

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 848**

51 Int. Cl.:

A23K 10/00 (2006.01)
A23K 50/00 (2006.01)
A23K 10/40 (2006.01)
A23K 10/12 (2006.01)
A23K 10/16 (2006.01)
A23K 20/158 (2006.01)
A23K 20/163 (2006.01)
A23K 40/25 (2006.01)
A23K 50/80 (2006.01)
A23K 40/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015** **PCT/EP2015/071689**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16050556**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015** **E 15767149 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.11.2021** **EP 3200604**

54 Título: **Procedimiento para la producción de un pienso**

30 Prioridad:

02.10.2014 EP 14187467

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2022

73 Titular/es:

EVONIK OPERATIONS GMBH (100.0%)
Rellinghauser Straße 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

SILVA, AMELIA CLAUDIA;
EILS, STEFAN;
PRIEFERT, HORST y
RABE, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 900 848 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de un pienso

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un pienso para la cría de animales, en el que se utiliza un pienso, que contiene una biomasa de laberintúlidos.

10 Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) representan un componente importante para la alimentación del ser humano y de los animales. Como fuente para los PUFA se ha usado y se usa sobre todo pescado. El pescado se utiliza por regla general en forma de harina de pescado o aceite de pescado para la alimentación animal. Debido a la escasez de la población de peces disponible se han buscado fuentes de lípidos alternativas. A este respecto, como alternativa se ha utilizado sobre todo aceite vegetal. Además, se ha descubierto que determinados microbios producen PUFA heterotróficos en grandes cantidades.

- 15 Los PUFA pueden obtenerse a continuación de las células o sino utilizarse las células en forma de biomasa directamente en piensos o productos alimenticios.

El documento CN 103 385 390 A describe un pienso para peces, que contiene harina de pescado, aceite de pescado y biomasa de *Schizochytrium limacinum*.

20 Miller *et al.* (Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 148 (2007) 382-392) describen la sustitución de aceite de pescado por aceite de palma, aceite de *Thraustochytrium sp.* o una mezcla de aceite de palma y aceite de *Thraustochytrium sp.* Describen que la sustitución de aceite de pescado por aceite de *Thraustochytrium sp.* no tiene ninguna influencia sobre el crecimiento de salmones, pero aumenta el contenido en DHA en el tejido muscular del

25 pescado. Carter *et al.* (Mar. Biotechnol. 5, 480-492, 2003) describen que la alimentación animal con una mezcla de aceite de colza y biomasa de *Thraustochytrium sp.* en comparación con una alimentación animal con una mezcla de aceite de colza y aceite de pescado, así como en comparación con la alimentación animal con únicamente aceite de colza no tiene ninguna influencia sobre el crecimiento de los salmones o la composición química de los salmones, pero que en comparación con la alimentación animal con la mezcla de

30 aceite de colza y aceite de pescado podía observarse una tasa de mortalidad mayor de los peces. Según la invención se ha encontrado ahora sorprendentemente que en el caso de la sustitución de aceite de pescado por una biomasa de *Aurantiochytrium sp.* podía conseguirse un mejor crecimiento que en el caso de usar aceite de pescado como única fuente de PUFA, cuando en cada caso se ajusta el mismo contenido de grasas en el pienso.

35 Según la invención se ha encontrado además que en el caso de la cría de animales con una mezcla de aceite marino y una biomasa de laberintúlidos podía conseguirse un mejor crecimiento que en el caso de una cría con o bien aceite de pescado solo o bien biomasa de laberintúlidos sola, cuando en cada caso se ajustaba el mismo contenido de grasas en el pienso.

40 Por tanto, el objetivo de la presente invención era proporcionar un procedimiento para la producción de un pienso para la cría de animales, con el que se mejore el crecimiento de los animales. La invención se describe en el juego de reivindicaciones adjunto.

El pienso contiene aceite marino, preferiblemente aceite de pescado, y una biomasa de laberintúlidos.

50 El pienso comprende preferiblemente una biomasa de *Aurantiochytrium sp.*

A este respecto, en el caso de *Aurantiochytrium sp.* se trata preferiblemente de la especie *Aurantiochytrium limacinum*, de manera especialmente preferible de la cepa *Aurantiochytrium limacinum* SR21 (IFO 32693).

55 Por "aceite marino" debe entenderse según la invención en general un aceite, que se ha obtenido a partir de un organismo marino, preferiblemente a partir de un animal marino. Además de aceite de pescado, que se prefiere según la invención, también debe entenderse aceite, que se ha aislado a partir de otros organismos marinos, en particular a partir de animales marinos, por ejemplo, a partir de krill, lamelibranquios, calamares o gambas. Preferiblemente, en el caso del aceite marino que debe utilizarse según la invención se trata de aceite de pescado, en particular de un aceite graso a partir de peces, de manera especialmente preferible de un aceite graso a partir de peces de las familias

60 *Engraulidae*, *Carangidae*, *Clupeidae*, *Osmeridae*, *Scombridae* y/o *Ammodytidae*. Los laberintúlidos se denominan también *Labyrinthulomycetes*, hongos mucilaginosos o redes del limo. En el caso de los laberintúlidos se trata preferiblemente de aquellos de la familia *Thraustochytriaceae*. A la familia *Thraustochytriaceae* pertenecen los géneros *Althomia*, *Aplanochytrium*, *Elnia*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium* y *Ulkenia*. Se prefieren especialmente los géneros *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* y *Oblongichytrium*, sobre todo el género *Aurantiochytrium*. Dentro

del género *Aurantiochytrium*, según la invención se prefiere la especie *Aurantiochytrium limacinum* (denominada antiguamente también *Schizochytrium limacinum*). De manera muy especialmente preferible, según la invención se utiliza la cepa *Aurantiochytrium limacinum* SR21 (IFO 32693).

- 5 El aceite marino y la biomasa de laberintúlidos se utilizan en el pienso, con respecto al peso seco de la biomasa, preferiblemente en la relación en peso de desde 3:1 hasta 1:6, en particular de 2:1 a 1:5, de manera especialmente preferible de 3:2 a 1:4, en particular de 1:1 a 1:3, sobre todo en la relación de aproximadamente 2:3.

- 10 Las células contenidas en la biomasa se caracterizan preferiblemente porque presenta un contenido en PUFA de al menos el 20% en peso, preferiblemente al menos el 25% en peso, en particular al menos el 30% en peso, en cada caso con respecto a la masa celular seca, encontrándose preferiblemente al menos el 50% en peso, en particular al menos el 75% en peso y en una forma de realización especialmente preferida al menos el 90% en peso de los lípidos contenidos en la célula en forma de triglicéridos.

- 15 En el caso del ácido graso poliinsaturado (PUFA) se trata según la invención preferiblemente de un ácido graso altamente insaturado (HUFA).

- 20 Por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se entienden según la invención ácidos grasos, que presentan al menos dos, en particular al menos tres, dobles enlaces C-C. Entre los PUFA se prefieren según la invención los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA). Por HUFA se entienden según la invención ácidos grasos, que presentan al menos cuatro dobles enlaces C-C.

- 25 Los PUFA pueden encontrarse en la célula en forma libre o en forma unida. Ejemplos de la presencia en forma unida son fosfolípidos y ésteres de los PUFA, en particular monoacil-, diacil- y triacilglicéridos. En una forma de realización preferida, una mayoría de los PUFA se encuentra en forma de triglicéridos, encontrándose preferiblemente al menos el 50% en peso, en particular al menos el 75% en peso y en una forma de realización especialmente preferida al menos el 90% en peso de los PUFA contenidos en la célula en forma de triglicéridos.

