

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 973**

21 Número de solicitud: 201031790

51 Int. Cl.:

**A01K 67/033** (2006.01)

**A01K 61/00** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**02.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.06.2012**

Fecha de la concesión:

**26.04.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**10.05.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (100.0%)  
CTRA. DE UTRERA, KM. 1, EDIFICIO FRANCISCO  
DE MIRANDA Nº 9  
41013 SEVILLA (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ RUIZ, Manuel Jesús;  
GUERRERO GÓMEZ, David y  
PORTA PELAYO, Javier**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO DE NEMATODOS CON ÁCIDOS GRASOS.**

57 Resumen:

La invención se relaciona con un método para el enriquecimiento de nematodos con ácidos grasos para su uso en acuicultura. Asimismo, la invención se relaciona con un método que consiste en alimentar a los nematodos con una bacteria productora de ácidos grasos y en un método para alimentar peces, moluscos o crustáceos con dichos nematodos.

ES 2 383 973 B1

## **DESCRIPCIÓN**

### **MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO DE NEMATODOS CON ÁCIDOS GRASOS**

#### **CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La invención se relaciona con un método para el enriquecimiento de nematodos con ácidos grasos para su uso en acuicultura. Dicho método consiste en alimentar a los nematodos con una bacteria productora de dichos ácidos grasos y posteriormente, alimentar a peces, moluscos o crustáceos con dichos nematodos.

#### 10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- Los ácidos grasos, constituyentes de los triacilgliceroles, son necesarios para todos los seres vivos, pues no sólo son una fuente de energía, sino que además son fundamentales para el crecimiento, desarrollo y reproducción. Aquellos ácidos grasos que contienen
- 15 dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poli-insaturados (del inglés, PUFA). Los PUFAs son constituyentes de las membranas celulares y forman parte de los sistemas de señalización celular. Su deficiencia puede afectar negativamente la función celular y eventualmente puede conducir a la muerte. En particular, el PUFA de cadena larga de la serie omega 3 ( $\omega 3$ ), ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega 3$ , EPA), ha
- 20 sido objeto de diversas investigaciones debido a sus efectos beneficiosos observados en los lípidos plasmáticos de personas con cardiomiopatías coronarias, en el cáncer y en la artritis reumatoide. Desde el punto de vista fisiológico, una de las funciones más importantes de los PUFAs es la de ser precursores de los eicosanoides, compuestos de veinte átomos de carbono (C20). Los eicosanoides corresponden a prostaglandinas,
- 25 prostaciclina y leucotrienos (Simopoulos, 1991. J. Clin. Nutr. 54: 438-63). Los eicosanoides derivados de los PUFAs omega 6 ( $\omega 6$ ) tienen propiedades fisiológicas diferentes a aquellos que se originan de los PUFAs  $\omega 3$ . Las prostaglandinas se sintetizan por medio de la oxidación de los ácidos  $\gamma$ -linolénico (C18:3 $\omega 6$ , GLA), araquidónico (C20:4 $\omega 6$ , ArA) y EPA, los cuales regulan funciones secretoras, digestivas,
- 30 reproductivas, procesos inmunológicos y de circulación sanguínea.

Distintas investigaciones han demostrado también la esencialidad de los PUFAs  $\omega 3$ , en especial de ArA, EPA y ácido docosahexaenoico (C22:6 $\omega 3$ , DHA), en la formulación

de alimentos empleados en acuicultura (peces y larvas de crustáceos). Normalmente, la dieta para el cultivo de muchas especies marinas requiere alrededor del 1 al 2% de PUFAs de cadena larga (Rees *et al.*, 1994. *Aquaculture* 122, 193–207). Actualmente, los aceites de pescado son la principal fuente de PUFAs del tipo  $\omega 3$ , como el EPA y el DHA. Sin embargo, existen algunos problemas al obtener el alimento para peces de los propios peces, como la dificultad de obtener productos muy puros y el olor desagradable, así como la baja sostenibilidad ecológica. Se estima que en los próximos años la demanda de PUFA  $\omega 3$  aumentará debido al crecimiento de la industria acuícola y al incremento en la demanda de PUFAs específicos para la elaboración de suplementos alimenticios para humanos y animales. Fuentes alternativas para la producción de PUFAs  $\omega 3$  son bacterias, hongos y microalgas.

La síntesis de ácidos grasos poli-insaturados  $\omega 3$  por bacterias depende no sólo del microorganismo sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrollan dichas bacterias. No obstante, la producción bajo condiciones de crecimiento controladas permite obtener productos consistentes y reproducibles. La producción de PUFAs a través de bacterias es atractiva ya que algunas especies sintetizan sólo un ácido graso, a diferencia de la compleja mezcla de ácidos grasos producida por microalgas o acumulada en los peces (Russell *et al.* 1999; *Microbiology*; 145: 767-79). Las bacterias marinas productoras de ácidos grasos poli-insaturados, en particular EPA y DHA, pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia* y *Moritella* (Russell, N. J. & Nichols, D. S. (1999). *Microbiology* 145, 767–779). Estas especies marinas se encuentran en ambientes donde prevalecen altas presiones y bajas temperaturas.

En la mayoría de las especies acuícolas cultivadas, en sus primeros estadios de desarrollo (estadio larvario), la alimentación requiere principalmente tres características: que dicha alimentación presente organismos que estén vivos para que resulten atractivos a la larva, que presenten pequeño tamaño (alrededor de 1 mm) y que sean ricos en PUFAs. El zooplancton marino, que es el alimento natural de estas especies, es difícil de cultivar y el sustituto que se ha encontrado más efectivo para el cultivo larvario es un crustáceo conocido como *Artemia* que se captura en grandes lagos salados, principalmente en el lago salado de Utah. La demanda que se produce de *Artemia* a

nivel internacional es enorme, por lo tanto su disponibilidad fluctúa enormemente, así como su precio, que es habitualmente elevado. La *Artemia* no produce DHA, uno de los PUFAs esenciales, pero existen protocolos para enriquecerlas en este ácido graso, por ejemplo, en WO0150880 se describe un método para enriquecer con DHA *Artemia* y rotíferos, cultivando dichos organismos en un medio que comprende DHA. Aunque se han desarrollado algunos protocolos para enriquecer *Artemia* en varios compuestos, al ser un organismo que no se cultiva presenta muy poca plasticidad para modificar su composición nutricional o servir de vector para compuestos importantes en el cultivo de larvas de peces. Los nematodos, en contraste, sí son cultivables y además contienen de forma natural altas concentraciones de ArA y EPA, aunque no de DHA, por lo que son buenos candidatos para su uso en acuicultura.

