

Las sustancias atrayentes pueden utilizarse de forma aislada o en combinación. Éstas deben de ser solubles, estar finamente particuladas o tamizadas por una malla de luz de 100 μm . Por término general y para obtener cápsulas de tamaño uniforme con contenido homogéneo, los ingredientes no deben de incluir partículas de un tamaño superior al 25% del tamaño final de las cápsulas que se pretendan elaborar. Como atrayentes, sin ser

25

30

a) ingredientes de naturaleza proteica y de origen marino con un contenido entre 40- 80% de proteína cruda, por ejemplo harina de crustáceo, harina de mejillón, harina de calamar, harina de pescado, hidrolizado de estas harinas, etc.,

35

b) piensos formulados con los ingredientes anteriores, y otros autorizados para alimentación animal, en proporciones adecuadas como para que la mezcla resultante contenga entre 40-60% de proteína cruda y entre 10-18% de lípidos totales.

40

c) piensos comerciales para acuicultura con un contenido entre 40-60% de proteína cruda y entre 10-18% de lípidos totales, convenientemente molturados y tamizados según las especificaciones anteriores, y

d) colorantes alimentarios autorizados para alimentación, por ejemplo, sin ser excluyentes, para obtener cápsulas de color rojo: E-110, E-129 ó E-160.

45

Las posibilidades de elaboración de las cápsulas que se proponen son amplias, existiendo equipos automatizados en mayor o menor medida, disponibles en el mercado (Nisco Engineering AG, EncapBioSystems Inc., entre otras marcas comerciales). No obstante, si

no se dispone de ellos y a modo de ejemplo, las cápsulas pueden elaborarse de manera sencilla utilizando el procedimiento que se describe a continuación. Tras homogenizar con una agitación vigorosa, la mezcla resultante es goteada lentamente a través de una aguja sobre una solución de CaCl_2 (típicamente de 0,5 a 3% p/v) desde una altura tal que, cuando las gotas caen en el fluido en agitación continua, tiene lugar la gelificación de la superficie, formándose una cápsula esférica y sólida. La agitación se mantendrá el tiempo suficiente para que las cápsulas se endurezcan, retirándose a continuación el exceso de líquido para ser almacenadas en un ambiente húmedo hasta su uso. Para la aplicación concreta que se propone, la concentración óptima en relación con todos los parámetros estudiados, incluyendo el coste/beneficio, se ha mostrado que oscila entre el 1-2%.

Cuando se pretendan administrar las cápsulas a peces provistos de estómago y con el propósito de incrementar la estabilidad de las células probióticas *Shewanella* PDP11 durante el tránsito de las cápsulas por el estómago del animal, la solución gelificadora de CaCl_2 debe de contener quitosano en una concentración del 0,1-1% y estar ajustada a pH 5,5. El quitosano es un copolímero natural del tipo amino-polisacárido compuesto por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina [poli(N-acetil-D-glucosamina)], que es obtenido por la desacetilación alcalina de la quitina, principal material estructural en los exoesqueletos de crustáceos y otras especies animales. Se trata del único polisacárido catiónico natural y es conocido por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, así como por su resistencia a las condiciones gástricas y su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, esto último incrementa el tiempo de contacto de las cápsulas con las mucosas del intestino.

Dependiendo de la especie de destino, así como de la edad y tamaño de los individuos que las ingerirán, las cápsulas pueden elaborarse con un rango de diámetros variable (normalmente entre 1 y 5 mm). Dicho diámetro puede regularse de dos formas: 1) modificando las concentraciones relativas de alginato en la mezcla gelificante y de CaCl_2 en la mezcla gelificadora; y 2), para una misma concentración de alginato y de CaCl_2 , modificando el diámetro de las boquillas de salida de la solución a gelificar. En el caso del procedimiento sencillo descrito anteriormente, este efecto puede conseguirse intercambiando agujas de distinto calibre a la salida del dispositivo goteador (p. ej., con una aguja de 25G de 16 mm x 0,5 mm se consiguen diámetros de $2,06 \pm 0,13$ mm para una solución del 2% de alginato y 1% de CaCl_2). Estas estrategias permiten obtener cápsulas de una amplia gama de tamaños que podrán ajustarse a las necesidades concretas de cada caso.

La eficiencia de encapsulación del probiótico oscila entre el 80 y 100% según las concentraciones de alginato y CaCl_2 utilizadas. Por ejemplo, es prácticamente completa (95-100%) cuando las condiciones utilizadas son 2% alginato sódico y 1% CaCl_2 . El contenido medio de células de *Shewanella* PDP 11 vivas en una cápsula estándar de 2 mm de diámetro es del orden de 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias). No obstante, con el presente invento se puede establecer una dosificación precisa de la cepa probiótica y este hecho permite 1) ajustarse a los estándares de aplicación de probióticos en alimentación animal según las normativas comunitarias; 2) no despilfarrar producto innecesariamente, y 3) realizar un control más directo de la ingesta real de probióticos por parte de los animales.

La viabilidad-supervivencia de las células *Shewanella* PDP11 en las cápsulas es mejor cuando se almacenan a 4-8 °C que cuando se hace a 22-23 °C. En refrigeración las células mantienen del 80 al 95% de su viabilidad-supervivencia después de 30 días y a temperatura ambiente (22 °C) estos porcentajes son cercanos al 70%. El hecho de que las células se mantengan viables en las cápsulas durante 30 días propicia una doble posibilidad de preparación-administración de las mismas a los peces: 1) preparación en fresco y administración inmediata, y 2) preparación y administración en diferido. En este último caso, es de esperar que se produzcan pérdidas de bacterias viables, dependiendo de las condiciones de almacenamiento, que puede compensarse con un incremento de la dosis de cápsulas. De todos modos, incluso en el más desfavorable de los supuestos ensayados, cuando las cápsulas se almacenan a 22 °C durante un tiempo prolongado (1 mes), se observa una persistencia entre el 60 y 70% en la viabilidad-recuperación de las células. Para un periodo corto de almacenamiento (una semana) no se han observado diferencias entre la conservación en refrigeración o sin ella.

