



P A T E N T E      253338  
D E  
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION MICROBIOLOGICA DE CAROTENOIDES", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN - LA ROCHE & Cie. Société Anonyme, domiciliada en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Los carotenoides constituyen una clase de compuestos altamente coloreados que fluctúan del matiz amarillo al rojo, los cuales están extensamente dispersados en la naturaleza. Muchos de los carotenoides, en forma aislada, son útiles como agentes colorantes a causa de su fuerte poder de pigmentación, o por sus propiedades de fomentar el desarrollo y/o la actividad de la vitamina A. Los xantófilos, carotenoides que contienen oxígeno, son de interés particular.

Es un objeto de esta invención proporcionar un procedimiento por medio del cual los carotenoides, y especial-



253338

mente los xantófilos, pueden ser producidos con alto rendimiento en escala práctica por medios microbiológicos. También es un objeto de esta invención proporcionar materiales que contienen carotenoides, los cuales pueden ser usados como agentes colorantes y composiciones conteniendo tales materiales portadores de carotenoide. Es un objeto especial de esta invención, proporcionar materiales ricos en xantófilos.

5.

Según esta invención los carotenoides, y particularmente los xantófilos, pueden ser producidos por medios microbiológicos, en los que organismos particularmente adaptables son cultivados bajo condiciones que estimulan la producción de los pigmentos con alto rendimiento. Se ha encontrado que hongos de la familia Dacrymycetaceae, constituyen un grupo de organismos que son especialmente adaptables a la producción de altos rendimientos de xantófilos, bajo condiciones adecuadamente controladas. Las Dacrymycetaceae de interés en esta invención, son aquellos hongos de la familia según la clasificación de G.W. Martin, "Revision of the North Central Tremellales", Study Series No. 423, Univ. Iowa Stud. Nat. Hist. 19, 1-122 (1952), e incluyen géneros como las Dacrymyces, Dacryomitra, Dacryopinax, Guepiniopsis, Femsjonia, Calocera, etc. Diversas especies caen dentro de los respectivos géneros, por ejemplo las Dacrymyces deliquescens, Dacrymyces ellisii, Dacrymyces palmatus, Dacrymyces minor, Dacryomitra nuda, Dacryopinax spathularia, Dacryopinax elegans, Guepiniopsis torta, Femsjonia luteocalba, Ditiola radicata, Calocera cornea, etc.

10.

15.

20.

25.

30.

Se ha encontrado también que las condiciones de fermentación y particularmente la composición del medio nutritivo, son especialmente importantes en la producción eficaz de



253338

- rendimientos prácticos de carotenoides. El método para la producción de material rico en carotenoides y particularmente en xantófilos, según esta invención, requiere ciertas condiciones mínimas para la operación escalonada práctica. Este método comprende el cultivo de un hongo de la familia Dacrymycetaceae, en cultivo sumergido en un medio acuoso conteniendo una fuente de nitrógeno orgánico asimilable, una fuente de nitrógeno amónico, una fuente metabolizable de carbono, una fuente metabolizable de fósforo y minerales trazadores, mientras se mantiene el cultivo bajo condiciones de aeración y agitación, y sometiendo el material fúngico a radiación en el espectro visible. La composición del medio nutritivo es responsable del buen desarrollo fúngico y da por resultado una producción substancial de carotenoide, y particularmente de material rico en xantófilo. El desarrollo del organismo, sin producción substancial de pigmento, es reducido al mínimo.

- El procedimiento descrito antes conduce a rendimientos de escala práctica de xantófilos como ceaxantina, cantaxantina, criptoxantina, violaxantina, torulena, torularrodina y rodotorulina, los cuales son de interés particular, así como a otros de la clase. Se apreciará que el beta-caroteno y otros carotenos son también producidos por el procedimiento.

- Se ha encontrado que las condiciones bajo las cuales el hongo de la familia Dacrymycetaceae es cultivado, así como la composición del medio nutritivo, son críticas para la producción de pigmentos elevados.

- El procedimiento de fermentación debe ser efectuado bajo condiciones de cultivo sumergido. Es decir, el orga-



253338

nismo es desarrollado en un medio líquido, con agitación y proporcionando un suministro adecuado de oxígeno.