- 30 PUFA preferidos los representan los ácidos grasos omega-3 y ácidos grasos omega-6, prefiriéndose especialmente los ácidos grasos omega-3. A este respecto, ácidos grasos omega-3 preferidos los representan el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3), en particular el ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico, y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3), en particular el ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico, prefiriéndose especialmente el ácido docosahexaenoico.

- 35 Por tanto, una biomasa especialmente preferida según la invención contiene DHA en una cantidad de al menos el 20% en peso, preferiblemente al menos el 25% en peso, en particular al menos el 30% en peso, en cada caso con respecto a la masa celular seca, encontrándose preferiblemente al menos el 50% en peso, en particular al menos el 75% en peso y en una forma de realización especialmente preferida al menos el 90% en peso de los lípidos contenidos en la célula en forma de triglicéridos.

- 40 El pienso producido según el procedimiento según la invención contiene como sustancia contenida adicional harina de animales marinos, preferiblemente harina de pescado.

- 45 Por "harina de animales marinos" debe entenderse según la invención en general el producto de procesamiento de animales marinos. Además de harina de pescado, que se utiliza preferiblemente según la invención, por esto deben entenderse según la invención en particular también harina de krill, harina de lamelibranquios, harina de calamar o harina de gamba, que representan productos sustitutivos clásicos para harina de pescado. Sin embargo, de manera especialmente preferible, en el caso de la harina de organismos marinos se trata de harina de pescado.

- 50 La harina de animales marinos, preferiblemente harina de pescado, y la biomasa se utilizan en el pienso, con respecto al peso seco, preferiblemente en la relación en peso de desde 1:4 hasta 8:1, en particular desde 1:2 hasta 6:1, de manera especialmente preferible desde 1:1 hasta 3:1, en particular desde 1:1 hasta 2:1, sobre todo en la relación de aproximadamente 5:3.

- 55 El aceite marino, en particular aceite de animales marinos, sobre todo aceite de pescado, está contenido en el pienso con respecto a la harina de organismos marinos, en particular harina de animales marinos, sobre todo harina de pescado, preferiblemente en la relación en peso de desde 1:10 hasta 2:1, en particular de 1:5 a 1:1, de manera especialmente preferible de 1:4 a 1:2. De manera especialmente preferible, la relación en peso de aceite marino, en particular aceite de pescado, con respecto a harina de organismos marinos asciende a aproximadamente 1:3.

- 60 La biomasa se utiliza, con respecto a la masa seca, en una cantidad de desde el 2 hasta el 20% en peso, preferiblemente del 3 al 18% en peso, en particular del 5 al 15% en peso, sobre todo del 7 al 11% en peso.

- 65 Además, se utiliza aceite marino, en particular aceite de animales marinos, sobre todo aceite de pescado, en una cantidad de desde el 1 hasta el 12% en peso, en particular del 2 al 8% en peso, de manera especialmente preferible del 3 al 7% en peso, sobre todo del 4 al 6% en peso.

Además, se utiliza harina de animales marinos, sobre todo harina de pescado, con respecto a la masa seca en una cantidad de desde el 5 hasta el 25% en peso, preferiblemente del 10 al 20% en peso, de manera especialmente preferible del 12 al 18% en peso.

5 Los componentes mencionados anteriormente biomasa, aceite marino y harina de animales marinos se utilizan en la producción del pienso en una cantidad correspondiente.

10 La suma de biomasa, aceite marino, en particular aceite de animales marinos, preferiblemente aceite de pescado, y harina de animales marinos, sobre todo harina de pescado, supone en una forma de realización preferida preferiblemente al menos el 15% en peso, de manera especialmente preferible al menos el 20% en peso, en particular del 20 al 40% en peso, sobre todo al menos el 25% en peso, en particular del 25 al 35% en peso, del pienso.

15 Las otras sustancias contenidas de pienso se seleccionan preferiblemente de componentes que contienen proteína, que contienen hidrato de carbono, que contienen ácido nucleico y solubles en lípidos, así como dado el caso componentes que contienen grasas adicionales y además de otros aditivos tales como minerales, vitaminas, pigmentos y aminoácidos. Además de las sustancias nutritivas también pueden estar contenidas sustancias que proporcionan estructura, para mejorar, por ejemplo, la textura o el aspecto del pienso. Además, pueden utilizarse, por ejemplo, también aglutinantes, para influir en la consistencia del pienso. Un componente utilizado preferiblemente, que representa tanto una sustancia nutritiva como una sustancia que proporciona estructura, es el almidón.

El pienso presenta preferiblemente un contenido en proteínas total de desde el 30 hasta el 60% en peso, preferiblemente del 35 al 55% en peso, en particular del 40 al 50% en peso.

25 Además, el pienso presenta preferiblemente un contenido en grasas total de desde el 15 hasta el 35% en peso, preferiblemente del 18 al 32% en peso, en particular del 20 al 30% en peso, sobre todo del 22 al 28% en peso.

30 Además, el pienso presenta preferiblemente un contenido en almidón total de como máximo el 25% en peso, en particular como máximo del 20% en peso, preferiblemente del 5 al 15% en peso, de manera especialmente preferible del 7 al 13% en peso.

35 Además, el pienso presenta preferiblemente un contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de desde el 1 hasta el 12% en peso, preferiblemente del 2 al 10% en peso, en particular del 4 al 8% en peso, sobre todo del 5 al 7% en peso.

Además, el pienso presenta preferiblemente un contenido en ácidos grasos omega-3 de desde el 0,1 hasta el 6,0% en peso, preferiblemente del 0,5 al 5,0% en peso, en particular del 1,0 al 4,5% en peso, sobre todo del 2,0 al 4,0% en peso, en particular del 2,5 al 3,5% en peso.

40 Además, el pienso presenta preferiblemente un contenido en DHA de desde el 0,05 hasta el 4,0% en peso, preferiblemente del 0,25 al 3,0% en peso, en particular del 0,5 al 2,8% en peso, sobre todo del 1,0 al 2,5% en peso, en particular del 1,4 al 2,0% en peso.

Un pienso producido según el procedimiento según la invención presenta preferiblemente las siguientes propiedades:

45 - un contenido en proteínas total de desde el 30 hasta el 60% en peso, preferiblemente del 35 al 55% en peso, en particular del 40 al 50% en peso;

50 - un contenido en grasas total de desde el 15 hasta el 35% en peso, preferiblemente del 18 al 32% en peso, en particular del 20 al 30% en peso, sobre todo del 22 al 28% en peso;

- un contenido en almidón total de como máximo el 25% en peso, en particular como máximo el 20% en peso, preferiblemente del 5 al 15% en peso, de manera especialmente preferible del 7 al 13% en peso;

55 - un contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de desde el 1 hasta el 12% en peso, preferiblemente del 2 al 10% en peso, en particular del 4 al 8% en peso, sobre todo del 5 al 7% en peso;

60 - un contenido en ácidos grasos omega-3 de desde el 0,1 hasta el 6% en peso, preferiblemente del 0,5 al 5% en peso, en particular del 1,0 al 4,5% en peso, sobre todo del 2,0 al 4,0% en peso, en particular del 2,5 al 3,5% en peso;

- un contenido en DHA de desde el 0,05 hasta el 4,0% en peso, preferiblemente del 0,25 al 3,0% en peso, en particular del 0,5 al 2,8% en peso, sobre todo del 1,0 al 2,5% en peso, en particular del 1,4 al 2,0% en peso.