La administración de las cápsulas es por vía oral y el preparado se administra hidratado, de forma independiente del alimento, y en cantidad suficiente para asegurar, al menos, la ingesta de una dosis de 3×10^8 UFC/pez y día. El Reglamento (CE) nº 2148/2004 antes mencionado, indica que la concentración de células probióticas viables en piensos para animales monogástricos debe de estar comprendida en el rango de 10^9 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) por kg de pienso. Teniendo en cuenta que la ingesta media diaria de pienso de los peces en piscifactoría es del 2-3% del peso vivo, es evidente que la ingesta por animal de una sola cápsula de 2 mm de diámetro que contiene 10^8 UFC del probiótico supera la cantidad del mismo que un pez podría ingerir con el pienso. A modo de ejemplo, un pez de 200 g que ingiriera 4-6 g de pienso con 10^{10} UFC/kg, tomaría al día únicamente entre $4-6 \times 10^7$ UFC. Una sola cápsula de las que se proponen superaría esta cantidad incluso en peces de ese peso, pero las cápsulas serían particularmente interesantes en peces de menor tamaño (decenas de gramos), en los que la ingesta diaria de probiótico vehiculado en pienso sería todavía mucho más baja, comprometiendo el efecto biológico que se pretende.

Con el preparado de *Shewanella* PDP11 de esta invención se consigue aunar las ventajas de la encapsulación al hecho de que estas cápsulas puedan ser utilizadas tal cual sin necesidad de incorporarse al pienso, ya que el atrayente que posibilita la ingesta voluntaria por parte del pez está incluido en la propia cápsula. Además, permite la administración oral de la bacteria probiótica de forma independiente del alimento, por lo que no es un sustitutivo del pienso, sino un tratamiento complementario que se puede realizar de forma previa (preferentemente) o posterior a la administración del pienso de los peces cultivados sin alterar su patrón habitual de alimentación. Además, con el preparado objeto de la invención, las bacterias encapsuladas son viables al llegar al intestino, donde pueden adherirse, multiplicarse y ejercer su función como reguladores de la microbiota intestinal. Así, la administración durante una semana de estas cápsulas de alginato que incluyen células de *Shewanella* PDP11 y atrayentes permite aislar dichas bacterias en el intestino de los peces; por el contrario, cuando el probiótico se incorpora directamente al alimento mediante pulverización, éste no se detecta en ninguno de los peces alimentados con dicho pienso. Una vez que dejan de administrarse las cápsulas a

los peces el tiempo de permanencia de las células probióticas en el digestivo del animal es, como mínimo, de 4 a 6 días.

La invención que se propone cumple el requisito de novedad, puesto que no ha sido
5 difundida por descripción escrita u oral, ni ha sido utilizada más allá del ámbito experimental en el laboratorio, antes de solicitar la patente.

La actividad inventiva supone una aportación nueva sobre el estado de la técnica desde un doble punto de vista:

10

1. A pesar de que la cepa *Shewanella* PDP11 no es una bacteria intestinal y de que ha sido aislada de la piel de peces marinos, sus efectos biológicos beneficiosos cuando es administrada por vía oral a los peces en los ensayos en laboratorio permite su uso específico con la finalidad probiótica.

15

2. La inclusión en el vehículo polimérico cuyas características se han descrito en los apartados correspondientes resuelve el problema tecnológico principal que limita la utilización práctica de la bacteria probiótica, y que consiste en la escasa supervivencia de la cepa bacteriana fuera de su medio de cultivo. Esta debilidad
20 impide por completo su utilización a escala comercial si no se vehicula y protege con la invención que se propone.

20

Entendemos que la invención que se propone es susceptible de explotación industrial, estimando que la relación coste/beneficio de su explotación es favorable por las
25 siguientes razones:

25

1. El cultivo de la cepa *Shewanella* PDP11 es sencillo, sin necesidad de medios específicos complejos que necesiten factores de crecimiento costosos o complicados de manejar. Desde este punto de vista, el cultivo se puede
30 desarrollar a escala industrial sin problemas.

30

2. La fabricación del vehículo encapsulador no requiere de un aparataje excesivamente costoso, dado que existe disponible en el mercado una amplia variedad de maquinaria a precios razonables para todas las escalas industriales que se precisen. La razón estriba en la multitud de aplicaciones, sobre todo
35 farmacológicas, que utilizan diversas formas de encapsulación, y por eso la producción industrial de la invención que se propone es perfectamente factible.

35

3. Las sustancias utilizadas en la fabricación de las cápsulas son ingredientes autorizados para uso alimentario, fácilmente accesibles y baratos.

40

4. Los rendimientos de encapsulación del cultivo son excelentes (90-95%), y su supervivencia en el vehículo es también muy elevada, de tal manera que la práctica totalidad de las bacterias viables obtenidas en el cultivo pueden acabar en
45 las cápsulas, sin apenas pérdidas.

45

- 5 5. La facilidad para regular tanto el diámetro como el contenido bacteriano de las cápsulas hace al procedimiento enormemente versátil. Así, la fabricación puede adaptarse a necesidades específicas relacionadas con el tamaño y con la especie de pez que interese, utilizando siempre la misma maquinaria, sin necesidad de líneas industriales paralelas o multiplicadas.

10 La realización de la invención se describe con más detalle mediante los ejemplos que se acompañan a continuación. Los ejemplos de realización preferida están orientados exclusivamente a proporcionar una descripción más completa de las realizaciones de la invención seleccionadas y no deberían ser consideradas como limitantes del alcance de la misma.