- La oxigenación y agitación continuada son requeridas durante el procedimiento de fermentación con cada uno de los
5. organismos. El desarrollo micélico es mucho más prolífico, cuando el medio de cultivo es agitado y mantenido en movimiento. La oxigenación puede ser realizada por la introducción de aire, preferiblemente estéril, a través de una unidad que proporciona buena dispersión y que produce pequeñas
10. burbujas. Esto puede ser efectuado mediante el paso de aire comprimido a través de tubos o láminas perforados, distribuidores de gas a base de cerámica porosa u otros medios convencionales, situados dentro del medio de fermentación. Las
15. proporciones de aeración variarán, dependiendo de la técnica empleada, aunque proporciones dentro del orden de alrededor 0,1 a 2,5 volúmenes de aire por minuto por unidad de volumen de cultivo líquido, generalmente, será suficiente. La aeración, a una proporción adecuada, es mantenida a través de todo el ciclo de fermentación.
20. Hay que proporcionar agitación, por cualquier medio conveniente. Puede ser suministrada por hoja de agitador del tipo áncora o rastrillo o por una rueda de paletas de alta velocidad del tipo turbina, o haciendo circular la masa a agitar a través de bombas que transportan el líquido de
25. una posición a otra. El orden de agitación tendrá que ser suficientemente alto para dar una dispersión a fondo sin producir, no obstante, una indebida maceración del tejido fúngico. Preferimos conducir la fermentación completamente en un medio acuoso contenido en un recipiente cerrado, acoplado
30. con un dispositivo dispersor de aire y una rueda de paletas

253338



convencional que opera a velocidades de árbol de alrededor de 50 a 400 r.p.m.

5. Se ha encontrado que la irradiación con energía electromagnética, dentro del orden de longitud de onda de alrededor de 3200 a 7600  $\text{A}^\circ$ , durante el desarrollo del crecimiento fúngico, es necesaria para obtener la producción máxima de pigmento. No es necesario irradiar continuamente. Es esencial solamente durante las fases finales del desarrollo del cultivo, por ejemplo el 30-50% final del período de incubación.
10. No obstante, la irradiación durante el período de incubación entero puede ser practicada para adelantar y puede ser intermitente. Cada especie de organismo tiene sus exigencias de radiación propias para la producción máxima, pero éstas caen dentro del orden mencionado antes y puede ser fácilmente determinadas. La intensidad lumínica puede ser del orden de alrededor de 5 a 1000 bujías-pie.
- 15.

- No solamente la producción total de xantófilos es afectada por la radiación, sino que también la proporción de xantófilos al total de carotenoides producidos por cada organismo está sujeta a variación de acuerdo con la longitud de onda usada para la irradiación. Por ejemplo, con las Dacrymyces deliquescens, la longitud de onda que resulta con la más alta proporción de xantófilos al total de carotenoides es la de luz verde, o de alrededor 5300  $\text{A}^\circ$ . El más alto rendimiento total de xantófilos ocurre con la luz de color rosa alrededor 6200  $\text{A}^\circ$ . Con la Dacryopinax spathularia, el más alto rendimiento de xantófilos, así como la más alta proporción de xantófilos al total de carotenoides, ocurre con luz de alrededor 5800  $\text{A}^\circ$ .
- 20.
- 25.

30. La nutrición del organismo es un factor importantísi

253338



mo. Una fuente de nitrógeno orgánico asimilable, nitrógeno amónico, una fuente metabolizable de carbono, una fuente metabolizable de fósforo y minerales trazadores representan las exigencias mínimas, como queda indicado anteriormente.

5. Otros substratos nutritivos pueden ser añadidos para adelantar, como más detenidamente es tratado más abajo. Estos substratos nutritivos deberán estar presentes en las siguientes proporciones: nitrógeno orgánico de 0,025 a 2,5 g de nitrógeno por litro de medio; nitrógeno amónico - 0,025 a 2,0 g de nitrógeno por litro de medio; carbono metalizable - 1 a 80 g por litro de medio; fósforo - 0,1 a 2 g por litro; y minerales trazadores, es decir, zinc, magnesio y hierro, 1 a 500 mg por litro de medio.
- 10.

- Los substratos nutritivos pueden ser todos añadidos en la iniciación del proceso de fermentación, o pueden ser añadidos por porciones en varias fases, a medida que la fermentación va progresando.
- 15.