65 Por tanto, un pienso producido según el procedimiento según la invención presenta preferiblemente las siguientes propiedades:

- un contenido en proteínas total de desde el 30 hasta el 60% en peso, preferiblemente del 35 al 55% en peso, en particular del 40 al 50% en peso,
- 5 - un contenido en grasas total de desde el 15 hasta el 35% en peso, preferiblemente del 18 al 32% en peso, en particular del 20 al 30% en peso, sobre todo del 22 al 28% en peso;
- un contenido en almidón total de como máximo el 25% en peso, en particular como máximo el 20% en peso, preferiblemente del 5 al 15% en peso, de manera especialmente preferible del 7 al 13% en peso;
- 10 - un contenido en biomasa de laberintúlidos, en particular biomasa de *Thraustochytriaceae*, de desde el 2 hasta el 20% en peso, preferiblemente del 3 al 18% en peso, en particular del 5 al 15% en peso, sobre todo del 7 al 11% en peso;
- 15 - preferiblemente un contenido en aceite marino, en particular aceite de pescado, de hasta el 12% en peso, en particular del 1 al 10% en peso, preferiblemente del 2 al 8% en peso, de manera especialmente preferible del 3 al 7% en peso, sobre todo del 4 al 6% en peso;
- preferiblemente un contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de desde el 1 hasta el 12% en peso, preferiblemente del 2 al 10% en peso, en particular del 4 al 8% en peso, sobre todo del 5 al 7% en peso;
- 20 - preferiblemente un contenido en ácidos grasos omega-3 de desde el 0,1 al 6% en peso, preferiblemente del 0,5 al 5% en peso, en particular del 1,0 al 4,5% en peso, sobre todo del 2,0 al 4,0% en peso, en particular del 2,5 al 3,5% en peso;
- 25 - preferiblemente un contenido en DHA de desde el 0,05 hasta el 4,0% en peso, preferiblemente del 0,25 al 3,0% en peso, en particular del 0,5 al 2,8% en peso, sobre todo del 1,0 al 2,5% en peso, en particular del 1,4 al 2,0% en peso.
- 30 Por tanto, un pienso producido según el procedimiento según la invención presenta preferiblemente también las siguientes propiedades:
 - un contenido en proteínas total de desde el 30 hasta el 60% en peso, preferiblemente del 35 al 55% en peso, en particular del 40 al 50% en peso,
 - 35 - un contenido en grasas total de desde el 15 hasta el 35% en peso, preferiblemente del 18 al 32% en peso, en particular del 20 al 30% en peso, sobre todo del 22 al 28% en peso;
 - un contenido en almidón total de como máximo el 25% en peso, en particular como máximo el 20% en peso, preferiblemente del 5 al 15% en peso, de manera especialmente preferible del 7 al 13% en peso;
 - 40 - un contenido en biomasa de *Aurantiochytrium sp.*, en particular biomasa de *Aurantiochytrium limacinum*, sobre todo biomasa de *Aurantiochytrium limacinum* SR21, de desde el 2 hasta el 20% en peso, preferiblemente del 3 al 18% en peso, en particular del 5 al 15% en peso, sobre todo del 7 al 11% en peso;
 - 45 - preferiblemente un contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de desde el 1 hasta el 12% en peso, preferiblemente del 2 al 10% en peso, en particular de 4 al 8% en peso, sobre todo del 5 al 7% en peso;
 - preferiblemente un contenido en ácidos grasos omega-3 de desde el 0,1 hasta el 6% en peso, preferiblemente del 0,5 al 5% en peso, en particular del 1,0 al 4,5% en peso, sobre todo del 2,0 al 4,0% en peso, en particular del 2,5 al 3,5% en peso;
 - 50 - preferiblemente un contenido en DHA de desde el 0,05 hasta el 4,0% en peso, preferiblemente del 0,25 al 3,0% en peso, en particular del 0,5 al 2,8% en peso, sobre todo del 1,0 al 2,5% en peso, en particular del 1,4 al 2,0% en peso.
 - 55
- Por tanto, un pienso producido según el procedimiento según la invención presenta de manera especialmente preferible las siguientes propiedades:
 - 60 - un contenido en proteínas total de desde el 40 hasta el 50% en peso,
 - un contenido en grasas total de desde el 20 hasta el 30% en peso;
 - un contenido en almidón total de como máximo el 20% en peso, preferiblemente del 5 al 15% en peso;
 - 65

- un contenido en biomasa de *Aurantiochytrium limacinum* SR21 de desde el 5 hasta el 15% en peso, sobre todo del 7 al 11% en peso;
- un contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de desde el 2 hasta el 10% en peso, en particular del 4 al 8% en peso, sobre todo del 5 al 7% en peso;
- un contenido en ácidos grasos omega-3 de desde el 0,5 hasta el 5% en peso, en particular del 1,0 al 4,5% en peso, sobre todo del 2,0 al 4,0% en peso, en particular del 2,5 al 3,5% en peso;
- un contenido en DHA de desde el 0,25 hasta el 3,0% en peso, en particular del 0,5 al 2,8% en peso, sobre todo del 1,0 al 2,5% en peso, en particular del 1,4 al 2,0% en peso.

Como componente que contiene grasa pueden utilizarse según la invención además de la biomasa que debe utilizarse según la invención y el aceite marino dado el caso utilizado grasas adicionales, en particular aceites, de origen tanto animal como aquellos de origen vegetal.

Como componente que contiene grasa adicional se tienen en cuenta según la invención en particular aceites vegetales, por ejemplo, aceite de haba de soja, aceite de semilla de colza, aceite de pipas de girasol, aceite de semilla de lino o aceite de palma, así como mezclas de los mismos.

Preferiblemente, un pienso producido según el procedimiento según la invención contiene aceites vegetales en una cantidad de desde el 3 hasta el 18% en peso, en particular del 5 al 15% en peso, sobre todo del 7 al 13% en peso. Estos se aplican según la invención preferiblemente tras la extrusión al extruido, en particular mediante recubrimiento a vacío.

Como componente que contiene proteína pueden utilizarse según la invención, por ejemplo, proteína de soja, proteína de guisante, gluten de trigo o gluten de maíz, así como mezclas de los mismos. Como componente que contiene hidrato de carbono pueden utilizarse, por ejemplo, harina de trigo, harina de girasol o harina de soja, así como mezclas de las mismas.

La biomasa puede usarse tanto en forma intacta como tras la rotura celular previa para la producción de un pienso según la invención. Para ello, la biomasa se mezcla con las sustancias contenidas de pienso adicionales y a continuación se procesa para dar el pienso según la invención.

En el caso de que se realice una rotura celular previa, entonces esta se realiza preferiblemente tal como se describe en las solicitudes WO2014/122087 o WO2014/122092.

El procesamiento de la mezcla de biomasa y sustancias contenidas de pienso adicionales tiene lugar en una forma de realización preferida mediante un procedimiento de extrusión, para obtener porciones listas para la venta del producto alimenticio o pienso. Alternativamente puede utilizarse, por ejemplo, también un procedimiento de peletización.