15 Ejemplos de realización de la invención

15 Cuando se describe la realización preferida de la presente invención, las especificaciones indicadas pueden describirla como una secuencia de pasos a seguir en un orden muy concreto. Sin embargo, considerando que la obtención del preparado no está limitado al orden particular de los pasos a seguir establecidos en este documento, su obtención
20 debería de no limitarse a la secuencia particular que se describe. Es evidente que cualquier experto en la técnica apreciaría que es posible obtener un producto similar variando la secuencia de pasos, y por ello, el orden particular de los pasos a seguir descritos en la realización preferida de la invención no debe de interpretarse como una limitación de las reivindicaciones. Por lo tanto, la secuencia de pasos a seguir para la
25 realización de la invención puede ser variada en el orden, pero aún así seguiría estando dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Encapsulación del probiótico *Shewanella* PDP11.

30 Se utilizó la encapsulación en alginato como método de referencia para la elaboración del preparado de bacterias probióticas. El proceso se desarrolló del siguiente modo:

35 De una placa de Petri sembrada en césped y tras su incubación durante 24 horas a 22 °C, se recogió con un portaobjetos la biomasa bacteriana de la superficie y se llevó a un tubo estéril en el que se añadieron 15 mL de NaCl estéril al 0,85% (autoclavado a 120 °C durante 20 minutos). La concentración de células viables tras realizar el recuento en placa fue del orden de 10^{11} UFC/mL.

40 Se dispensaron 375 μ L de la suspensión celular anterior en un tubo de ensayo de vidrio estéril (previamente se agitó la suspensión celular para procurar que fuese homogénea). A continuación se añadieron 4,525 mL de una solución de alginato sódico estéril al 3% y se mezcló el conjunto cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.

45 Seguidamente se añadió suavemente sobre la solución anterior 1 g de pienso (preparado según se recoge en la Tabla 1, convenientemente molturado y tamizado por una malla de 100 μ m), evitando la formación de burbujas. La mezcla homogénea resultante se mantuvo a 40 °C durante todo el proceso de elaboración de las cápsulas utilizando un baño de agua.

- En un vaso de precipitados se dispensaron 40 mL de una solución estéril de CaCl_2 al 2%. Seguidamente se extrusionó, desde una altura de 14 cm, la mezcla compuesta por el alginato, las bacterias probióticas y el pienso sobre la solución de CaCl_2 que se mantuvo en agitación continua a baja velocidad (500 rpm) mediante un agitador magnético. El proceso de extrusión “gota a gota” se automatizó mediante una bomba peristáltica que hizo pasar la mezcla a gelificar a través de un catéter de silicona en cuyo extremo se colocó una agua de 16G.
- 10 Una vez formadas las cápsulas (Figura 1) se dejaron gelificar durante 30 minutos en la solución de CaCl_2 , manteniéndose el conjunto en agitación. Seguidamente se recogieron, lavaron con agua destilada estéril y almacenaron hidratadas en una solución estéril de NaCl al 0,85%.
- 15 Se obtuvieron 250 cápsulas esféricas de contenido homogéneo, con un diámetro medio de 2,7 mm y un peso medio húmedo de 16 mg conteniendo células viables en el rango de 10^8 - 10^9 UFC por cápsula.

Ejemplo 2: Viabilidad de *Shewanella* PDP11 en las cápsulas en condiciones de almacenamiento.

Se comparó la viabilidad-supervivencia de las bacterias probióticas encapsuladas en alginato frente a su incorporación directa en el alimento.

25 Cuando se compararon los resultados de viabilidad obtenidos para este preparado con los que proporcionan otros procedimientos convencionales para la administración de probióticos que incluyen microencapsulación e inclusión de dichas microcápsulas en el pienso mediante extrusión, las diferencias fueron evidentes y favorables al preparado que se presenta en esta invención constituido por cápsulas de alginato que contienen al probiótico *Shewanella* PDP11 y atrayentes. El preparado obtenido según se describe en el ejemplo de realización preferida 1 permitió elaborar partículas homogéneas y esféricas con una carga bacteriana comprendida entre 10^8 y 10^9 células viables por cápsula dependiendo de la concentración celular inicial utilizada en la elaboración de las mismas.

35 La viabilidad-supervivencia de las células se mantuvo durante un periodo de almacenaje de hasta 30 días (Figura 2). Por el contrario, en un ensayo realizado por triplicado con el pienso descrito en la Tabla 1 al que se le incorporaron las bacterias antes de su granulación, se comprobó que la tasa de viabilidad-supervivencia fue nula transcurridas 24 h desde la elaboración del pienso, independientemente del método utilizado para ello (Tabla 2). En todos los casos, los recuentos de células viables disminuyeron progresivamente desde el tiempo inicial (0 h) hasta ser nulos (0 UFC por gramo de pienso) a las 24 h de mantener el pienso a temperatura ambiente (22 °C).

Ejemplo 3: Estabilidad de las cápsulas en agua de mar.

45 En el caso de que las cápsulas no sean ingeridas inmediatamente por los peces tiene interés evaluar la estabilidad de las células probióticas en las cápsulas durante su permanencia en el agua de mar y hasta que puedan ser ingeridas por los peces.

Para ello se realizó un ensayo con el objeto de comprobar si las bacterias se liberaban de las cápsulas cuando se suspendían en agua de mar. Así se elaboraron cápsulas según se describe en el ejemplo 1 y se dispusieron en un vaso de precipitados con agua de mar estéril, en agitación (400 rpm) y a temperatura ambiente. A distintos tiempos (0, 30, 60, 120 y 180 minutos) se tomaron muestras de 0,5 mL de la solución de mar en la que estaban suspendidas las cápsulas y se hizo el recuento de bacterias viables por cuadruplicado. En todos los casos se comprobó que no existía liberación de las bacterias desde las cápsulas al agua de mar. Esta es una ventaja enorme desde una perspectiva práctica ya que mientras permanecen en la columna de agua antes de su ingesta, las cápsulas no reducen su contenido en células probióticas viables.