- Los aminoácidos son las fuentes preferidas de nitrógeno orgánico asimilable. Así, pueden ser empleadas serina, lisina, leucina, isoleucina, arginina, ácido aspártico, triptofana, prolina, treonina, metionina, cistina, cisteína, fenilalanina, tirosina, histidina, valina, glicina, alanina, hidroxiprolina, homoserina, alohidroxiprolina, etionina, asparagina, ácido glutámico, glutamina, etc., solas o en combinaciones. Son preferidos, el ácido glutámico, una sal de glutamato, o glicina. La incorporación de la l-triptofana en un medio que contiene ácido glutámico es particularmente efectiva.
- 20.
- 25.

- El hidróxido amónico o las sales amónicas, como por ejemplo el nitrato amónico, sulfato amónico, tartrato amóni-
- 30.



253338

co, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico, etc., pueden ser usados como fuentes de nitrógeno amónico. El nitrato amónico es preferido.

5. La urea y la acetamida son también fuentes adecuadas de nitrógeno.

10. El carbono asimilable para el medio nutritivo se obtiene mejor de los hidratos de carbono, aunque otras fuentes, como proteínas, proteínas hidrolizadas, lípidos, etc., pueden también ser usadas. Los carbohidratos, como la glucosa, sacarosa, azúcar invertido, maltosa, fructosa, xilosa, arabinosa, celobiosa, melicitosa, galactosa, glicerol, azúcar crudo, melazas de banda negra, melazas invertidas, manitol, sorbosa, lactosa, celulosa, almidón, amilosa, y dextrinas, todos favorecen el crecimiento y la producción de pigmento.

15. Son preferidos, la glucosa, la sacarosa y el azúcar invertido.

20. Pequeñas cantidades de fósforo son también esenciales para el crecimiento. Este puede ser suministrado en la forma de fosfatos inorgánicos, tal como fosfato de ácido potásico, fosfato disódico, o similares, en las cantidades antes especificadas. Los metales trazadores zinc, magnesio e hierro, en cantidades de alrededor 0,1 a alrededor 50 mg %, deben estar presentes para que tenga lugar el crecimiento en una escala práctica. Estos pueden ser introducidos como sales inorgánicas, como complejos organometálicos, o como metal ligado orgánicamente.

25. Otros metales como el calcio, boro, cobre, manganeso y molibdeno, son también estimuladores y pueden también ser incluidos en cantidades trazadoras.

30. La vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), en pequeñas cantidades, puede también ser incluida en el medio con buen efecto. La vi-

253338



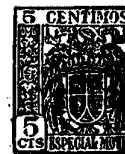
5. tamina B<sub>1</sub> puede ser obtenida de cualquier fuente de material que presenta actividad de vitamina B<sub>1</sub>, por ejemplo de substancias puras, como el clorhidrato de cloruro de tiamina, el bromhidrato de bromuro de tiamina, el nitrato de tiamina, sulfato de tiamina o mezclas brutas, incluyendo materiales naturales de origen biológico que contienen estas substancias.

10. La adición al medio, en pequeñas cantidades de otras diferentes vitaminas y agentes similares, como el ácido pantoténico, riboflavina, niacina, inositol, ácido p-aminobenzoico, biotina, piridoxina, ácido fólico, ácido tióctico y vitamina B<sub>12</sub>, separadamente o en combinaciones, produce una cantidad variada de estimulación de crecimiento y producción de pigmento con diferentes hongos.

15. Para determinados organismos, la adición de pequeñas cantidades de proteína o proteína hidrolizada es también estimuladora. Por ejemplo, con Dacrymyces deliquescens, la adición de 0,05 al 1% de albúmina de leche hidrolizada o no hidrolizada, sólidos de leche desnatada, proteína de habas de soja, proteína de semillas de algodón, caseína, levadura, materias solubles secadas en destiladores, agua de remojo de maíz, proteína de trigo, raspaduras de carne, comida de pescado u otros productos vegetales o animales estimulan aún el crecimiento y la producción de pigmento.