Una vez superado el estadio larvario, en el proceso de engorde, la alimentación de los organismos de interés en acuicultura se realiza mediante piensos basados en harinas de pescado que provienen de la actividad pesquera, por lo que la actividad de la acuicultura no es sostenible desde el punto de vista medioambiental, ya que finalmente se basa en la pesca extractiva. El principal problema para desarrollar piensos provenientes de otras fuentes es la necesidad que tienen los peces de alimentarse con dietas ricas en PUFAs, los cuales son producidos principalmente por organismos marinos como algas, fitoplancton y otros microorganismos, que aunque se puedan cultivar, son difíciles de incorporar a la dieta de la mayoría de los peces de interés en acuicultura, ya que éstos son carnívoros.

Se han descrito en el estado de la técnica métodos para enriquecer nematodos con ácidos grasos, por ejemplo en el documento WO03001909, en donde se describe un proceso para preservar y almacenar nematodos que presentan un valor alimentario aumentado para su uso en acuicultura. En concreto, los nematodos se enriquecen añadiendo a liposomas, entre otros aditivos, DHA. El inconveniente que presenta el uso de liposomas que incluyen DHA para enriquecer nematodos reside en que los liposomas tienen que presentar un tamaño adecuado para que puedan ser ingeridos por el nematodo y resulta un procedimiento complicado y caro de poner en práctica. Asimismo, la cantidad de DHA que se tiene que incluir en el liposoma debe ser bastante

alta para que el nematodo incorpore una cantidad suficiente que posteriormente pueda ser utilizada para la alimentación de peces.

Asimismo, se han desarrollado otros métodos para enriquecer organismos con DHA, tal como algas, hongos y plantas y se han incluido como alimentos para peces (WO04080196). También se han generado bacterias recombinantes para la producción de DHA, clonando un gen de *Moritella marina* en *E. coli* (Orikasa, Y *et al.* Biotechnol. Lett. 28: 1841-47).

A pesar de que se han descrito en el estado de la técnica nematodos enriquecidos con ácidos grasos poli-insaturados, en concreto con DHA, existe la necesidad de encontrar un método sencillo de obtener nematodos enriquecidos con ácidos grasos poli-insaturados que no provengan de la pesca extractiva, que presente un alto rendimiento y en donde los nematodos sirvan como alimento en acuicultura, tanto para animales adultos como para animales en estadio larval.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han observado que los nematodos alimentados con bacterias productoras de al menos un ácido graso, en concreto de un ácido graso poli-insaturado, son capaces de incorporar dichos ácido graso. De esta manera, han obtenido nematodos enriquecidos con ácidos grasos, útiles por ejemplo en acuicultura.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso que comprende cultivar dicho nematodo con una bacteria productora de dicho ácido graso.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método de alimentación de un animal seleccionado del grupo formado por un pez, un molusco y un crustáceo, que comprende alimentar dicho animal con un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han observado que los nematodos alimentados con bacterias productoras de ácidos grasos, en concreto de ácidos grasos poli-insaturados, son capaces de incorporar dichos ácidos grasos. De esta manera, han obtenido  
5 nematodos enriquecidos con ácidos grasos, útiles por ejemplo en acuicultura, para alimentar larvas de peces, crustáceos o moluscos o para ser usados para formar parte de piensos para engorde de peces adultos. Los ensayos llevados a cabo por los inventores han puesto de manifiesto que la cantidad de DHA incorporada en los nematodos, con respecto al total de ácidos grasos, es similar a la cantidad disponible en el zooplancton,  
10 tal como se puede ver en el Ejemplo 2.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso (en adelante primer método de la invención) que comprende cultivar dicho nematodo con una bacteria productora de  
15 dicho ácido graso.

La utilización del primer método de la invención para enriquecer nematodos con ácidos grasos, a diferencia de los otros métodos descritos en el estado de la técnica, presenta las siguientes ventajas:

- 20 1) Es muy sencillo, ya que no necesita de tratamiento previo, como es necesario en la extracción de lípidos o la fabricación de liposomas.
- 2) El hecho de que estas bacterias se puedan cultivar supone que los nematodos enriquecidos de esta manera sean piensos sostenibles desde el punto de vista medioambiental, ya que evita la utilización de productos provenientes de la  
25 pesca extractiva.
- 3) Los medios de cultivo de estas bacterias pueden ser derivados de subproductos de la industria alimentaria de forma que su producción sea más rentable frente a *Artemia* u otros métodos de cultivo de nematodos y más sostenible desde el punto de vista económico y medioambiental.
- 30 4) Las bacterias pueden ser modificadas genéticamente o sus condiciones de cultivo para un mayor rendimiento en la producción de ácidos grasos.
- 5) Los nematodos cultivados, sobre todo los de la especie *Caenorhabditis elegans*, a diferencia de la *Artemia*, presentan una enorme plasticidad. En la actualidad

5 existen disponibles más de 3000 cepas distintas y múltiples protocolos para su cultivo y modificación genética, por lo que se puede utilizar el nematodo deseado, según su composición en proteínas, grasas u otras características que faciliten la incorporación y acumulación en el nematodo de los productos que se deseen.

Con el fin de que se incorpore una molécula de un ácido graso en los gránulos de grasa que presentan los nematodos, ésta debe competir con los ácidos grasos de la propia síntesis del nematodo y con la mezcla de ácidos grasos presentes en la dieta. Por tanto,  
10 las expectativas de que cuando se alimenta un nematodo con un microorganismo productor de un ácido graso, el nematodo incorpore dicho ácido graso a unos niveles suficientes para considerar el nematodo apto para su utilización en acuicultura (3% del total de ácidos grasos), son bastante bajas. En el caso de *M. marina* los niveles de DHA son de alrededor del 10% del total de ácidos grasos presentes en la bacteria (uno de los  
15 microorganismos con mayor nivel de este ácido graso), a su vez el total de ácidos grasos de una bacteria es aproximadamente el 10% del total de la biomasa de una bacteria. Lo que indica que en una bacteria la cantidad total de DHA es del 1% del total de biomasa bacteriana, lo que hace muy poco probable que un nematodo que ingiera esta bacteria se enriquezca en este ácido graso. Sin embargo, los inventores han conseguido enriquecer  
20 nematodos con ácidos grasos llegando a cantidades de DHA de alrededor de 3% del total de ácidos grasos.