Antes de la realización del procedimiento de extrusión se mezclan los componentes preferiblemente de manera estrecha entre sí. Esto tiene lugar preferiblemente en un tambor, que está equipado con paletas. En esta etapa de mezclado tiene lugar en una forma de realización preferida una inyección de vapor de agua, en particular para provocar el hinchamiento del almidón preferiblemente contenido. A este respecto, la inyección de vapor de agua se realiza preferiblemente a una presión de desde 1 hasta 5 bar, de manera especialmente preferible a una presión de desde 2 hasta 4 bar.

Las sustancias contenidas de pienso adicionales preferiblemente se trituran antes del mezclado con la biomasa de algas - siempre que sea necesario -, para garantizar que en la etapa de mezclado se obtenga una mezcla homogénea. La trituración de las sustancias contenidas de pienso adicionales puede tener lugar, por ejemplo, usando un molino de martillos.

La extrusión tiene lugar además preferiblemente con un aporte de energía de 12 - 28 Wh/kg, en particular de 14 - 26 Wh/kg, de manera especialmente preferible de 16 - 24 Wh/kg, sobre todo de 18 - 22 Wh/kg.

A este respecto, en el procedimiento de extrusión se utiliza preferiblemente una extrusora de husillo o de doble husillo. El procedimiento de extrusión se realiza preferiblemente a una temperatura de 80 - 220°C, en particular de 80 - 130°C, una presión de 10 - 40 bar y una velocidad de circulación ondular de 100 - 1000 rpm, en particular de 300 - 700 rpm. El tiempo de permanencia de la mezcla introducida asciende preferiblemente a 5 - 30 segundos, en particular a 10 - 20 segundos.

El extruido generado tiene preferiblemente un diámetro de desde 1 hasta 14 mm, preferiblemente de 2 a 12 mm, en particular de 2 a 6 mm, y presenta preferiblemente también una longitud de desde 1 hasta 14 mm, preferiblemente de 2 a 12 mm, en particular de 2 a 6 mm. La longitud del extruido se ajusta mediante la utilización de una herramienta de corte durante la extrusión. La longitud del extruido se selecciona preferiblemente de tal manera que corresponda

aproximadamente al diámetro del extruido. El diámetro del extruido se establece mediante la elección del diámetro de tamiz.

El procedimiento de extrusión puede comprender dado el caso una etapa de compactación y/o una de compresión.

Tras la extrusión tiene lugar preferiblemente el secado del extruido hasta un contenido de humedad de como máximo el 5% en peso, así como a continuación preferiblemente la carga del producto de extrusión con aceite. La carga con aceite puede tener lugar mediante la colocación del extruido en aceite o la pulverización del extruido con aceite, pero tiene lugar según la invención preferiblemente mediante recubrimiento a vacío.

La carga posterior del extruido con aceite tiene lugar según la invención preferiblemente hasta que en el producto se ajuste un contenido de grasa total del 15 - 35% en peso, preferiblemente del 20 - 30% en peso.

El pienso producido según el procedimiento según la invención se encuentra preferiblemente en forma de flóculos, en forma de bolas o en forma de pastillas. Un pienso que puede obtenerse mediante extrusión tiene preferiblemente un contenido de humedad de menos del 10% en peso, en particular menos del 5% en peso, de manera especialmente preferible del 0,2 al 4% en peso.

Por "masa seca" debe entenderse según la invención de manera correspondiente preferiblemente un producto, que presenta un contenido de humedad de menos del 10% en peso, en particular menos del 5% en peso.

Igualmente se describe un procedimiento para la cría de animales, caracterizado porque a estos se les administra un pienso según la invención.

Se describe en particular un procedimiento para aumentar el crecimiento de animales, caracterizado porque a estos se les administra el pienso producido según el procedimiento según la invención.

Además, se describe en particular igualmente un procedimiento para aumentar el porcentaje de ácidos grasos omega-3, en particular DHA, en el tejido muscular de animales, caracterizado porque a estos se les administra el pienso producido según el procedimiento según la invención.

Preferiblemente el pienso se administra al menos cada dos días, preferiblemente al menos una vez al día.

En el caso de los animales criados, que se alimentan con el pienso, se trata preferiblemente de aves de corral, cerdos o ganado vacuno.

Sin embargo, de manera especialmente preferible en el caso de los animales criados se trata de animales marinos, de manera especialmente preferible de peces de aleta o crustáceos. A estos pertenecen en particular carpas, tilapia, siluros, atún, salmón, truchas, barramundi, besugos, percas, bacalao, gambas, bogavante, camarones, quisquillas y cangrejos. De manera especialmente preferible, en el caso de los animales criados se trata de salmones. A este respecto, especies de salmón preferidas las representan el salmón del Atlántico, el salmón rojo, el salmón masu, el salmón real, el salmón keta, el salmón plateado, el salmón del Danubio, el salmón del Pacífico y el salmón jorobado.

En el caso de los animales criados puede tratarse en particular también de peces, que a continuación se procesan para dar harina de pescado o aceite de pescado. A este respecto, en el caso de los peces se trata preferiblemente de arenque, abadejo, lacha, anchoa, capelán o bacalao. La harina de pescado o el aceite de pescado así obtenido puede utilizarse a su vez en la acuicultura para la cría de pescados de mesa o crustáceos.

Sin embargo, en el caso de los animales criados puede tratarse también de seres vivos pequeños, que se utilizan en la acuicultura como pienso. En el caso de estos seres vivos pequeños puede tratarse, por ejemplo, de nemátodos, crustáceos o rotíferos.

La cría de los animales marinos puede tener lugar en estanques, tanques, cubas o también en áreas delimitadas en el mar o en lagos, en este caso en particular en jaulas o corrales de redes. La cría puede servir para criar el pescado de mesa final, pero también utilizarse para criar alevines, que se liberan a continuación para aumentar la población de peces salvajes.

En el caso de la cría de salmón tiene lugar preferiblemente en primer lugar la cría hasta el alevín de salmón en tanques de agua dulce o corrientes de agua artificiales y a continuación la cría adicional en el mar en jaulas o corrales de redes flotantes, die preferiblemente están anclados en bahías o fiordos.

En el caso del pienso producido según el procedimiento según la invención se trata de manera correspondiente preferiblemente de un pienso para su utilización en la cría de los animales mencionados anteriormente.

La biomasa de laberintúlidos utilizada según la invención, en particular la biomasa de *Aurantiochytrium sp.*, es preferiblemente el producto de un procedimiento de cultivo fermentativo y se obtiene de manera correspondiente

preferiblemente partiendo de un caldo de fermentación obtenido mediante la fermentación de estas algas. El caldo de fermentación que debe utilizarse según la invención para la obtención de la biomasa de algas comprende además de la biomasa que debe secarse preferiblemente componentes adicionales del medio de fermentación. En el caso de estos componentes puede tratarse en particular de sales, agentes antiespumantes y fuente de carbono y/o fuente de nitrógeno no transformada. Durante el secado se produce preferiblemente un producto, que presenta un contenido de células de al menos el 60% en peso, preferiblemente al menos el 65% en peso, en particular al menos el 70 o el 80% en peso, estando contenidos como componentes adicionales agentes antiaglomerantes añadidos, tales como, por ejemplo, ácidos silícicos, y dado el caso componentes adicionales del medio de fermentación, así como componentes liberados dado el caso parcialmente de las células. Los componentes adicionales del caldo de fermentación pueden separarse dado el caso parcialmente antes del secado de la biomasa, por ejemplo, mediante procedimientos de separación sólido-líquido, de modo que durante el secado se produzca un producto, que contenga estos componentes adicionales del caldo de fermentación, en particular sales, preferiblemente en una cantidad de como máximo el 20% en peso, en particular como máximo el 15, el 10 o el 5% en peso.