25. Mientras que cada uno de los organismos muestra una respuesta individual con respecto al máximo crecimiento y producción de pigmento a medios nutritivos particulares, un medio nutritivo teniendo una composición como sigue en general produce buenos resultados :

253338



<u>Componente</u>	<u>Concentración por ciento (W/V).</u>	<u>Concentración preferida por ciento (W/V).</u>
Glucosa	0.2-10	1.5-5
Licor de remojo de maiz	0.02-2	0.3
5. Levadura hidrolizada por enzima	0.01-1	0.1-0.2
Acido glutámico	0.02-1	0.1-0.2
Vitamina B <sub>1</sub>	0.05-5.0 mg %	0.2-0.5 mg %
Fosfato de ácido potásico	0.05-1	0.10-0.20
Sulfato magnésico	0.05-1	0.10-0.20
10. Nitrate amónico	0.02-1	0.1-0.2

Otra composición que da buenos resultados es la siguiente :

<u>Componente</u>	<u>Concentración por ciento (W/V).</u>
Glucosa	3.5
Licor de remojo de maiz	0.3
15. Fosfato diamónico	0.2
Fosfato de ácido potásico	0.15
Sulfato magnésico	0.15
Cloruro potásico	0.10
Lactalbúmica hidrolizada por enzima	0.10
20. Proteína de haba de soja hidrolizada por enzima	0.10
Pantotenato cálcico	1 mg.

Los rendimientos máximos generalmente son alcanzados en 90 a 144 horas, aunque es ocasionalmente ventajoso prolongar el tiempo de fermentación hasta unas 240 horas. El periodo de fermentación que proporciona resultados óptimos pa-



253338

ra un organismo particular puede ser determinado por frecuente toma de muestras del cultivo.

5. La temperatura óptima para el crecimiento y la producción de carotenoide varía algo para cada organismo. Sin embargo, una temperatura del orden de los 20° a los 32° C, preferiblemente de 25° a 28° C, en general da una buena repercusión.

10. Es preferible empezar la fermentación a un pH inicial de alrededor 6. Durante la fermentación, se acumulan ácidos los cuales reducen el pH a alrededor de 2,1 a alrededor de 2,5. Aunque tal bajo pH no es particularmente perjudicial para el crecimiento fúngico y formación del pigmento, es altamente corrosivo para el equipo metálico. Por consiguiente, es usualmente ventajoso mantener el pH del cultivo dentro el orden de alrededor 3,5 a alrededor 5,5 por medio de adición por porciones o continua de un álcali, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido cálcico, hidróxido amónico, carbonato sódico, carbonato potásico, etc. En general, un pH dentro del orden de alrededor 2,1 a alrededor 8,5 no impide la fermentación.

15. Los cultivos de los organismos de la familia Daecrymycetaceae pueden ser mantenidos durante largos períodos sobre sesgos de agar a base de agar de extracto de malta de la composición siguiente :

	Concentración por ciento (W/V).
25. Extracto de malta (Difco)	1.5
Peptona (Difco)	0.7
Agar	2.0
Vitamina B <sub>1</sub>	0.5 mg. %
pH antes de la esterilización	6.0



253338

El inoculado para la fermentación puede ser preparado desde la superficie de crecimiento sobre sesgos de agar por pulverización de la superficie de crecimiento de una fina pulpa con alrededor de 10 a 15 ml de agua destilada estéril, por ejemplo en un homogeneizador de tejido. Alrededor de 25 a 50 ml de la suspensión finamente homogeneizada de tejido micélico es entonces transferida a una gran botella que contiene, por ejemplo, alrededor de 6 litros de caldo de inoculación que tiene la composición aproximada siguiente :

	<u>Concentración por ciento (W/V).</u>
10. Melazas de ensayo elevado	3.6
Caseína hidrolizada	1.0
Agua de remojo de maiz	0.5
Acetato amónico	0.2
Fosfato de ácido potásico	0.1
15. pH ajustado a 5,5-6,0 con álcali diluído antes de la esterilización.	

El medio, previamente a la introducción de la suspensión que contiene el tejido fúngico, es esterilizado mediante autoclave a 120°C durante unos 15 minutos, siendo después enfriado.

Después de inoculación, el recipiente de medio de inoculación es dejado reposar a 28°C e incubar bajo una iluminación difusa durante unos 2 a 3 días de incubación tranquila. Luego la incubación es continuada durante 2 a 3 días a la misma temperatura bajo irradiación continua, aeración y agitación. Un crecimiento filamentosos denso, de color amarillo profundo a naranja rojizo, se desarrolla en el medio, el cual está dispuesto para ser usado como inoculador.

La fermentación se efectúa entonces en grandes reci-

253338



5. pientes que contienen medio nutritivo, como queda descrito anteriormente. El agente fermentador es inoculado con alrededor de 3 gal. a alrededor de 10 gal. del medio de inoculación sumergido, preparado como se ha descrito antes, por 100 gal. de medio de fermentación. La fermentación es efectuada bajo condiciones de aeración, agitación e irradiación según queda descrito anteriormente.