El término “nematodo”, tal como se usa en la presente invención, incluye cualquier nematodo. Aunque el primer método de la invención se puede utilizar para enriquecer  
25 cualquier nematodo existente, preferiblemente se utilizará para enriquecer nematodos pertenecientes a especies de vida libre no parásitos y adecuados para acuicultura. Ejemplos de nematodos que se pueden utilizar para poner en práctica el primer método de la invención incluyen, aunque no se limitan a, organismos de las familias *Rhabditidae* y *Panagrolaimidae*. Más preferiblemente nematodos de los géneros  
30 *Panagrellus* y *Caenorhabditis*. Aún más preferiblemente, la especie se selecciona entre *Caenorhabditis elegans* y *Panagrellus redivivus*.

El cultivo del nematodo se realiza siguiendo métodos convencionales descritos en el estado de la técnica, tal como el protocolo que se describe en Eisenmann, D. M. (Wnt signaling 2005, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community), en el que se incubaba el nematodo durante una semana en el medio indicado en dicho protocolo, se subcultiva posteriormente 1/10 de dicho cultivo en un medio cuya concentración salina es aproximadamente de 0,2 M, preferiblemente de NaCl. Se incubaba nuevamente el cultivo durante una semana y se subcultiva 1/10 el cultivo en un medio cuya concentración salina es aproximadamente de 0,4 M, preferiblemente de NaCl. Con este proceso no sólo se consigue cultivar el nematodo, sino que también se consigue adaptar a estos organismos, que son originalmente terrestres, a vivir en medio líquido en concentraciones salinas similares a las de agua de mar, permitiendo su supervivencia en agua marina. La concentración salina necesaria en el medio es variable según el uso que se vaya a dar a los nematodos, si el destino va a ser alimentar animales de agua dulce no es conveniente aumentar el contenido de sal del protocolo original.

El término “nematodo enriquecido con al menos un ácido graso” se refiere a un nematodo que presenta niveles de al menos un ácido graso superiores a los de un nematodo convencional. Dicho ácido graso es proporcionado al nematodo a través de la dieta o del medio, de manera que se aumentan los niveles del ácido graso en el nematodo. Algunas especies de nematodos, tal como el nematodo *P. redivivus* carecen de ácido eicosapentaenoico (EPA) y tampoco contienen niveles altos de ácido docosahexaenoico (DHA). Otros nematodos, tal como *C. elegans*, contienen de forma natural altas concentraciones de ArA y EPA, pero no de otros ácidos grasos, como DHA. Un enriquecimiento con al menos un ácido graso indica un aumento de dicho ácido graso con respecto a los niveles que presenta el nematodo de manera natural. Dicho enriquecimiento o aumento puede ser de al menos un 1%, un 2%, un 3%, un 4%, un 5%, un 6%, un 7%, un 8%, un 9%, un 10% o incluso mayor del 10%, dependiendo de las aplicaciones para las que se vaya a utilizar dicho nematodo, con respecto al nematodo no crecido en presencia de la bacteria productora de ácidos grasos. En una realización particular, dicho ácido graso se selecciona del grupo de ácido mirístico (C14:1), ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA), ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3, EPA), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6), ácido dihomo-gama-linolénico (C20:3 $\omega$ 6, DGLA) y ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ 6). En

una realización aún más preferida, el nematodo se encuentra enriquecido con al menos ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA). Preferiblemente, tras llevar a cabo el primer método de la invención, el nematodo se encuentra enriquecido con al menos un ácido graso. En una realización particular, el enriquecimiento de al menos un ácido graso  
 5 corresponde a un porcentaje de DHA de entre un 1% y un 5% del total de ácidos grasos, de ácido mirístico entre un 0,5% y un 3% del total de ácidos grasos, de ácido eicosapentaenoico entre un 1% y un 20% del total de ácidos grasos, de ácido palmítico entre un 1% y un 5% del total de ácidos grasos, de ácido oleico entre un 1% y un 5% del total de ácidos grasos, de ácido linoleico entre un 1% y un 10% del total de ácidos  
 10 grasos, de ácido dihomo-gama-linolénico entre un 1% y un 10% del total de ácidos grasos y de ácido araquidónico entre un 1% y un 5% del total de ácidos grasos.

Métodos adecuados para saber si se ha enriquecido el nematodo con un ácido graso determinado son ampliamente conocidos por el experto en la materia. Existen varios  
 15 métodos a partir de los cuales se puede conocer si los nematodos se han enriquecido con un ácido graso y la proporción del ácido graso obtenida con respecto al total de los ácidos grasos. Dichos métodos incluyen, sin limitación, métodos cromatográficos, métodos de titulación química (mediante titulación por ejemplo con KOH o NaOH o siguiendo el método descrito en Dole VP *et al.*, J Clin Invest 1956, 35, 150 o bien el  
 20 método descrito en Ke PJ *et al.*, Anal Chim Acta 1978, 99, 387), métodos de titulación termométrica (tal como el descrito en Smith TK, J Am Oil Chem Soc 2003, 80, 21-24), medición de complejos metal-ácido graso (método descrito en Ho RJ *et al.*, Anal Biochem 1969, 31, 426-436, para complejos con cobalto), métodos enzimáticos (descrito por ejemplo en Jebens E *et al.* Scand J Clin Lab Invest 1992, 52, 717),  
 25 métodos que utilizan una proteína de unión a ácidos grasos (tal como los descritos en Spector AA *et al.*, Biochemistry 1971, 10, 3229, Richieri GV *et al.* Biochemistry 1993, 32, 7574 y Richieri GV *et al.*, J Lipid Res 1995, 36, 229) y métodos espectroscópicos (Yoshida S, Lipid Technol 2008, 20, 184 y Wu D *et al.*, Anal Chim cta 2009, 634, 166). El experto en la materia utilizará el método más conveniente para determinar la cantidad  
 30 de ácidos grasos generados en el nematodo.