Procedimientos para la producción de biomasa que pueden utilizarse según la invención se describen detalladamente en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO91/07498, WO94/08467, WO97/37032, WO97/36996, WO01/54510). La producción tiene lugar por regla general porque se cultivan células en presencia de una fuente de carbono y de una fuente de nitrógeno en un fermentador. A este respecto pueden conseguirse densidades de biomasa de más de 100 gramos por litro y tasas de producción de más de 0,5 gramos de lípido por litro por hora. El procedimiento se realiza preferiblemente como un denominado procedimiento de alimentación por lotes, es decir que las fuentes de carbono y de nitrógeno se suministran de manera incremental durante la fermentación. La producción de lípido puede inducirse tras alcanzar la biomasa deseada mediante diferentes medidas, por ejemplo, mediante la limitación de la fuente de nitrógeno, de la fuente de carbono o del contenido en oxígeno o combinaciones de las mismas.

La fermentación de las células tiene lugar preferiblemente en un medio con baja salinidad, en particular para evitar la corrosión. Esto puede conseguirse porque en lugar de cloruro de sodio se usan sales de sodio libres de cloro, tales como, por ejemplo, sulfato de sodio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio o ceniza de soda, como fuente de sodio. Preferiblemente se utiliza cloruro en cantidades de menos de 3 g/l, en particular menos de 500 mg/l, de manera especialmente preferible menos de 100 mg/l, durante la fermentación.

Como fuente de carbono se tienen en cuenta fuentes de carbono tanto alcohólicas como no alcohólicas. Ejemplos de fuentes de carbono alcohólicas son metanol, etanol e isopropanol. Ejemplos de fuentes de carbono no alcohólicas son fructosa, glucosa, sacarosa, melaza, almidón y jarabe de maíz.

Como fuente de nitrógeno se tienen en cuenta fuentes de nitrógeno tanto inorgánicas como orgánicas. Ejemplos de fuentes de nitrógeno inorgánicas son nitratos y sales de amonio, en particular sulfato de amonio e hidróxido de amonio. Ejemplos de fuentes de nitrógeno orgánicas son aminoácidos, en particular glutamato, y urea.

Adicionalmente pueden añadirse también compuestos de fósforo inorgánicos u orgánicos y/o sustancias que estimulan el crecimiento conocidas, tales como, por ejemplo, extracto de levadura o agua de remojo de maíz, para influir positivamente en la fermentación.

En una forma de realización preferida, la cantidad de sulfato añadido durante la fermentación se selecciona de tal manera que en la biomasa resultante se ajuste con respecto a la masa seca un contenido en sulfato de al menos 25 g/kg, en particular de 25 a 60 g/kg, preferiblemente de 25 a 50, de 25 a 40 o de 25 a 35 g/kg.

El ajuste del contenido en sulfato en la biomasa resultante puede tener lugar de diferente manera.

Por ejemplo, en un denominado procedimiento por lotes puede disponerse previamente de manera completa la cantidad necesaria de sulfato ya al inicio. La cantidad de sulfato necesario puede calcularse fácilmente, dado que las células utilizadas para la formación de la biomasa asimilan el sulfato casi de manera completa.

En el caso de emplear un denominado procedimiento de alimentación por lotes puede dosificarse alternativamente la cantidad de sulfato necesario en el transcurso de la fermentación o disponerse previamente de manera correspondiente una parte del sulfato y dosificarse el resto en el transcurso de la fermentación.

En particular cuando en el transcurso de la fermentación se descubre que la cantidad de biomasa producida supera el valor calculado originariamente, mediante una dosificación posterior de sulfato puede garantizarse que la biomasa resultante contenga la cantidad preferida de sulfato.

Como sal de sulfato se usa preferiblemente sulfato de sodio, sulfato de amonio o sulfato de magnesio así como mezclas de los mismos.

El contenido en cloruro se encuentra durante la fermentación, con respecto al medio de fermentación líquido incluyendo la biomasa contenida, preferiblemente siempre por debajo de 3 g/kg, en particular por debajo de 1 g/kg, de manera especialmente preferible por debajo de 400 mg/kg de medio de fermentación.

5 Además de sulfatos y de cloruros dado el caso utilizados, durante la fermentación pueden utilizarse dado el caso también sales adicionales, en particular seleccionadas de carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, ceniza de soda o compuestos de fósforo inorgánicos.

10 Siempre que se usen sales adicionales, estas se utilizan preferiblemente en una cantidad, de modo que cada una se encuentre durante la fermentación, con respecto al medio de fermentación líquido incluyendo la biomasa contenida, en cada caso en una cantidad de menos de 10 g/kg, en particular menos de 5 g/kg, de manera especialmente preferible menos de 3 g/kg en el medio de fermentación.

15 El contenido en sales total en el medio de fermentación incluyendo la biomasa contenida se encuentra según la invención preferiblemente en el transcurso de toda la fermentación siempre por debajo de 35 g/kg, en particular por debajo de 30 g/kg. De manera especialmente preferible, el contenido en sales total se encuentra durante toda la fermentación, con respecto al medio de fermentación líquido incluyendo la biomasa contenida, entre 10 y 35 g/kg, en particular entre 12 y 30 g/kg.

20 El contenido en sulfato en el medio de fermentación incluyendo la biomasa contenida se encuentra según la invención preferiblemente en el transcurso de toda la fermentación siempre entre 5 y 16 g/kg.

25 Por "contenido en sulfato" debe entenderse según la invención el contenido total en sulfato, es decir el contenido en sulfato libre y unido, en particular unido orgánicamente. Debe partirse de la base de que la mayor parte del sulfato contenido en la biomasa se encuentra como componente de exopolisacáridos, que están implicados en la configuración de la pared celular de los microorganismos.

30 La determinación del contenido en sulfato tiene lugar según la invención preferiblemente mediante el cálculo del contenido en azufre de la biomasa obtenida, dado que la mayor parte del azufre contenido en la biomasa es atribuible al sulfato contenido. El azufre, que es atribuible a otras fuentes, es despreciable debido a la cantidad del sulfato contenido. Por consiguiente, a partir de la cantidad del azufre calculado puede calcularse sin problemas la cantidad de sulfato contenido.

35 A este respecto, el contenido en azufre de la biomasa se determina preferiblemente mediante análisis elemental según la norma DIN EN ISO 11885. Para el análisis del contenido en azufre de la biomasa se disgregan alícuotas correspondientes de la muestra antes del análisis preferiblemente con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno a 240°C a presión, para garantizar la accesibilidad libre del azufre contenido.

40 Por tanto, según la invención para la producción del pienso se utiliza preferiblemente una biomasa que contiene PUFA, que se caracteriza porque en esta, mediante análisis elemental según la norma DIN EN ISO 11885, puede demostrarse un contenido en azufre de desde 8 hasta 20 g/kg, con respecto a la masa seca. A este respecto, el contenido en azufre en la biomasa asciende preferiblemente a de 8 a 17 g/kg, en particular a de 8 a 14 g/kg, de manera especialmente preferible a de 8 a 12 g/kg, en cada caso con respecto a la masa seca.