Paralelamente para evaluar la estabilidad de las bacterias en el interior de las cápsulas, éstas se incubaron en 10 mL de agua marina filtrada (35‰, pH 7,8), tomándose muestras de cápsulas a distintos tiempos (0, 1, 2 y 3 h) para cuantificar las células viables contenidas en las mismas. Los resultados obtenidos indican que la viabilidad de *Shewanella* PDP11 en las cápsulas no se ve afectada tras tres horas de permanencia en agua de mar, por lo que se puede concluir que las cápsulas son estables al menos durante 3 horas, tiempo más que suficiente para que los animales las puedan ingerir (Figura 3).

Los resultados obtenidos indican que las cápsulas mantienen viable al probiótico encapsulado, es decir cuando están en el agua de mar y fuera del tracto digestivo del pez.

Ejemplo 4: Liberación *in vitro* de las células probióticas desde las cápsulas en condiciones intestinales simuladas de pez.

Efectivamente se ha comprobado que las cápsulas son ingeridas por los peces, pero tras su paso por el estómago del pez ha de producirse la liberación de las células probióticas desde las cápsulas al intestino. Este hecho es fundamental para que las bacterias puedan crecer y colonizar el tubo digestivo, de lo contrario los microorganismos serían eliminados con las cápsulas a través de las heces sin poder ejercer su efecto beneficioso.

La cinética de liberación de las células de *Shewanella* PDP11 desde las cápsulas se analizó realizando un ensayo *in vitro* en el que las cápsulas se sometieron a las condiciones intestinales que se presentan en peces de acuicultura. Para ello, las cápsulas obtenidas en el ejemplo de realización preferida número 1 se incubaron en 5 mL de una solución 0,1 M de KH_2PO_4 ajustada a distintos valores de pH (en concreto se ensayaron los valores de pH 7, 8 y 9) y a 25 °C durante 3 horas. Se tomaron muestras de 500 µL de la solución en la que estaban dispersas las cápsulas a distintos tiempos (0, 30, 60, 120 y 180 minutos), y se realizó el recuento de células viables liberadas en la solución tamponada desde las cápsulas.

La Figura 4 muestra que tras 30 minutos de permanencia de las cápsulas en el medio intestinal simulado se produce la liberación completa de las células de *Shewanella* PDP11 (en todos los valores de pH analizados se llega al mismo nivel de células viables que en el ensayo control, que representa el máximo número de bacterias que se pueden liberar desde las cápsulas). La liberación fue completa en todas las condiciones ensayadas tras 30 min. Este hecho es muy importante, porque el tránsito en peces es rápido, y el tubo digestivo relativamente corto en peces carnívoros, que son los de más interés en la

acuicultura mediterránea, y en estos casos, no sería interesante que fueran cápsulas muy estables con una liberación retardada del probiótico.

5 El valor de pH solo mostró tener influencia sobre la liberación de células al inicio del ensayo, con tasas superiores a pH 7 en comparación con pH 8 ó 9. La liberación temprana posibilita la total colonización de la región intestinal, y no solamente en las regiones finales. Esto podrá garantizar unos efectos beneficiosos amplios en todos los tramos donde se lleva a cabo la digestión de manera efectiva.

10 Las células probióticas se liberan de las cápsulas en las condiciones de la región intestinal de los peces, es decir a un rango de pH de 7 a 9.

Ejemplo 5: Supervivencia del preparado de *Shewanella* PDP11 durante su exposición a condiciones gastrointestinales de pez simuladas.

15 Se prepararon cápsulas conteniendo el probiótico *Shewanella* PDP11 según se describe en el ejemplo 1 y se realizó una simulación digestiva que incluyó la fase estomacal e intestinal de forma secuencial, es decir ácida seguida de alcalina. Para ello, se combinaron un pH estomacal (pH 5) con un pH intestinal (pH 9). Las condiciones seleccionadas fueron las descritas para el lenguado senegalés (Yufera y Darías 2007, 20 *Aquaculture* 267: 94-99). Una muestra de las cápsulas se dispensó en un vaso de precipitados con 4 mL de tampón glicina a pH 5 y 1 mL de extracto de estómago de lenguado. A tiempo 0, 60 y 120 minutos se tomaron 4 réplicas de 3 cápsulas/réplica. A cada réplica se le adicionaron 600 μ L de bicarbonato sódico 0,2 M y de ahí se tomaron 100 μ L para hacer diluciones seriadas y microtitular. Transcurridos los 120 minutos, se 25 recogieron todas las cápsulas y se pusieron en otro vaso de precipitados con 4 mL de tampón Tris-HCl a pH 9 y 1 mL de extracto de intestino de lenguado y con agitación continua. De igual forma, a 60, 120 y 180 minutos desde el inicio de la fase intestinal, se tomaron de nuevo 4 réplicas de 3 cápsulas/réplica, añadiendo 600 μ L de bicarbonato sódico 0,2 M. De ahí se tomaron 100 μ L para hacer diluciones seriadas y microtitular. A 30 los valores de pH 5 (simulación estomacal) y 9 (simulación intestinal), los habituales para lenguado senegalés, se mantuvieron viables prácticamente la totalidad de las bacterias incluidas en las cápsulas durante la simulación gastrointestinal (Figura 5).

Ejemplo 6: Incremento de la ingesta y detección de las células probióticas *Shewanella* PDP11 en el tracto intestinal de peces de acuicultura.