En una realización particular, con el fin de conocer si el nematodo se ha enriquecido en ácidos grasos, se procede a recoger el cultivo de nematodos, centrifugándolo y

- obteniéndose un pellet, en el que se determina la concentración de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases. Para ello, se sigue el método de Bligh & Dyer (Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917 (1959)), tal como el descrito en el Ejemplo 2. Finalmente, se comparan los niveles de ácido graso en el cultivo de nematodos crecidos
- 5 en presencia de bacterias productoras de ácidos grasos con respecto a los niveles de ácido graso de nematodos que han sido cultivados en presencia de bacterias no productoras de los ácidos grasos de interés, llegando a determinar si el nematodo se ha enriquecido en al menos un ácido graso.
- 10 El término “bacteria productora de al menos un ácido graso” se refiere a una bacteria que durante su crecimiento es capaz de generar al menos un ácido graso. La producción de ácidos grasos puede producirse de manera natural a partir de su metabolismo, sin estar modificada dicha bacteria, o bien puede tratarse de una bacteria modificada genéticamente para producir ácidos grasos. En una realización particular, la bacteria
- 15 produce al menos un ácido graso. En una realización particular, dicho ácido graso se selecciona del grupo de ácido mirístico (C14:1), ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA), ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3, EPA), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6), ácido dihomo-gama-linolénico (C20:3 $\omega$ 6, DGLA) y ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ 6). En una realización preferida, la bacteria
- 20 productora de al menos un ácido graso produce al menos ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA). En una realización preferida, la bacteria productora de al menos un ácido graso es una bacteria marina o un mutante funcionalmente equivalente. Dicha bacteria marina puede presentar alguna mutación en su genoma siempre y cuando se mantenga su capacidad de producir ácidos grasos. Ejemplos de bacterias no modificadas
- 25 genéticamente que producen ácidos grasos de manera natural, en particular ácidos grasos poli-insaturados y más en particular, DHA, incluyen, sin limitación, bacterias marinas de los géneros *Moritella*, *Shewanella*, *Pseudoalteromonas* y *Colwellia*. Preferiblemente, la bacteria productora de al menos un ácido graso es *Moritella marina*, en la que el nivel de DHA es aproximadamente un 10% del total de los ácidos grasos de
- 30 la célula.

El género *Moritella*, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un miembro de la relativamente nueva familia *Moritellaceae* (Ivanova *et al.* 2004;

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1773-88),  
previamente un género del orden *Alteromonadales*, que cubría otras bacterias Gram-  
negativas marinas heterotróficas de varios géneros dentro de la clase  
*Gammaproteobacteria*. Estos géneros incluían *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*,  
5 *Shewanella*, *Colwellia*, *Psychromonas*, *Glacicola* y otros. Basándose en el análisis de  
secuencia del gen del rARN 16S, Ivanova *et al.* propusieron formar nuevas familias con  
estos géneros, ya que se separaban en diferentes grupos en el árbol filogenético. Esto  
dio como resultado nuevas familias que incluían *Moritellaceae*, *Alteromonadaceae*,  
*Pseudoalteromonadaceae*, *Shewanellaceae* y otras (Ivanova *et al.* 2004, *ad supra*). La  
10 especie *Moritella marina* fue la primera que se describió del género *Moritella*, y hasta el  
momento se han identificado otras seis especies pertenecientes al mismo género: *M.*  
*japonica*, *M. yayanosii*, *M. viscosa*, *M. profunda*, *M. abyssi* y *M. dasanensis*.

El género *Shewanella*, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al único  
15 género incluido en la familia de bacterias marinas *Shewanellaceae* (MacDonell &  
Colwell 1985. Syst Appl Bacteriol 6: 171-182). Actualmente dicho género comprende  
más de veinte especies. Todas ellas son Gram-negativas, anaerobias y aerobias  
facultativas asociadas principalmente con hábitats acuáticos. Asimismo, son capaces de  
producir altas proporciones de ácidos grasos poli-insaturados (Myers *et al.* 1988.  
20 Science 240: 1319-1321).

El género *Pseudoalteromonas*, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a  
un género de bacterias gram negativas marinas que comprende más de treinta especies.  
Se trata de bacterias aerobias o anaerobias facultativas que son capaces de producir  
25 ácidos grasos poli-insaturados.

El género *Colwellia*, tal como se utiliza en la presente invención, incluía originalmente  
dos bacterias anaerobias facultativas, *Colwellia psychrerythraea* y *C. hadaliensis*  
(Deming *et al.* 1998. Syst. Appl. Microbiol. 10: 152-60). Posteriormente, Bowman y  
30 col. (Int. J. Syst. Bacteriol. 1998; 48: 1171-80) describieron cuatro nuevas especies  
psicrofílicas de este género, *C. demingiae*, *C. hornerae*, *C. rossensis* and *C.*  
*psychrotropica*, y nuevas cepas de *C. psychrerythraea*. Ninguno de estos aislados

antárticos son barofílicos y todos ellos sintetizan ácido docosahexanoico en cantidades de hasta un 8 % del contenido total celular de ácidos grasos.

En una realización particular, la bacteria productora del ácido graso es una bacteria  
 5 recombinante modificada genéticamente que no produce dicho ácido graso de manera natural. Tal como se usa en la presente invención, la expresión “bacteria recombinante” se refiere a cualquier bacteria que se ha modificado genéticamente mediante la introducción de ADN heterólogo, de manera que dichas secuencias de ácido nucleico heterólogas permiten que la bacteria sea capaz de generar al menos un ácido graso,  
 10 preferiblemente un ácido graso poli-insaturado y más preferiblemente DHA. Bacterias recombinantes productoras de al menos un ácido graso poli-insaturado serían aquellas en las que se introduce el gen deseado o un vector que contenga el gen deseado, mediante técnicas recombinantes convencionales (Sambrook *et al.*, 2001. “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.,  
 15 Vol. 1-3). Se conoce que los ácidos grasos poli-insaturados EPA, ArA y DHA pueden ser generados de diferentes maneras. Por ejemplo, pueden ser producidos por bacterias marinas a partir de la ruta del poliquétido (Yu R *et al.* Lipids 2000; 35: 1061-64). Una estrategia alternativa es una ruta, en donde se utiliza la actividad alternada de desaturasas y elongasas (Zank TK *et al.* Plant Journal 2002; 31: 255-68). Una  
 20 modificación de dicha ruta por las  $\Delta 6$ -desaturasa,  $\Delta 6$ -elongasa,  $\Delta 5$ -desaturasa,  $\Delta 5$ -elongasa y  $\Delta 4$ -desaturasa es la llamada ruta de Sprecher (Sprecher 2000. Biochim. Biophys. Acta 1486: 219-31) en mamíferos. Las bacterias recombinantes pueden incluir al menos un gen de una de las enzimas descritas anteriormente, tal como una elongasa y/o una desaturasa, de manera que la bacteria resultante presente la capacidad de  
 25 producir ácidos grasos poli-insaturados, tal como DHA. Ejemplos de bacterias recombinantes incluyen, aunque no se limitan a, bacterias seleccionadas del grupo de las familias *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* o *Rhizobiaceae*, tal como bacterias de los géneros seleccionados de *Bacillus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Agrobacterium*, *Carbophilus*,  
 30 *Chelatobacter*, *Ensifel*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*. En una realización preferida, la bacteria recombinante es *Escherichia coli*.