45 El contenido en fósforo de biomasa utilizarse preferiblemente según la invención asciende según la invención, con respecto a la masa seca, preferiblemente a de 1 a 6 g/kg, en particular a de 2 a 5 g/kg. El contenido en fósforo se calcular de manera preferible igualmente mediante análisis elemental según la norma DIN EN ISO 11885.

50 La fermentación de las células tiene lugar preferiblemente a un valor de pH de desde 3 hasta 11, en particular de 4 a 10, así como preferiblemente a una temperatura de al menos 20°C, en particular de 20 a 40°C, de manera especialmente preferible de al menos 30°C. Un procedimiento de fermentación típico dura hasta aproximadamente 100 horas.

55 Las células se fermentan según la invención preferiblemente hasta una densidad de biomasa de al menos 50, 60 o 70 g/l, en particular de al menos 80 o 90 g/l, de manera especialmente preferible de al menos 100 g/l. A este respecto, los datos se refieren al contenido en biomasa seca con respecto al volumen total del caldo de fermentación tras la finalización de la fermentación. El contenido en biomasa seca se determina mediante la filtración de la biomasa fuera del caldo de fermentación, el posterior lavado con agua, después el secado completo - por ejemplo, en el microondas - y finalmente el establecimiento del peso seco.

60 Tras la finalización de la fermentación tiene lugar la recolección de la biomasa. Preferiblemente, tras la recolección de la biomasa o dado el caso también ya poco antes de la recolección de la biomasa tiene lugar una pasteurización de las células, para matar las células e inactivar las enzimas, que podrían promover la degradación de los lípidos. La pasteurización tiene lugar preferiblemente mediante el calentamiento de la biomasa hasta una temperatura de desde 50 hasta 121°C durante una duración de desde 5 hasta 60 minutos.

Igualmente, tras la recolección de la biomasa o dado el caso también ya poco antes de la recolección de la biomasa tiene lugar preferiblemente la adición de antioxidantes, para proteger la sustancia valiosa contenida en la biomasa frente a la degradación oxidativa. A este respecto, representan antioxidantes preferidos BHT, BHA, TBHA, etoxiquina, beta-caroteno, vitamina E y vitamina C. El antioxidante se añade, siempre que se utilice, preferiblemente en una cantidad de desde el 0,01 hasta el 2% en peso.

Dado el caso puede separarse ahora, antes del verdadero secado, ya una parte del medio de fermentación de la biomasa y con ello aumentar el porcentaje de sólidos. Esto puede tener lugar en particular mediante centrifugación, flotación, filtración, en particular ultra- o microfiltración, decantación y/o evaporación de disolvente. A este respecto, la evaporación de disolvente tiene lugar preferiblemente utilizando un evaporador rotatorio, un evaporador de capa delgada o un evaporador de película descendente en un proceso de una etapa o de múltiples etapas. Alternativamente se tiene en cuenta, por ejemplo, también la ósmosis inversa con el propósito de concentrar el caldo de fermentación.

En esta primera etapa opcional, pero realizada preferiblemente, tiene lugar preferiblemente una concentración del caldo de fermentación hasta un contenido en sólidos de al menos el 10 o el 15% en peso, preferiblemente de al menos el 20 o el 25% en peso, en particular del 10 al 50 o del 15 al 45% en peso, de manera especialmente preferible del 15 al 40% en peso o del 20 al 40% en peso.

Tras la concentración opcional del caldo de fermentación tiene lugar el secado de la biomasa, preferiblemente mediante secado térmico, de manera especialmente preferible mediante secado por pulverización, en particular secado por pulverización en boquilla, granulación por pulverización, granulación en capa turbulenta, en particular granulación en lecho fluido, o en un secador de tambor.

Alternativamente, la biomasa también puede someterse directamente tras la recolección sin una concentración previa a la etapa de secado, en particular cuando el caldo de fermentación obtenido presenta ya un alto contenido en sólidos, preferiblemente tal como se indicó anteriormente.

Mediante el secado de la biomasa esta se seca preferiblemente hasta una humedad residual de como máximo el 10% en peso, en particular del 0 al 10% en peso, de manera especialmente preferible como máximo el 8% en peso, en particular del 0,5 al 8% en peso, sobre todo como máximo el 6 o el 5% en peso, en particular del 0,5 al 6 o del 0,5 al 5% en peso.

El secado de la biomasa tiene lugar en una forma de realización especialmente preferida según la invención en un procedimiento de granulación en capa turbulenta o un procedimiento de secado por pulverización en boquilla, tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP13176661.0.

A la biomasa se le puede añadir durante el secado dado el caso ácido silícico como agente antiaglomerante, para llevarla a un estado que pueda manipularse mejor. El caldo de fermentación que contiene biomasa así como el ácido silícico se pulverizan para ello preferiblemente a la respectiva zona de secado. Alternativamente, la biomasa se mezcla preferiblemente solo después del secado con el ácido silícico. A este respecto se remite en particular también a la solicitud de patente EP13187631.0.

En una forma de realización preferida, una biomasa que debe utilizarse según la invención presenta tras el secado una concentración de ácido silícico, en particular de ácido silícico hidrófilo o hidrófobo, de desde el 0,2 hasta el 10% en peso, en particular del 0,5 al 5% en peso, sobre todo del 0,5 al 2% en peso.

Mediante el secado se obtiene preferiblemente un producto de partículas finas o de partículas gruesas, rociable, preferiblemente un granulado. Dado el caso, a partir del granulado obtenido puede obtenerse mediante tamizado o separación de polvo un producto con el tamaño de grano deseado.

Siempre que se haya obtenido un polvo de partículas finas rociable, este puede transformarse dado el caso mediante procedimientos de compactación o de granulación adecuados en un producto de grano grueso, fácilmente rociable, que puede almacenarse y que está en su mayor parte libre de polvo.

En esta granulación o compactación a continuación pueden utilizarse dado el caso adyuvante o portadores orgánicos o inorgánicos habituales tales como almidón, gelatina, derivados de celulosa o sustancias similares, que se usan habitualmente en el procesamiento de alimentos o de piensos como agentes aglutinantes, gelificantes o espesantes.

Por "rociable" debe entenderse según la invención un polvo, que puede derramarse sin obstáculos desde una serie de recipientes de descarga de vidrio con aberturas de salida de diferente tamaño al menos desde el recipiente con la abertura de 5 milímetros (Klein: Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

Por "de partículas finas" debe entenderse según la invención un polvo con un porcentaje predominante (> 50%) de un tamaño de grano de desde 20 hasta 100 micrómetros de diámetro.

Por “de grano grueso” debe entenderse según la invención un polvo con un porcentaje predominante (>50%) de un tamaño de grano de desde 100 hasta 2500 micrómetros de diámetro.

5 Por “libre de polvo” debe entenderse según la invención un polvo, que contiene únicamente porcentajes reducidos (< 10%, preferiblemente < 5%) de tamaños de grano por debajo de 100 micrómetros.

10 La determinación de los tamaños de grano o de partícula tiene lugar según la invención preferiblemente mediante métodos de espectrometría de difracción láser. Los métodos que deben emplearse se describen en el manual “Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis” de R.H. Müller y R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) así como en el manual “Introduction to Particle Technology” de M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998). Siempre que puedan emplearse diferentes métodos, se emplea preferiblemente el método que pueda emplearse mencionado en primer lugar del manual de R.H. Müller y R. Schuhmann para la medición del tamaño de partícula.