35 Para esta realización de la invención se preparó una mezcla a partes iguales de cuatro harinas de origen marino (harina de krill-harina de poliqueto-harina de mejillón-harina de pescado) y se tomaron 150 mg de la mezcla resultante, que fueron disueltos en 1,5 mL de alginato 2%, y seguidamente se añadieron 500 μ L de la solución madre de bacterias 40 según ya se ha descrito en el ejemplo de realización número 1. La mezcla así obtenida se goteó en una solución de CaCl_2 al 2% y las cápsulas se ofrecieron ejemplares juveniles de unos 35 gramos de tres especies de peces distintos y con interés en acuicultura (*Solea senegalensis*, *Sparus aurata* y *Oreochromis niloticus*). Las tres especies consumieron las cápsulas sin mostrar ningún tipo de rechazo, como evidenció la observación de los 45 mismos y su posterior disección. Tres peces de cada una de las especies fueron sacrificados y tras su disección se comprobó la presencia de cápsulas en su tracto digestivo en el 100% de los ejemplares analizados. Adicionalmente, en *O. niloticus* se

recuperaron las cápsulas del interior del tubo digestivo de 3 peces a las dos horas su ingesta (las cápsulas habían superado la fase estomacal y se encontraban en el tracto intestinal) y se cuantificó la supervivencia de las bacterias contenidas en éstas, contabilizándose una media de 10^7 UFC/cápsula.

5

En otro ensayo con lenguado senegalés, *S. senegalensis*, se aplicaron los siguientes tratamientos a tres lotes distintos de peces:

- 10 ▪ Tratamiento A. Se administró durante 7 días un alimento suplementado con el probiótico *Shewanella* PDP11 incorporado directamente al mismo, a razón 10^9 UFC/g de pienso, mediante pulverización según se describe en el documento GB 2 279 871 A1 ó en Sáenz de Rodríguez et al. 2009, *Aquaculture Nutrition* 15: 177-185.
- 15 ▪ Tratamiento B. Se administraron las cápsulas con *Shewanella* PDP11, conteniendo 10^8 UFC/cápsula, a los peces durante 7 días.
- Tratamiento C. Se administró un alimento control que no incluía células probióticas de *Shewanella* PDP11 durante 7 días.

20 A los 1, 4 y 7 días del inicio del ensayo se determinó el porcentaje de peces de cada tratamiento que presentaron células viables de *Shewanella* PDP11 en sus tractos intestinales (Figura 6).

25 En el intestino de los peces del Tratamiento A se pudieron cuantificar células viables de *Shewanella* PDP11 en el primer y cuarto día de ensayo en un 58 y 70 % de los peces, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron células probióticas viables en el intestino de los animales tras 7 días de administración de este alimento. Por el contrario, en los animales que recibieron el Tratamiento B (bacterias encapsuladas), se comprobó que el probiótico se encontraba presente en el intestino de los peces a los 7 días (100% de los peces). En el los días 1 y 4, el 85 % de los animales presentaron células viables del

30 probiótico en sus intestinos. Además, para el Tratamiento B, se comprobó que las bacterias probióticas permanecían en el intestino de los peces hasta seis días después de haber suspendido la administración de las bacterias encapsuladas. En el caso del Tratamiento C, utilizado como control negativo, no se detectaron células probióticas en el

35

Se comprobó que la administración durante una semana de las cápsulas de alginato que incluyen células de *Shewanella* PDP11 y atrayentes permite aislar dichas bacterias en el intestino en el 100% de los peces. En este caso, también se comprobó que una vez que las cápsulas dejan de administrarse a los peces, el tiempo de permanencia de las células

40 probióticas en el digestivo del animal es, como mínimo, de 4 a 6 días.

Por el contrario, cuando el probiótico se incorpora directamente al alimento mediante pulverización, éste no se detecta en ninguno de los peces más allá del cuarto día.

45 Los resultados obtenidos en el ejemplo de realización confirman que la invención que se presenta también permite vehicular bacterias *Shewanella* PDP11 viables hasta tramos posteriores del tubo digestivo de los peces.

TABLA 1

5 Formulación de un pienso empleado para la elaboración del preparado de *Shewanella* PDP11 para su posterior administración a ejemplares juveniles de peces marinos de un peso corporal medio comprendido entre de 10 y 30 gramos (gramos de ingrediente por 100 gramos de pienso seco).

10	Harina pescado LT	64
	Aceite pescado	2,9
	Lecitina de soja	2,0
	Harina de trigo	12
	Maltodextrina	8,1
	Celulosa	4,2
15	Cloruro de colina	0,8
	Premezcla de vitaminas y minerales	5
	Goma guar	1

20

TABLA 2

Evolución temporal de la viabilidad-supervivencia de las células de *Shewanella* PDP11 incorporadas al pienso como células libres o como células microencapsuladas.

	Recuento de células viables				
	Suspensión madre (UFC/mL)	Pienso (UFC/g pienso)			
Tiempo tras elaboración (h)	-	0	3	6	24
Células libres en el pienso	$2,1 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	4×10^4	0
Microcápsulas en el pienso	$3,7 \times 10^9$	$2,9 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	0