El cultivo de la bacteria productora de al menos un ácido graso se realiza mediante métodos convencionales descritos en el estado de la técnica y depende de la bacteria que se desee cultivar. Un experto en la materia conoce ampliamente los medios y las condiciones según la bacteria que se utilice para enriquecer los nematodos. En una realización particular, la bacteria es *M. marina*. Preferiblemente el crecimiento de *M. marina* se lleva a cabo en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con NaCl a una temperatura de cultivo comprendida entre 4 y 20°C, preferentemente de 16°C aproximadamente durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 72 horas. Más preferiblemente, el cultivo se lleva a cabo con agitación.

El enriquecimiento del nematodo con la bacteria productora de ácidos grasos se realiza de manera convencional para el crecimiento de nematodos en presencia de dichas bacterias. En una realización particular, se centrifuga un cultivo de bacterias y se añade el pellet o centrifugado de dicho cultivo al medio de cultivo de los nematodos, conocido como “Medio S”. Por otra parte, el nematodo se inocula a partir de un cultivo crecido en medio sólido NGM (2,5 g peptona, 17 g agar, 3 g NaCl, 975 ml agua destilada, 1 ml de colesterol (5 mg/ml) (stock en etanol), 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M, 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 25 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M). La composición del medio de cultivo de nematodos, “Medio S”, es preferiblemente la siguiente (para preparar 1 litro de medio):

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>NaCl</b>                         | 5,85 g    |
| <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | 1 g       |
| <b>Citrato potásico pH 6 1 M</b>    | 10 ml     |
| <b>EDTA disódico</b>                | 0,0186 g  |
| <b>FeSO<sub>4</sub></b>             | 0,0069 g  |
| <b>MnCl<sub>2</sub></b>             | 0,002 g   |
| <b>ZnSO<sub>4</sub></b>             | 0,0029 g  |
| <b>CuSO<sub>4</sub></b>             | 0,00025 g |
| <b>CaCl<sub>2</sub> 1M</b>          | 3 ml      |
| <b>MgSO<sub>4</sub> 1M</b>          | 3 ml      |

La invención contempla el crecimiento de los nematodos con la bacteria productora de al menos un ácido graso a una temperatura adecuada para el enriquecimiento de dichos nematodos y que determinará un experto en la materia según el nematodo que se pretenda enriquecer. En una realización particular, la temperatura de crecimiento del

nematodo para que se produzca el enriquecimiento se encuentra entre 15°C y 25°C. Preferiblemente dicha temperatura está entre 16°C y 20°C. La temperatura de crecimiento del nematodo es variable según el ácido graso con el que se quiera enriquecer el nematodo, ya que, a pesar de que se generen ácidos grasos prácticamente a cualquier temperatura, la producción de algunos ácidos grasos es óptima a determinadas temperaturas. Por ejemplo, se prefiere una temperatura de alrededor de 16°C si se desea enriquecer un nematodo con ácido oleico, ácido linoleico, ácido dihomo-gama-linolénico y ácido araquidónico. No obstante, se prefiere una temperatura de alrededor de 20°C si se desea enriquecer un nematodo con ácido miristoleico y ácido docosahexanoico (DHA).

En una realización preferida, el cultivo de nematodos se incuba en agitación a la temperatura elegida. Se monitoriza frecuentemente el cultivo en el microscopio, de manera que si el cultivo no aparece turbio al microscopio, es indicativo de que los nematodos han terminado el alimento, es decir, las bacterias productoras de al menos un ácido graso se han acabado. En este momento, es necesario añadir más pellet de bacteria productora de ácido graso al medio. Preferiblemente al cuarto o quinto día, se recoge el cultivo, poniendo el matraz en hielo para permitir que los nematodos se depositen en el fondo. Posteriormente se centrifuga el cultivo de nematodos y se recuperan los nematodos enriquecidos en al menos un ácido graso.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método de alimentación de un animal seleccionado del grupo formado por un pez, un molusco y un crustáceo, en adelante segundo método de la invención, que comprende alimentar dicho animal con un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso.

El segundo método de la invención desarrollado por los inventores supone varias ventajas con respecto a otros métodos de alimentación de animales acuáticos. Una de las ventajas es que la utilización para la alimentación de animales acuáticos de nematodos enriquecidos a partir de bacterias productoras de ácidos grasos resulta en una muy alta eficiencia de incorporación de dichos ácidos grasos, en concreto de DHA. En el caso de los peces, dichos niveles de incorporación de DHA en el nematodo llegan a niveles de alrededor del 3%, similar al obtenido con zooplancton, alimento natural de

las larvas de peces. Por otro lado, el segundo método de la invención se puede utilizar tanto para alimentar animales adultos como para alimentar larvas de peces, crustáceos o moluscos. La alimentación de peces, moluscos y crustáceos en estadio larval presenta varios problemas, solventados por el segundo método de la invención; uno de ellos es que el tamaño del alimento tiene que ser de alrededor de 1 mm y además el alimento debe ser móvil, para que sea más atractivo para la larva. Asimismo, la utilización de nematodos aporta ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico al animal, mientras que la bacteria aporta, entre otros ácidos grasos, el DHA, imprescindible para el correcto desarrollo de dicho animal, tanto en estadio larval como en estadio adulto.

10

En una realización particular, el segundo método de la invención se puede utilizar para alimentar peces adultos, es decir, como pienso de engorde para dichos animales, ya sean peces, crustáceos o moluscos.

15 El término “estadio larval”, tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una forma juvenil distintiva del molusco, crustáceo o pez antes de que se produzca su metamorfosis a animal adulto. La duración de dicho estadio larval depende de la especie de pez, crustáceo o molusco, así, en los peces, por ejemplo, es relativamente corto, entre 3 y 8 semanas. El estadio larval finaliza en el momento que la larva cambia de

20 apariencia y se convierte en un animal adulto.

Los detalles específicos del cultivo de los nematodos enriquecidos con al menos un ácido graso se encuentran en el primer método de la invención, por lo que se hace referencia a ellos para el segundo método de la invención y no se explicarán en más

25 detalle.