10. A la terminación del período de fermentación el micelio puede ser separado del medio de fermentación por decantación, centrifugación o filtración. El micelio, rico en carotenoide, puede ser entonces secado por liofilización, secado por atomización, secado por cilindros, secado por aire caliente o por otros medios convenientes.

15. Los xantófilos y también los carotenos producidos por los hongos pueden ser usados sin separarlos del tejido fúngico o pueden ser recuperados y usados como un concentrado. Para mezcla en alimentos para animales y aves de corral es preferible emplear todo el micelio secado, obtenido como queda descrito antes, como vehículo de los pigmentos de carotenoide.

20. En este caso, el tejido secado es reducido a un estado finamente dividido por trituración en un molino machacador, molino de bola, molino de trituración u otro dispositivo similar, y una cantidad menor del tejido molido es mezclado a fondo con una proporción mayor de un alimento como los alimentos disponibles comercialmente para animales, masa macerada para crecimiento de polluelos, masa macerada ponedora, masa macerada lechera, masa macerada para crecimiento de pavos, etc.

30. Si se desea un producto más concentrado, el micelio que contiene xantófilo puede ser extraído con disolventes or



253338

gánicos como metanol, acetona, cloroformo, benceno, u otro disolvente orgánico o combinación de disolventes para separar los pigmentos. Por evaporación del disolvente, puede recuperarse un concentrado oleaginoso siruposo o un concentrado sólido seco. Este concentrado puede ser mezclado con, y adsorbido en, una ración de alimento básico, o sea usado para otras finalidades.

- 5.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención. Los cultivos de los organismos han sido depositados en la colección de microorganismos de la American Type Culture Collection, de Washington, D.C., donde se les ha dado las indicaciones citadas.

10.

EJEMPLO 1.

Largos sesgos de agar a base de agar de extracto de malta son preparados en tubos de ensayo de 33 x 200 mm. El agar tiene la composición siguiente :

15.

gramos por litro

Extracto de malta Difco	15
Peptona Difco	7
Agar	20
20. pH antes de la esterilización	6.0

Estos sesgos de agar son inoculados con un cultivo de Dacrymyces deliquescens, ATCC No. 13292, y dejados incubar a 25-28°C en luz difusa durante 10 a 15 días. Durante este tiempo la superficie del sesgo entera queda cubierta con napa de una vegetación rugosa, de color amarillo profundo subido a naranja.

25.

El crecimiento de un sesgo de agar conteniendo un cultivo de Dacrymyces deliquescens es homogeneizado con alrededor 10-15 ml de agua destilada estéril en un homogeneiza-

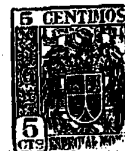
253338



dor de tejido de vidrio. Seis litros del medio que tiene la siguiente composición, son añadidos a cada una de dos botellas de 9 litros :

	<u>gramos por litro</u>
	36
5. Melazas de ensayo elevado	10
Caseína hidrolizada	5
Agua de remojo de maíz	2
Acetato amónico	1
Fosfato de ácido potásico	
pH ajustado a 5,5-6,0 con álcali diluído	
10. 10 ml de un agente desespumador a base de aceite de manteca de cerdo son añadidos a cada botella para controlar la formación de espuma. Los fermentadores de la botella son ajustados con conexiones para inoculación, aeración, ventilación y para sacar muestras. Las juntas que contienen el medio descrito antes, son esterilizadas por autoclave a 120°C durante 30 minutos.	

Una vez enfriadas, cada botella es inoculada con una cantidad de suspensión homogeneizada equivalente a la vegetación derivada de la mitad de un sesgo. Cada botella entonces es dejada permanecer en reposo durante 48 a 72 horas a 28°C bajo irradiación difusa. Después del período de incubación reposada inicial, la aeración es iniciada y continuada invariablemente a alrededor de 5 litros por minuto durante 48 a 72 horas adicionales. Durante el período de incubación aerada, cada botella es irradiada con luz de intensidad de alrededor de 250 bujías-pie, producida por una válvula incandescente de 500 w. Después de un total de 4 a 6 días de incubación, la vegetación se hace densa y filamentosa y vira de un color amarillo profundo a naranja rojizo y queda lista



253338

para su uso como medio inoculador.