15 La biomasa obtenida mediante secado presenta preferiblemente un porcentaje de al menos el 80% en peso, en particular al menos el 90% en peso, de manera especialmente preferible al menos el 95% en peso, de partículas con un tamaño de grano de desde 100 hasta 3500 micrómetros, preferiblemente de 100 a 3000 micrómetros, sobre todo de 100 a 2500 micrómetros.

20 A este respecto, los productos utilizados según la invención de un procedimiento de granulación en capa turbulenta presentan preferiblemente un porcentaje de al menos el 80% en peso, en particular al menos el 90% en peso, de manera especialmente preferible al menos el 95% en peso, de partículas con un tamaño de grano de desde 200 hasta 3500 micrómetros, preferiblemente de 300 a 3000 micrómetros, sobre todo de 500 a 2500 micrómetros.

25 Por el contrario, los productos utilizados según la invención de un procedimiento de secado por pulverización presentan preferiblemente un porcentaje de al menos el 80% en peso, en particular al menos el 90% en peso, de manera especialmente preferible al menos el 95% en peso, de partículas con un tamaño de grano de desde 100 hasta 500 micrómetros, preferiblemente de 100 a 400 micrómetros, sobre todo de 100 a 300 micrómetros.

30 Los productos utilizados según la invención de un procedimiento de secado por pulverización y un procedimiento de granulación posterior presentan preferiblemente un porcentaje de al menos el 80% en peso, en particular al menos el 90% en peso, de manera especialmente preferible al menos el 95% en peso, de partículas con un tamaño de grano de desde 100 hasta 1000 micrómetros.

35 El porcentaje de polvo, es decir partículas con un tamaño de grano de menos de 100 micrómetros, se encuentra en la biomasa utilizada preferiblemente a como máximo el 10% en peso, en particular como máximo el 8% en peso, de manera especialmente preferible como máximo el 5% en peso, sobre todo como máximo el 3% en peso.

40 La densidad aparente de la biomasa utilizada se encuentra preferiblemente a de 400 a 800 kg/m³, de manera especialmente preferible a de 450 a 700 kg/m³.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Producción de la biomasa

45 **Ejemplo 1:** Producción de la biomasa mediante la fermentación de *Aurantiochytrium limacinum* SR21 en un medio con un alto contenido en sulfato y posterior secado de la biomasa

50 El cultivo de las células tuvo lugar durante aproximadamente 75 h en un procedimiento de afluencia usando un fermentador de acero con un volumen de fermentador de 2 litros con una masa inicial total de 712 g y una masa final total alcanzada de 1,3 - 1,5 kg. Durante el procedimiento se dosificó una disolución de glucosa (570 g/kg de glucosa) (“procedimiento de alimentación por lotes”).

55 La composición del medio inicial era tal como sigue:

Medio 1: 20 g/kg de glucosa; 4 g/kg de extracto de levadura; 16 g/kg de sulfato de sodio; 2 g/kg de sulfato de amonio; 2,46 g/kg de sulfato de magnesio (heptahidratado); 0,45 g/kg de cloruro de potasio; 4,5 g/kg de hidrogenofosfato de potasio; 0,1 g/kg de tiamina (HCl); 5 g/kg de disolución de elementos traza.

60 La composición de la disolución de elementos traza era tal como sigue: 35 g/kg de ácido clorhídrico (37%); 1,86 g/kg de cloruro de manganeso (tetrahidratado); 1,82 g/kg de sulfato de cinc (heptahidratado); 0,818 g/kg de EDTA sódico; 0,29 g/kg de ácido bórico; 0,24 g/kg de molibdato de sodio (dihidratado); 4,58 g/kg de cloruro de calcio (dihidratado); 17,33 g/kg de sulfato de hierro (heptahidratado); 0,15 g/kg de cloruro de cobre (dihidratado).

El cultivo tuvo lugar bajo las siguientes condiciones: temperatura de cultivo 28°C; tasa de aireación 0,5 vvm, velocidad de agitador 600 - 1950 rpm, control del valor de pH en la fase de crecimiento a 4,5 con ayuda de agua de amoníaco (25% v/v).

- 5 Tras el cultivo se calentaron los caldos de fermentación durante 20 minutos hasta 60°C para impedir una actividad adicional de las células.

10 A continuación, tuvo lugar un secado de dos etapas de la biomasa: en primer lugar se concentró el caldo de fermentación mediante evaporación hasta una masa seca de aproximadamente el 20% en peso. A continuación tuvo lugar secado por pulverización del caldo de fermentación concentrado usando un secador por pulverización Production Minor™ (GEA NIRO) con una temperatura de entrada del aire de secado de 340°C. Mediante el secado por pulverización se obtuvo así un polvo fino con una masa seca de más del 95% en peso.

15 Para la determinación del contenido en sulfato de la biomasa obtenida se determinó el contenido en azufre de la biomasa según la norma DIN ISO 11885. Para ello se disgregó una alícuota de la biomasa en primer lugar con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno a 240°C a presión. El contenido en azufre calculado se encontraba a 11 g/kg de biomasa, lo que corresponde a un contenido en sulfato de 33 g/kg de biomasa.

20 **Ejemplo 2: Producción de los piensos**

Mediante extrusión se produjeron en cada caso piensos, que, con respecto a la masa seca, presentan el 42,5% en peso de proteína total y el 24% en peso de lípido total, así como un tamaño de pellet de 3 mm.

25 Se produjeron en total tres formulaciones de pienso diferentes (Dieta 1, 2 y 3). La formulación de control "Dieta 1" contenía el 11,0% en peso de aceite de pescado. En la formulación "Dieta 2" se sustituyó el aceite de pescado parcialmente (aproximadamente el 50%) por biomasa de *Aurantiochytrium sp.*, al añadirse el 9,1% en peso de biomasa y reducirse para ello la cantidad de aceite de pescado hasta el 5,5% en peso. En la formulación "Dieta 3" se sustituyó el aceite de pescado completamente por biomasa de *Aurantiochytrium sp.*, al añadirse el 16% en peso de biomasa y aumentarse al mismo tiempo la cantidad de aceite de colza del 8,2 al 9,9% en peso. Las diferencias en el peso total se compensaron mediante la cantidad de trigo añadido.

Los componentes individuales del pienso se exponen en la siguiente tabla.

Tabla 1: Formulaciones usadas en la cría

Componentes (g kg ⁻¹)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Biomasa de <i>Aurantiochytrium</i>	0,0	91,6	160,0
SPC	229,0	229,0	229,0
Harina de pescado	150,0	150,0	150,0
Trigo	147,6	111,0	80,5
Aceite de pescado	110,0	55,0	0,0
Gluten de trigo	100,0	100,0	100,0
Concentrado de proteína de guisante	100,0	100,0	100,0
Aceite de colza	82,0	82,0	99,1
Fosfato de monosodio	20,0	20,0	20,0
Mezcla de vitaminas	20,0	20,0	20,0
Lecitina de soja	10,0	10,0	10,0
L-lisina (50% en peso)	10,0	10,0	10,0
Betafine	9,4	9,4	9,4
Mezcla de minerales	5,2	5,2	5,2
L-histidina (98% en peso)	4,2	4,2	4,2
DL-metionina (99% en peso)	2,0	2,0	2,0
Carop. Pink (10% en peso)	0,50	0,50	0,50
Óxido de itrio	0,10	0,10	0,10

Los componentes individuales se mezclaron - con excepción de los aceites - estrechamente entre sí y a continuación usando una extrusora de doble husillo (Wenger TX 52, Wenger, EE. UU.) mediante el empleo de una boquilla de salida con un diámetro de 2 mm se produjo un extruido. Los extruidos se secaron aproximadamente 1 hora en un secador de carrusel (Paul Klöckner, Verfahrenstechnik GmbH, Alemania) a 65°C hasta un contenido en agua de desde el 7 hasta el 8% en peso. A continuación, se secaron los extruidos durante la noche a temperatura ambiente, antes de aplicar los aceites mediante recubrimiento a vacío (Dinnissen, Sevenum, Países Bajos).