Los peces contemplados en el segundo método de la invención incluyen, sin limitación, peces de las siguientes clases: *Conodonta*, *Hyperoartia*, *Petromyzontidae* (lampreas), *Pteraspidomorphi*, *Thelodonti*, *Anaspida*, *Cephalaspidomorphi*, *Galeaspida*, *Pituriaspida*, *Osteostraci*, *Gnathostomata* (peces con mandíbula), *Placodermi*, *Chondrichthyes* (peces cartilaginosos), *Acanthodii*, *Osteichthyes* (peces óseos). En una realización preferida dicho pez pertenece a la familia *Cyprinidae*, más preferiblemente es pez cebra (*Danio rerio*). En otra realización particular, dicho pez pertenece a la

30

familia *Moronidae* y al género *Dicentrarchus*. Más preferiblemente, dicho pez es lubina (*Dicentrarchus labrax*). En otra realización particular, dicho pez pertenece a la familia *Sparidae* y más preferiblemente, al género *Sparus*. Aún más preferiblemente, dicho pez es *Sparus aurata* o dorada.

5

Los crustáceos contemplados en el segundo método de la invención incluyen, sin limitación, crustáceos de las siguientes clases: *Branchiopoda*, *Remipedia*, *Cephalocarida*, *Maxillopoda*, *Ostracoda* y *Malacostraca*.

- 10 Los moluscos contemplados en el segundo método de la invención incluyen, sin limitación, moluscos de las siguientes clases: *Caudofoveata*, *Solenogastres*, *Polyplacophora*, *Monoplacophora*, *Bivalvia*, *Scaphopoda*, *Gastropoda* y *Cephalopoda*.

- 15 Para llevar a cabo el segundo método de la invención, en primer lugar se enriquecen los nematodos por cualquier método convencional, preferentemente siguiendo el primer método de la invención descrito anteriormente. Posteriormente, se alimentan los animales (peces, crustáceos o moluscos) con los nematodos enriquecidos. La cantidad de nematodos que se administra al animal depende del método de cultivo empleado, del estadio de desarrollo de dicho animal y de la especie de animal cultivada. Un experto en
- 20 la materia es capaz de determinar las condiciones de alimentación y administrará diferente cantidad de nematodos según dichas condiciones. Métodos adecuados para conocer si el animal se está alimentando de manera adecuada con los nematodos incluyen, sin limitarse a ellos, (a) observación bajo la lupa de los principales parámetros morfométricos de dicho animal (tamaño, grosor, estado fisiológico, desarrollo de
- 25 estructuras orgánicas, como las estructuras óseas, ojos, pigmentación); (b) medición de los niveles de ácidos grasos y proteínas de los animales alimentados con el nematodo; y (c) empleo de una cepa transgénica del nematodo que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), de esta manera se observa mediante microscopia de fluorescencia si los nematodos están siendo ingeridos o no por las larvas de las distintas especies.

30

Asimismo, los nematodos enriquecidos con al menos un ácido graso se puede combinar junto con otros organismos utilizados para alimentar peces, tal como *Artemia* o con piensos producidos a partir de harinas de pescado.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

5

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### **Crecimiento de nematodos con *Moritella marina***

Se crecieron 250 ml de medio de cultivo (medio S) inoculado con *Caenorhabditis elegans* recuperados de 4 placas petri durante 7 días. Posteriormente se subcultivó 1/10 de dicho cultivo en el mismo medio con una concentración salina de NaCl de 0,2 M. Se incubó durante una semana y se volvió a subcultivar 1/10 de dicho cultivo en un medio con una concentración salina de NaCl de 0,4 M.

El medio S presenta la siguiente composición:

- Medio S basal [5,85 g NaCl, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml colesterol (5 mg/ml en etanol), H<sub>2</sub>O hasta 1 l. Esterilizar].
- Citrato potásico 1 M pH 6,0 [20 g ácido cítrico monohidrato, 293,5 g citrato potásico monohidrato, H<sub>2</sub>O hasta 1 l. Esterilizar].
- Solución traza de metales [1,86 g EDTA disódico, 0,69 g FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g MnCl<sub>2</sub>•4 H<sub>2</sub>O, 0,29 g ZnSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O, 0,025 g CuSO<sub>4</sub>•5 H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O hasta 1 l. Esterilizar. Almacenar en oscuridad].
- 1 M CaCl<sub>2</sub> [55,5 g CaCl<sub>2</sub> en 1 litro H<sub>2</sub>O. Esterilizar]
- Medio S [1 l S Basal, 10 ml 1 M citrato potásico pH 6, 10 ml solución traza metales, 3 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>, 3 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>. No se autoclava].

El cultivo de *Moritella marina* se incubó en agitación durante 72 h en 2 l de LB suplementado con un 3% de NaCl. Se centrifugó el cultivo, de manera que se obtuvo un “pellet” de bacteria. Se inoculó el cultivo que comprendía *C. elegans* con el pellet del cultivo de *M. marina*. El cultivo se incubó con agitación a 20°C o a 16°C, según el experimento. Los cultivos se monitorizaron al microscopio para comprobar el crecimiento del nematodo. Si el nematodo ya no tiene alimento, es decir, si el medio de cultivo no está turbio (no presenta bacterias), se procedía a añadir más “pellet” de bacteria. En el momento que se observó al microscopio que había suficientes nematodos en una gota, el cultivo se recogió, aproximadamente al 5º día. Para permitir la recogida

de los nematodos, se colocó en hielo el cultivo durante 15 minutos para que los nematodos se depositaran. Se aspiró la mayoría del líquido del matraz. El líquido restante del cultivo se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó durante al menos 2 minutos a 1150 g para recoger los nematodos.

5

Como control, se crecieron *Caenorhabditis elegans* utilizando como alimento una bacteria no productora de ácidos grasos, tal como *E. coli*, en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo el cultivo con *Moritella marina*.

## 10 EJEMPLO 2

### Producción de ácidos grasos

La determinación de la cantidad de ácidos grasos en el pellet de nematodos obtenido en el Ejemplo 1, se realizó mediante cromatografía de gases. Para ello, se siguió el método de Bligh & Dyer (Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917 (1959)), en el que se añaden 15 3,75 ml de 1:2 (v/v)  $\text{CHCl}_3$ : metanol y se agita, luego se añaden 1,25 ml de  $\text{CHCl}_3$ , y se agita nuevamente, añadiendo finalmente 1,25 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recupera la fase inferior. A continuación, para determinar la composición de ácidos grasos, el extracto de lípidos obtenido se 20 transmetila para su posterior análisis mediante cromatografía de gases, añadiendo 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2,5% diluido en metanol e incubándolo 1 hora a 80°C. Una vez frío, se le añaden 0,2 ml de hexano y 1,5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , se centrifuga a baja velocidad recuperando la fase de arriba para su posterior inyección en el cromatógrafo de gases.