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparado de bacterias probióticas para peces de acuicultura u ornamentales, preferentemente peces marinos, compuesto por células viables de la cepa *Shewanella* PDP11, depositada en la Colección Española de Cultivos tipo con referencia CECT 7627.
- 10 2. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 depositada en la Colección Española de Cultivos tipo, con referencia CECT 7627, obtenido por un procedimiento que comprende la preparación de una solución gelificante que contiene las bacterias probióticas a encapsular, y la extrusión, pulverización o goteo de dicha solución gelificante sobre una solución gelificadora para formar cápsulas.
- 15 3. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior caracterizado porque la solución gelificante comprende la mezcla de bacterias probióticas viables con un volumen adecuado de alginato.
- 20 4. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior, caracterizado porque el alginato comprendido en la solución gelificante es alginato sódico.
- 25 5. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior, caracterizado porque el alginato comprendido en la solución gelificante es alginato sódico en el rango 0,5-4% peso/volumen.
- 30 6. Preparado según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque además de bacterias probióticas *Shewanella* PDP11 y alginato, la solución gelificante comprende uno o varios ingredientes atrayentes autorizados para alimentación animal.
- 35 7. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior, caracterizado porque el o los ingredientes atrayentes están en la solución gelificante en una proporción 1:4 peso/volumen.
- 40 8. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque el o los ingredientes atrayentes se seleccionan entre los siguientes:
 - 40 a Ingredientes de naturaleza proteica y de origen marino con un contenido final de entre 40 y 80% de proteína cruda,
 - b Piensos cuya formulación comprende los ingredientes referidos en (a) y con un contenido final de entre 40 y 60% de proteína cruda y de entre 10 y 18% de lípidos totales,
 - 45 c Piensos comerciales aptos para su uso en acuicultura con un contenido final de entre 40 y 60% de proteína cruda y de entre 10 y 18% de lípidos totales; y/o

d Colorantes alimentarios aptos para alimentación de peces.

- 5 9. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, obtenido por un procedimiento que comprende la reacción de alginato con una solución gelificadora que contiene sales de calcio mediante un proceso de polimerización iónica que determina la formación de un hidrogel que contiene las células de *Shewanella* PDP11 y, en su caso, los ingredientes atrayentes.
- 10 10. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior caracterizado porque la solución gelificante, además de alginato, incluye quitosano o gelatina o una mezcla de ambos en proporciones variables.
- 15 11. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 caracterizado porque la solución gelificadora comprende una solución de cloruro cálcico.
- 20 12. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior caracterizado porque la solución gelificadora comprende cloruro cálcico al 0,5-3% peso/volumen.
- 25 13. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, caracterizado porque la solución gelificadora, además de cloruro cálcico, comprende quitosano en una concentración en el rango 0,1-1% peso/volumen.
- 30 14. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, caracterizado porque está formado por cápsulas esféricas de 0,5 a 7 mm de diámetro solidificadas, aisladas, de contenido homogéneo y estables en soluciones acuosas.
- 35 15. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación anterior, caracterizado porque mantiene viables al 100% de las células *Shewanella* PDP11 conservadas a 4°C durante periodos de almacenamiento de al menos 30 días, y al 80% de las mismas cuando se almacenan a temperatura ambiente (22°C) durante el mismo periodo de tiempo.
- 40 16. Preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, caracterizado porque permite la administración oral a peces de acuicultura y ornamentales de dosis de, al menos, 100 millones de células viables del probiótico *Shewanella* PDP11 por cápsula, sin necesidad de incluir a las bacterias en el alimento. Este valor de referencia cumple con lo establecido en el Reglamento (CE) nº 2148/2004 de la Comisión de 16 de diciembre de 2004.
- 45

17. Uso de un preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según la reivindicación 16 en la alimentación de peces de acuicultura u ornamentales, preferentemente peces marinos.
- 5 18. Uso de un preparado de bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17 caracterizado porque se administra separado del alimento.