Ejemplo 3: Experimentos de alimentación

Para la realización de los experimentos de alimentación se alimentaron en cada caso tres recipientes, que contenían salmones jóvenes con un peso de en promedio 83,6 g con un peso total de salmón de 4 kg por recipiente, con cada una de estas formulaciones durante en total 12 semanas.

El peso total de salmón por recipiente aumentó en este tiempo de 4 kg a 15-17 kg por recipiente. A este respecto, los peces consumieron de 8 a 11 kg de pienso por tanque, lo que corresponde a una tasa de conversión de pienso (FCR) de desde 0,8 hasta 0,9 kg de pienso por kg de pescado.

Los resultados de los experimentos de alimentación se exponen en la siguiente tabla.

Tabla 2: Incremento de peso de los peces en función de la dieta

Dieta	Peso final [g]
1	331
2	362
3	339

En general se estableció que tanto en el caso de la sustitución completa como en el caso de la sustitución parcial del aceite de pescado por la biomasa de *Aurantiochytrium sp.* podía conseguirse un aumento del crecimiento de los salmones.

De manera interesante, en el caso de la sustitución parcial del aceite de pescado por la biomasa de *Aurantiochytrium sp.* se consiguió un mayor crecimiento de los salmones que en el caso de la sustitución completa por la biomasa de *Aurantiochytrium sp.*

A este respecto se estableció que los peces, que se alimentaron con la formulación de control Dieta 1, con un peso final de en promedio 331 g presentaban un peso claramente menor que los peces, que se alimentaron con las formulaciones Dieta 1 o 2. A este respecto, tuvieron un mejor resultado los peces que se alimentaron con la formulación Dieta 2: alcanzaron un peso final claramente aumentado de en promedio 362 g.

Ejemplo 4: Aprovechamiento de los ácidos grasos por parte del pescado

Para el cálculo del aprovechamiento de los ácidos grasos tuvo lugar la comprobación de lípidos usando el método de extracción de Bligh y Dryer y el análisis de ácidos grasos a continuación según AOCS Ce 1b-89. Se analizaron tanto muestras de músculo como muestras de salmón total. A este respecto se obtuvieron los resultados expuestos en las siguientes tablas (se indica en cada caso la cantidad de grasas calculadas al inicio o tras el final de la dieta en gramos en cada caso con respecto a 100 g de grasa total).

Tabla 3: Perfiles de ácidos grasos de muestras de músculo de salmón en función de la dieta

Dieta	PUFA	Ácidos grasos omega-3	DHA
Inicio	41,6	32,7	22,1
1	31,8	19,0	10,1
2	35,3	21,7	14,2
3	38,0	22,8	16,4

Tabla 4: Perfiles de ácidos grasos de muestras de salmón total en función de la dieta

Dieta	PUFA	Ácidos grasos omega-3	DHA
Inicio	32,5	22,4	12,5
1	29,9	17,2	9,0
2	32,6	18,8	11,5
3	35,2	19,6	13,1

Puede observarse que ya en el caso de la sustitución parcial del aceite de pescado por la biomasa de *Aurantiochytrium* sp. podía alcanzarse un claro aumento del contenido en PUFA, ácidos grasos omega-3 y DHA. En el caso de la sustitución completa del aceite de pescado por la biomasa de *Aurantiochytrium* sp., el aumento del contenido en PUFA es correspondientemente mayor.

Ejemplo 6: Determinación del contenido en grasas del hígado de salmón

En cada caso se alimentaron 3 salmones jóvenes durante en cada caso 9 semanas con las diferentes formulaciones Dieta 1, 2 y 3 y a continuación para la determinación del contenido en grasas se extirpó el hígado de los salmones. La extracción de grasa tuvo lugar según el método de Folch (1957; J. Biol. Chem., 226 (1), 497-509). El contenido en grasa se determinó a continuación mediante un método gravimétrico.

Se descubrió que debido a la presencia de la biomasa en comparación con la alimentación sin biomasa podía reducirse el contenido en grasa en el hígado del 8% en peso significativamente hasta el 4-5% en peso.

La acumulación de grasa en el hígado se considera una señal de un desequilibrio del metabolismo de alimentos y en particular también como indicación de estrés oxidativo. Por consiguiente, la clara reducción del porcentaje de grasa en el hígado es una indicación clara de la reducción de estrés y por consiguiente de la mejora del estado de salud de los salmones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la producción de un pienso, **caracterizado porque** en la producción se utilizan aceite de animales marinos en una cantidad de desde el 1 hasta el 12% en peso, una biomasa de laberintúlidos, con respecto a la masa seca, en una cantidad de desde el 2 hasta el 20% en peso, así como harina de animales marinos en una cantidad de desde el 5 hasta el 25% en peso.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las células de laberintúlidos se seleccionan de la familia de *Thraustochytriaceae*, de manera especialmente preferible de los géneros *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium* y *Ulkenia*, sobre todo de la especie *Aurantiochytrium limacinum*.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la biomasa se utiliza, con respecto a la masa seca, en una cantidad de desde el 3 hasta el 18% en peso, en particular del 5 al 15% en peso, sobre todo del 7 al 11% en peso.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el aceite de animales marinos y la biomasa de laberintúlidos se utilizan, con respecto a la masa seca, en la relación en peso de desde 2:1 hasta 1:5, en particular de 3:2 a 1:4, de manera especialmente preferible de 1:1 a 1:3, sobre todo en la relación de aproximadamente 2:3.
- 25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se utiliza aceite de animales marinos, en particular aceite de pescado, en una cantidad de desde el 2 hasta el 8% en peso, de manera especialmente preferible del 3 al 7% en peso.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el pienso resultante presenta un contenido en proteínas total de desde el 30 hasta el 60% en peso, preferiblemente del 35 al 55% en peso, en particular del 40 al 50% en peso, y un contenido en grasas total de desde el 15 hasta el 35% en peso, preferiblemente del 18 al 32% en peso, en particular del 20 al 30% en peso, sobre todo del 22 al 28% en peso.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se utiliza harina de animales marinos, preferiblemente harina de pescado, en una cantidad de desde el 10 hasta el 20% en peso, de manera especialmente preferible del 12 al 18% en peso, con respecto a la masa seca.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el pienso resultante contiene ácidos grasos omega-3 en una cantidad total de desde el 0,5 hasta el 5,0% en peso, preferiblemente del 2,0 al 4,0% en peso, y DHA en una cantidad de desde el 0,25 hasta el 3,0% en peso, preferiblemente del 1,0 al 2,5% en peso.