25 En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de ácidos grasos con respecto al total de ácidos grasos presentes en el cultivo. La primera fila de la tabla muestra las cantidades de distintos ácidos grasos en *M. marina*. Como se puede observar, los ácidos grasos más abundantes en *Moritella* son, en este orden: ácido palmitoleico (16:1n7); ácido palmítico (16:0), ácido octadecenoico (18:1n7) y finalmente ácido docosahexanoico 30 (22:6) (DHA). Los niveles de incorporación del ácido graso más abundante (16:1n7) en *M. marina*, que representa el 55,7% del total de ácidos grasos es realmente muy bajo (pasa del 3,01% en el nematodo crecido con *E. coli* al 3,32% en el nematodo crecido con *M. marina* a 20°C). Lo mismo ocurre con los dos siguientes tipos de ácidos grasos

más abundantes. Sin embargo, los niveles del ácido graso 22:6 (DHA) se incrementan hasta alcanzar niveles parecidos a los del zooplancton (alrededor del 3%) (Koven *et al.* 2001. Aquaculture 193: 107), con respecto a los niveles de dicho ácido graso de un nematodo crecido en un medio estándar (sin *Moritella*). Por tanto, se puede concluir que  
 5 ocurre una incorporación preferencial de DHA.

Este proceso de elevada incorporación de DHA no ocurre en todas las condiciones de cultivo. Como se puede observar en la última fila de la Tabla 1, a una menor temperatura de cultivo del nematodo (16°C), el enriquecimiento en DHA es menor y no  
 10 se alcanzan los niveles del 3% que presenta el zooplancton (alimento natural de las larvas de peces). Sin embargo, a una temperatura de crecimiento de 20°C, la incorporación de DHA es mucho más eficiente.

En cuanto al enriquecimiento con otros ácidos grasos, tal como se muestra en la Tabla  
 15 1, algunos ácidos grasos, tanto saturados como poli-insaturados se incorporan eficientemente en el nematodo cuando se crece con *M. marina*, con respecto a los niveles cuando se crece con *E. coli*. Dichos ácidos grasos con los que se enriquece *C. elegans* son los siguientes: ácido mirístico (C14:1), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6), ácido dihomo-gama-linolénico (C20:3 $\omega$ 6,  
 20 DGLA) y ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ 6), aparte del enriquecimiento con ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA), ya mencionado. La temperatura óptima de crecimiento del nematodo para la producción de dichos ácidos grasos es variable, según el ácido graso que se desee producir, tal como se observa en la Tabla 1, comparando ambas temperaturas de crecimiento. La temperatura será preferiblemente de 16°C si se  
 25 desea enriquecer el nematodo con ácido oleico, ácido linoleico, ácido dihomo-gama-linolénico y ácido araquidónico. No obstante, la temperatura será preferiblemente de 20°C si se desea enriquecer el nematodo con ácido miristoleico y ácido docosahexanoico (DHA).

|                                        | 14:0 | 14:1 | 16:0<br>iso | 16:0 | 16:1n7 | 18:0 | 18:1n9 | 18:1n7 | 18:2n6 | 18:3n6 | 19delta | 20:3n6 | 20:4n6 | 20:4n3 | 20:5n3 | 22:6<br>DHA |
|----------------------------------------|------|------|-------------|------|--------|------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| <i>M. marina</i><br>16°C               | 4,28 | 1,51 | 0           | 13,6 | 55,71  | 0    | 0,38   | 0,63   | 9,98   | 1,07   | 0       | 0      | 0      | 0,84   | 0,5    | 9,21        |
| Nematodos+<br><i>E.coli</i> 20°C       | 0,47 | 0    | 0,35        | 1,92 | 3,01   | 6,27 | 7,13   | 1,98   | 34,9   | 2,80   | 1,86    | 5,69   | 4,18   | 7,19   | 18,45  | 0           |
| Nematodos+<br><i>M. marina</i><br>20°C | 1,55 | 1,94 | 0,42        | 2,62 | 3,32   | 6,80 | 5,85   | 1,76   | 28,14  | 5,07   | 1,03    | 3,30   | 3,13   | 6,26   | 15,09  | 3,04        |
| Nematodos+<br><i>M. marina</i><br>16°C | 1,39 | 0    | 0           | 2,47 | 3,84   | 7,58 | 6,52   | 4,14   | 31,07  | 8,20   | 0,22    | 0      | 6,09   | 6,05   | 16,40  | 1,40        |

**Tabla 1:** Comparación de la concentración de ácidos grasos (% respecto al total de ácidos grasos) presentes en *Moritella marina* (fila 1), en *C.elegans* en presencia de *E. coli*, crecidos a 20°C (fila 2) y en *C.elegans* en presencia de *Moritella marina* crecidos a 20°C y 16°C (filas 3 y 4).

[Los ácidos grasos están nombrados mediante números, el primero indica el número total de carbonos, el segundo seguido de dos puntos el número de dobles enlaces y el *nx* indica la posición del primer doble enlace]

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para obtener un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso que comprende cultivar dicho nematodo con una bacteria productora de dicho ácido graso.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el ácido graso es un ácido graso poli-insaturado.
3. Método según la reivindicación 1, en donde el ácido graso se selecciona del grupo de ácido mirístico (C14:1), ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA), ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3, EPA), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6), ácido dihomo-gama-linolénico (C20:3 $\omega$ 6, DGLA) y ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ 6).
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la bacteria productora de dicho ácido graso es una bacteria marina.
5. Método según la reivindicación 4 en donde la bacteria marina es una bacteria seleccionada entre los géneros *Moritella*, *Shewanella*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas* y *Colwellia*.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la bacteria productora de dicho ácido graso es una bacteria recombinante que produce dicho ácido graso.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el nematodo se selecciona entre *Caenorhabditis elegans* y *Panagrellus redivivus*.
8. Un método de alimentación de un animal seleccionado del grupo formado por un pez, un molusco y un crustáceo, que comprende alimentar dicho animal con un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso.
9. Método según la reivindicación 8, en donde el ácido graso es un ácido graso poli-insaturado.
10. Método según la reivindicación 9, en donde el ácido graso se selecciona del grupo de ácido mirístico (C14:1), ácido docosahexanoico (C22:6 $\omega$ 3, DHA), ácido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3, EPA), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), ácido linoleico (C18:2 $\omega$ 6), ácido dihomo-gama-linolénico (C20:3 $\omega$ 6, DGLA) y ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ 6).