Dos botellas de medio inoculador (12 litros del volumen total) son transferidas asépticamente en 220 litros de medio de fermentación estéril, conteniendo en un fermentador

5. de 300 litros, y que tiene la composición siguiente:

	Cerelesa	3.5%
	Licor de remojo de maíz	0.3%
	Glutamato sódico	0.2%
	Nitrato amónico	0.2%
10.	Levadura hidrolizada por enzima	0.15%
	Fosfato de ácido potásico	0.15%
	Sulfato magnésico	0.10%
	Tiamina	0.1 mg%
15.	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.025
	pH ajustado a 5.5	

50 ml de agente desespumante de silicona son añadidos y el fermentador es esterilizado durante 20 minutos a 120°C. El contenido del fermentador es iluminado con dos lámparas de vapor de mercurio de 400 w, colocadas en pozos que se extienden a través de la tapa en el interior del fermentador.

Después de las primeras 24 horas de fermentación, el fermentador es iluminado continuamente, aerado y agitado durante 168 horas. Se suministra aire al fermentador en una proporción de 5 a 25 pies cúbicos por minuto y se hace funcionar el agitador a una velocidad de 60 r.p.m. La temperatura es mantenida desde el principio al fin a 25-28°C.

El caldo fermentado luego es colocado en una centrifuga de cesto y el material sólido es recogido. Se recupera



253338

ran 12 kg de micelio húmedo.

- 10 kg de micelio húmedo, recientemente filtrado de la fermentación y equivalente a alrededor de 2 kg de sólidos secos, son mezclados a fondo con 20 litros de agua del grifo y molidos a una pulpa fina en un molino coloidal. El micelio molido es separado por filtración en un embudo de porcelana y transferido a un recipiente que contiene 40 litros de acetona. Después de agitación durante alrededor de 8 horas, la acetona es separada por filtración y reemplazada por 40 litros de acetona fresca. La masa es agitada durante 8 horas más y la acetona es separada y reemplazada por 20 litros de acetona fresca. La porción es filtrada de nuevo y los filtrados de acetona, coloreados profundamente, son encharcados. Los sólidos extraídos, que ahora son casi incoloros, son depuestos.

- Los extractos de acetona encharcada son reducidos a alrededor de 20 litros por evaporación a baja temperatura en un evaporador de bandeja al vacío. Este concentrado entonces es colocado en una vasija de extracción, diluido con alrededor de 50 litros de agua, y extraído dos veces con porciones de 20 litros de una fracción de hexano-n (Skellysolve B). El extracto es secado con sulfato sódico y evaporado al vacío a temperatura baja para proporcionar un concentrado síruposo espeso que contiene 4920 mg de pigmentos de carotenoides. Por análisis cromatográfico se encuentra que la porción de carotenoides del concentrado comprende 3050 mg de xantófilos, 1590 mg de beta-caroteno y 280 mg de otros carotenos.

#### E J E M P L O 2.

- Se preparan sesgos de extracto de malta-agar-peptona en tubos de ensayo de 18 x 150 mm de cabeza roscada. El me-

253338



die tiene la composición siguiente :

	<u>gramos por litro</u>
Agar	20
Extracto de malta Difco	15
Peptona Difco Bacto	5
5. Glucosa técnica	20
$KH_2PO_4$	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	50 mg.
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	25 mg.
10. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	25 mg.
Tiamina	0.1 mg.
Biotina	0.045 mg.

El pH es ajustado a 6.5 antes de la esterilización.

15. Los sesgos de agar son inoculados con un cultivo de Dacrymyces deliquescens, ATCC No. 13292, y son dejados incubar en luz difusa de alrededor 20 bujías-pie, en un local a temperatura constante mantenido a 26° a 28°C. En 10-15 días la superficie entera de los sesgos de agar quedan cubiertos
20. con una napa tenaz de vegetación rugosa de color amarillo profundo a naranja.

La vegetación de un sesgo es separada en pequeñas piezas con una aguja de alambre rígido y transferida a un homogeneizador de tejido a mano estéril, en el que es molido a una pulpa fina con 10-15 ml de agua destilada estéril.