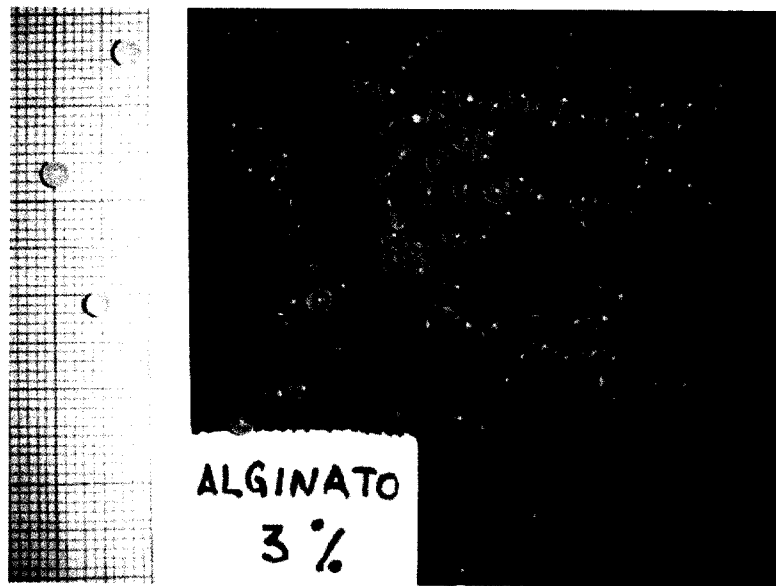


Figura 1

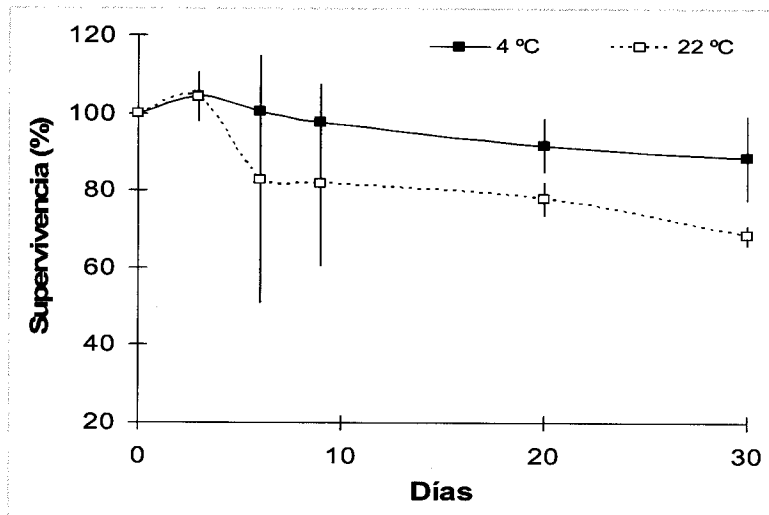


Figura 2

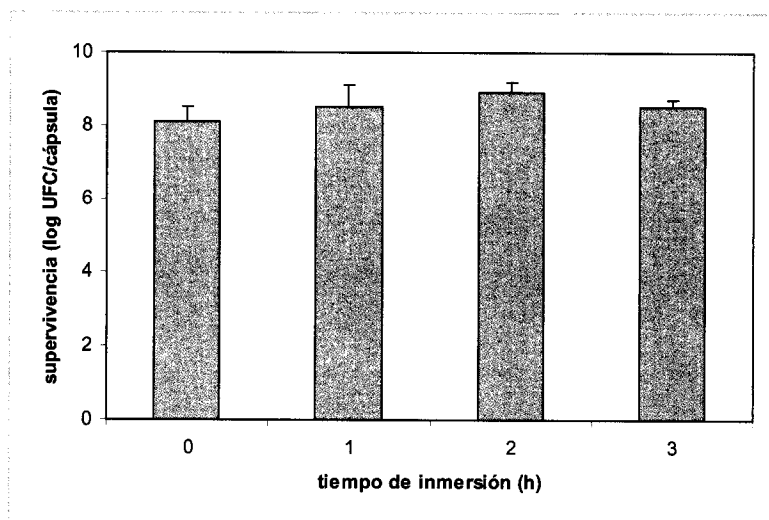


Figura 3

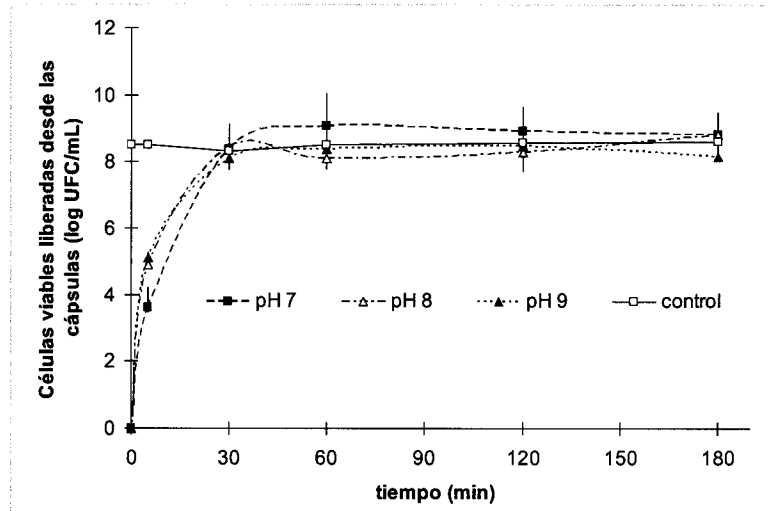


Figura 4

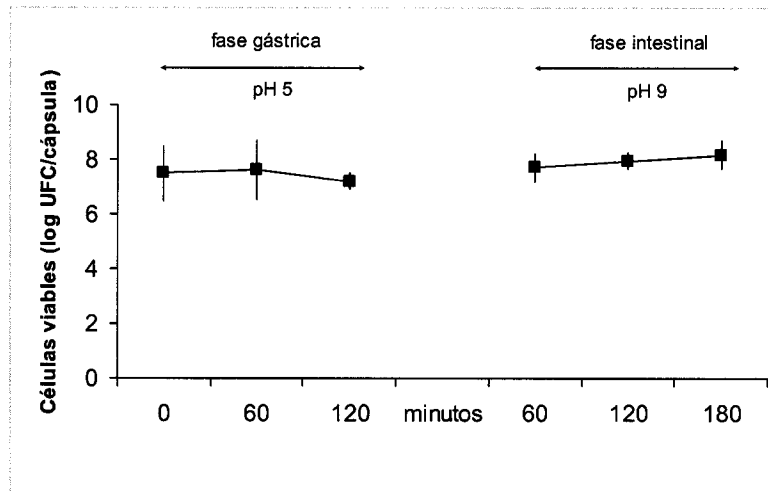


Figura 5

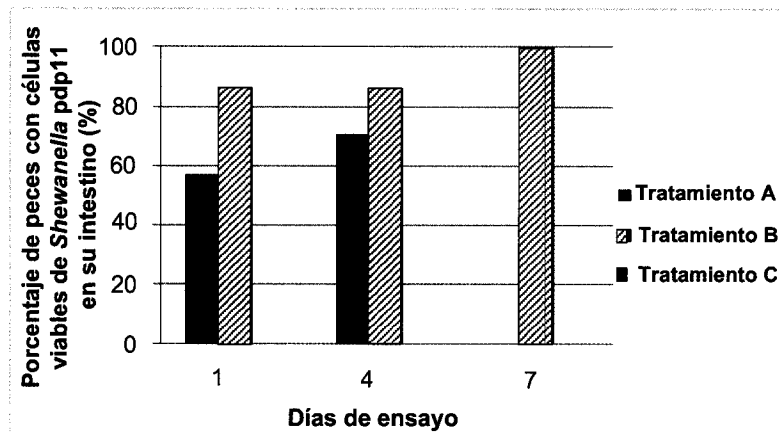


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100469

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.04.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ALARCÓN F.J. et al. Encapsulation of a potential fish probiotic bacteria in Ca-alginate beads. XVIII International Conference on Bioencapsulation. Porto Portugal. 01/10/2010. P-115. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 10/05/2012] http://impascience.eu/bioencapsulation/340_contribution_texts/2010-10-01_P-115.pdf?PHPSESSID=9ae917c5d25114d8dd4a81ebfddac16 .	1-5, 9-17
Y		6-8,18
Y	US 2006127453 A1 (HAREL) 15/06/2006, párrafos 36,38, 47, 63-68; ejemplo 6	6-8,18
Y	US 2004219268 A1 (HOGOY) 04/11/2004, párrafos 26,32, 39-43, 114	6,8,18
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, páginas 177-185.	1
A	US 5698246 A (VILLAMAR) 16.12.1997, column 4, línea 60-column 5, línea 6.	10
A	KRASAEKOOPT, W. et al. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria. International Dairy Journal, 2004, vol. 14, páginas 737-743.	13