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en donde el nematodo enriquecido con al menos un ácido graso se ha obtenido mediante el cultivo de dicho nematodo con una bacteria productora de dicho ácido graso.
12. Método según la reivindicación 11, en donde la bacteria productora de dicho  
5 ácido graso es una bacteria marina.
13. Método según la reivindicación 12, en donde la bacteria marina es una bacteria seleccionada entre los géneros *Moritella*, *Shewanella*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas* y *Colwellia*.
14. Método según la reivindicación 11, en donde la bacteria productora de al menos  
10 un ácido graso es una bacteria recombinante que produce dicho ácido graso.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde el nematodo se selecciona entre *Caenorhabditis elegans* y *Panagrellus redivivus*.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en donde el animal se encuentra en un estadio larval de su desarrollo.
- 15 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en donde el animal es un animal adulto.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031790

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados                                                                                                                                                                                                          | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X         | LARA, R. et al. Cultivo del nematodo <i>Panegrellus redivivus</i> (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con <i>Spirulina</i> sp. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 2007, vol 42 (1), páginas 29-36.      | 1-4,7-12,15,16             |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                             | 5,6,13,14                  |
| X         | WO 9518527 A1 (AGRICULTURAL GENETICS COMPANY LIMITED) 13.07.1995, página 2; página 4, párrafos 1,2; página 5, último párrafo, tablas 1-3; reivindicaciones.                                                                 | 8-10,15-17                 |
| X         | US 20080070289 A1 (FISH BIOTECH LTD) 20.03.2008, párrafos 3,5,6,26,27,54,58.                                                                                                                                                | 8-10,15-17                 |
| Y         | LEWIS T. et al. Enrichment of rotifers <i>Brachionus plicatilis</i> with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid produced by bacteria. Journal of the World Aquaculture Society, 1998, vol. 29 (3), páginas 313-318. | 5,13                       |
| Y         | RUSSEL, N.J. y NICHOLS, D. S. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria -a dogma rewritten. Microbiology, 1999, vol. 145, páginas 767-779.                                                                             | 5,13                       |
| Y         | ORIKASA, Y. et al. A phosphopantetheinyl transferase gene essential for biosynthesis of n-3 polyunsaturated fatty acids from <i>Moritella marina</i> strain MP-1. FEBS Letters, 2006, vol. 580, páginas 4423-4429.          | 6,14                       |
| A         | BROOKS, K. et al. The influence of bacterial diet on fat storage in <i>C. elegans</i> . PLoS ONE, 2009, vol. 4(10): e7545. doi:10.1371/journal.pone.0007545 .                                                               | 1-7                        |

#### 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  
31.10.2011

Examinador  
A. I. Polo Díez

Página  
2/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01K67/033** (2006.01)

**A01K61/00** (2006.01)

**A23K1/18** (2006.01)

**A23K1/16** (2006.01)

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

A01K, 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, BIOSIS, HCAPLUS, AQUASCI, OCEAN

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2011

**Declaración**

|                                                 |                                  |           |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 5, 6, 13, 14    | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 1-4,7-12, 15-17 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones                 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 1-17            | <b>NO</b> |

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       | LARA, R. et al.                      | 2007              |
| D02       | WO 9518527 A1                        | 13.07.1995        |
| D03       | US 20080070289 A1 (FISH BIOTECH LTD) | 20.03.2008        |
| D04       | LEWIS T. et al.                      | 198               |
| D05       | RUSSEL, N.J. y NICHOLS, D. S         | 1999              |
| D06       | ORIKASA, Y. et al                    | 2006              |

**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 solicitud se refiere a un método para obtener un nematodo enriquecido con al menos un ácido graso que comprende cultivar a dicho nematodo con una bacteria productora de dicho ácido graso (reivindicación 1). Las reivindicaciones 2 a 7 dan detalles del tipo de ácido graso con el que se puede enriquecer el nematodo, así como de la bacteria y el nematodo utilizado.

La solicitud también se refiere a un método para alimentar un animal (seleccionado entre peces, crustáceos y moluscos) que comprende alimentar dicho animal con un nematodo enriquecido (reivindicaciones 8 a 17).

**Novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 de la LP)**

El documento D1 describe el cultivo de un nematodo (*Panegrellus redivivus*) con una cianobacteria del género *Spirulina*. La tabla 3 de dicho documento muestra la composición de los nematodos alimentados de este modo. Con respecto a los alimentados únicamente con avena, los nematodos alimentados con *Spirulina* resultan enriquecidos en algunos ácidos grasos poliinsaturados. Estos nematodos se pueden utilizar con posterioridad como alimento para el cultivo larvario de crustáceos.

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1 a 4, 7 a 12, 15 y 16.

Los documentos D2 y D3 divulgan alimentos para peces, moluscos o crustáceos que consisten en nematodos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados de una u otra manera, por lo que, cada uno de estos documentos afecta a la novedad de las reivindicaciones 8 a 10 y 15 a 17

Las reivindicaciones dependientes 5, 6, 13, 14 cumplen el requisito de novedad pero carecen de actividad inventiva.

El documento D1 es el más cercano del estado de la técnica ya que trata de obtener nematodos enriquecidos en ácidos grasos utilizando una bacteria marina. La diferencia entre este documento y las reivindicaciones 5 a 6 y 13 a 14 de la solicitud en estudio es que en ésta se propone la utilización de otras bacterias en vez de la *Spirulina* para enriquecer los nematodos. El problema planteado por la invención sería encontrar bacterias alternativas a la *Spirulina* para enriquecer los nematodos en ácidos grasos. Un experto en la materia que quisiera solucionar ese problema, encontraría la solución en cualquiera de los documentos D4, D5 y D6 en los que se muestran bacterias marinas, algunas de ellas recombinantes, con un gran contenido en ácidos grasos insaturados. En estos documentos se sugiere o se usan estas bacterias para enriquecer las presas que se ofrecen normalmente como alimento en acuicultura marina.

Así pues, resultaría obvio para un experto en la materia que quisiera buscar bacterias alternativas a la utilizada en D1 para enriquecer a los nematodos, utilizar cualquiera de las bacterias de los documentos D4, D5 o D6, con razonables expectativas de éxito.