25. La pulpa fina es transferida asepticamente a un frasco estéril y diluida a 25 ml con agua destilada estéril. Una alícuota de 5 ml de esta suspensión es transferida a un frasco de 500 ml que contiene 100 ml de medio inoculador de la
30. composición siguiente :

253338



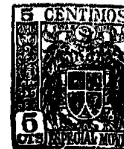
	<u>gramos por litro</u>
Glucosa (comercial)	25
Glicerol	5.0
Levadura (hidrolizada por enzima)	3.0
1 (+) Acido glutámico	2.0
5. Licor de remojo	3 ml.
Tiamina	1.0
$KH_2PO_4$	1.5
$MgSO_4$	0.25

10. El pH es ajustado a 6,0 con hidróxido amónico, antes de la esterilización.

Después de inoculación, el frasco es puesto aparte en el laboratorio a 24°-26°C y dejado incubar sin agitación durante la noche. Entonces el frasco es colocado en un sacudidor giratorio funcionando a 300 r.p.m. y es incubado de modo aerobio ulteriormente bajo 80-120 bujías-pie de iluminación emitida por una lámpara incandescente de 300 w. En 3 días una vegetación de un color anaranjado-rojizo subido se ha desarrollado en el medio.

20. Cinco ml de medio inoculador es transferido asépticamente a un frasco de 500 ml que contiene 100 ml de un medio de la composición siguiente :

	<u>gramos por 100 ml de medio</u>
Glucosa (grado técnico)	2.5
Licor de remojo de maíz concentrado	0.3 ml
25. Glutamato sódico	0.3
$KH_2PO_4$	0.15
$MgSO_4$	0.05
Levadura (hidrolizada por enzima)	0.1
30. Nitrate amónico	0.2
Tiamina	0.1 mg.



253338

El medio es ajustado a un pH de 6,1 antes de someterlo al autoclave y luego es esterilizado por calentamiento a 120°C durante 15 minutos.

5. Después de inoculación, el frasco es puesto en una máquina sacudidora giratoria y agitada de modo aerobio a 300 r.p.m., manteniendo la temperatura a 26-28°C, y exponiendo entretanto el frasco y su contenido a alrededor de 20-80 bujías-pie de luz emitida por un banco de lámparas fluorescentes de blanco-frío de 40 w.
10. Después de 12 horas de incubación, el azúcar en el medio ha sido consumido completamente y el frasco es cosechado.
15. El pH del medio es de 4,5. El micelio es separado por filtración y pesado. El peso en húmedo es de alrededor 4,5 gramos y, después de secado, es equivalente a 1,0 gramos de sólidos secos.
20. Una alícuota de micelio igual a 420 mg de sólidos secos son extraídos con acetona. La acetona es evaporada y el residuo es disuelto en éter de petróleo seco. La solución de éter de petróleo es tratada con alúmina de grado cromatográfico para absorber los xantófilos. Los xantófilos son eluidos de la alúmina y disueltos de nuevo en éter de petróleo. La fracción insoluble de éter de petróleo es pesada y luego disuelta en cloroformo.
25. Todas las soluciones de disolvente son analizadas colorimétricamente y se encuentra que contienen un total de 1630 gamma de material carotenoide por 420 mg de micelio seco. Este es igual a 3890 gamma de carotenoides por gramo de micelio seco. De este total, 3350 gamma son una mezcla de xantófilos y 540 gamma son beta-caroteno y otros carotenos.
- 30.



253338

E J E M P L O 3.

Se sigue el procedimiento según se describe en el ejemplo 2, excepto que el medio de fermentación, glicerol, es añadido en la cantidad de 1 g por 100 ml de medio.

- 5. Cuando es cosechado, a las 121 horas, se encuentra que el frasco contiene aproximadamente 4,6 g de micelio húmedo. El micelio es secado en un secador al vacío debajo de los 40°C, y pesa 1,03 g.

- 10. Una alícuota representando 460 mg de micelio seco es ensayada y se encuentra que contiene un total de 2010 gamma de pigmentos de carotenoides, igual a 4370 gamma de pigmentos por gramo de micelio seco. De este total, 3920 gamma ensayadas como pigmentos de xantófilo y 450 gamma ensayadas como beta-caroteno y otros carotenos.

15. E J E M P L O 4.

La Guepiniopsis torta, ATCC No. 13300, es inoculada en sesgos de agar de la composición siguiente :

	<u>gramos por litro</u>
Agar	20
Azúcar crudo	20
20. Glicerol	10
Licor de remojo	4.1
Levadura (hidrolizada por enzima)	2.0
Tiamina	10 mg.

- 25. El pH es ajustado a 6,5 antes de esterilización.