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
10.05.2012

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23K1/18 (2006.01)

A61K39/02 (2006.01)

A61K9/50 (2006.01)

A01K61/00 (2006.01)

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

A23K, A61K, A01K

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, OCEAN, AQUASCI, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6-8, 10, 13, 18	SI
	Reivindicaciones 1-5, 9, 11, 12, 14-17	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	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	ALARCÓN F.J. et al.	2010
D02	SÁENZ DE RODRIGÁNEZ et al.	2009
D03	US 2006127453 A1	15.06.2006
D04	US 2004219268 A1	04.11.2004
D05	US 5698246 A1	16.12.1997
D06	KRASAEKOOPT, W. et al.	2004

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 se refiere a un preparado para peces compuesto de células viables de la bacteria probiótica *Shewanella* PDP11 (reivindicación independiente 1)

La reivindicación independiente 2 se refiere a unas cápsulas que contienen bacterias probióticas de la cepa *Shewanella* PDP11 obtenidas por un procedimiento que comprende la extrusión, pulverización o goteo de una solución gelificante que contenga las bacterias sobre una solución gelificadora.

Las reivindicaciones dependientes 3 a 16 dan detalles sobre la solución gelificante, la solución gelificadora, y las cápsulas obtenidas.

También es objeto de la invención el uso de las cápsulas para la alimentación de peces y su uso separado del alimento (reivindicaciones 17 y 18)

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

El documento D1 describe unas cápsulas que contienen la cepa probiótica *Shewanella* PDP11 y que han sido obtenidas por el procedimiento de hacer gotear una solución gelificante que contiene las bacterias y alginato al 2% sobre una solución gelificadora de CaCl₂ al 2%. Estas cápsulas, de aproximadamente 3,7 mm, son estables en agua marina y protegen a las bacterias probióticas en condiciones similares a las del sistema digestivo de los peces, por lo que se sugiere su uso en acuicultura.

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1-5, 9, 11, 12, 14-17.

El documento D2 utiliza como alimento unos pellets impregnados de la bacteria probiótica *Shewanella* PDP11 liofilizada, es decir un preparado como el que se reivindica en 1.

En resumen, las reivindicaciones 1-5, 9, 11, 12, 14-17 carecen de novedad. Las reivindicaciones 6-8 y 10, 13 y 18 contienen características que no han sido divulgadas en ningún documento de los citados en el informe, por lo que cumplen el requisito de novedad.

Sin embargo, se considera que dichas reivindicaciones dependientes no aportan características que, en combinación de las que dependen, les otorguen actividad inventiva.

La reivindicaciones dependientes 6-8 se refieren a la posibilidad de que la cápsula contenga atrayentes.

La diferencia de esta reivindicación con el documento D1 es que en este no se describen atrayentes en la cápsula. El efecto técnico que produce añadir atrayentes a la cápsula es que favorece la ingesta voluntaria de las microcápsulas, y permite, por ello ofrecerlas a los peces independientemente del alimento.

El problema técnico que trataría de resolver la solicitud de patente es intentar que los peces ingirieran las microcápsulas voluntariamente. La solución propuesta por el solicitante de añadir atrayentes, ha sido utilizada en varios documentos con el mismo objetivo.

Por ejemplo, el documento D3 describe unas cápsulas que además de probióticos incluyen sustancias atrayentes con objeto de que los animales acuáticos las coman con mayor rapidez. Las sustancias atrayentes pueden ser aminoácidos, harinas de origen marino o hidrolizados de las mismas, y se añaden a una mezcla de alginato u otro hidrocoloide junto con almidón y agua. Esta mezcla se hace gotear sobre cloruro cálcico para que se lleve a cabo la gelación (párrafos 36, 38, 47, 63-68; ejemplo 6).

El documento D4 divulga un procedimiento de encapsulación de alimento para animales acuáticos que puede contener colorantes como sustancias atrayentes para los peces. También los nutrientes pueden actuar como sustancias atrayentes cuando se van liberando en el agua. Las cápsulas miden de 0,1 a 5 mm y se obtienen mezclando el líquido que contiene los nutrientes con un prepolímero como alginato o quitosano y goteando la composición sobre un medio polimerizante (párrafos 32, 39-43, 114). Las cápsulas pueden contener microorganismos (párrafo 26).

Por lo tanto, teniendo en cuenta, la combinación de enseñanzas del documento D1 con D3 o D4, resultaría obvio para un experto en la materia que quisiera hacer atractiva para los peces cualquier microcápsula añadir sustancias atrayentes (colorantes, harinas, etc.) a las mismas, por lo que se considera que las reivindicaciones 6 a 8 carecen de actividad inventiva.

En cuanto a las reivindicaciones 10 y 13 se refiere a la inclusión de otros compuestos en la cápsula como son el quitosano o la gelatina.

Estos compuestos han sido utilizados previamente junto con el alginato en la confección de microcápsulas (ver documentos D5, columna 4, línea 60-columna 5, línea 6 y D6, introducción) por lo que, en ausencia de un efecto técnico sorprendente asociado a su utilización, su uso se considera una mera alternativa obvia para un experto en la materia, y por tanto sin actividad inventiva.