Después de inoculación, los sesgos son incubados bajo iluminación difusa durante 14 días, en un local de temperatura constante de 26-28°C.

Durante este período se ha desarrollado una estera rugosa



253338

amarillo-naranja de vegetación. La vegetación en un sesgo es separada y molida en un homogeneizador de tejido a pulpa fina. La vegetación finamente molida es diluida a 20 ml con agua estéril y una alícuota de 5 ml es transferida a un frasco de 500 ml conteniendo 100 ml de medio de la composición siguiente :

5.

Gramos por litro

Extracto de malta Difco	15
Peptona Difco	7
Tiamina	1 mg.
Biotina	0.01 mg.

10.

Después de inoculación, el frasco es dejado reposar durante 72 horas, cerca de la ventana, a 24-26°C. El frasco es colocado luego en una máquina sacudidora giratoria funcionando a 270 r.p.m. y es incubado de modo aerobio y 75 horas adicionales a 25°C, mientras se lo mantiene bajo iluminación difusa proporcionada por una lámpara fluorescente blanco caliente.

15.

Una alícuota del medio de inoculación desarrollado es transferida a un frasco de 500 ml conteniendo 100 ml de medio de la composición siguiente :

20.

Gramos por litro

Glucosa (grado técnico)	35
Agua de remojo de maíz	3
1 (+) Acido glutámico	2
Nitrato amónico	2
Fosfato de ácido potásico	1.5
Sulfato magnésico	1.0
Levadura hidrolizada por enzima	1.0
Tiamina	1.0 mg.

25.

El pH es ajustado a 6.1 antes de esterilización.

30.

253338



5. El frasco inoculado es colocado en un sacudidor giratorio funcionando a 270 r.p.m. e incubado de modo aerobio bajo iluminación difusa durante 5 días a 25°C. Luego el frasco es separado del sacudidor y el micelio producido es filtrado del medio de crecimiento. El peso en húmedo del micelio es de 5,2 g. Al secar se encuentra que la cantidad de peso en seco producido es de 1,04 g.

10. Una alícuota del micelio cosechado recientemente es ensayada para carotenoides, encontrando que contiene 1185 gamma de los carotenoides totales por gramo de sólidos secos. De este total, la fracción de xantófilo da razón de 813 gamma por gramo. Las restantes 372 gamma por gramo consisten de beta-caroteno y otros carotenos.

EJEMPLO 5.

15. Un cultivo de Femsonia luteoalba, ATCC No. 13299, es tratado de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 4 y se halla que rinde 18,8 g de micelio seco por litro de cultivo. El micelio contiene 1571 gamma por gramo de carotenoides total, de los que 766 gamma por gramo comprende una mezcla de xantófilos y 805 gamma por gramo son beta-caroteno y otros carotenos.

EJEMPLO 6.

25. Un cultivo de Dacryomitra nuda, ATCC No. 13296, es tratado como se describe en el ejemplo 2 excepto que el cultivo es irradiado, durante las fases sumergidas de su crecimiento, con la potencia producida de una lámpara que emite principalmente a 5800 Å°.

30. El rendimiento de peso seco micélico es de 8,7 g por litro. El micelio contiene 2540 gamma por gramo de carotenoides total, del que 1220 gamma por gramo es de composición de



253333

xantófilo mixta; 1320 gamma por gramo consiste de beta-caroteno y otros carotenos.

EJEMPLO 7.

5. La Dacryomitra nuda es cultivada como se describe en el ejemplo 6, excepto que el cultivo es irradiado por energía radiante con cresta a 4800 A° y a 6200 A°. El rendimiento de peso seco micélico es de 9,0 g por litro. El micelio seco contiene 3260 gamma por gramo de carotenoides total, del que 1240 gamma por gramo es composición de xantófilo y 2020 gamma por gramo comprende beta-caroteno y otros carotenos.

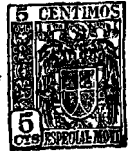
EJEMPLO 8.

15. La Calocera cornea, ATCC No. 13291, es tratada como se describe en el ejemplo 2, excepto que el cultivo es irradiado, durante la incubación, con la energía radiante de una lámpara que emite principalmente en la región de 5800 A°. El rendimiento de micelio seco es de 13,4 g por litro. El micelio contiene 1710 gamma por gramo del total de carotenoides, del que 430 gamma por gramo son pigmentos de xantófilo. El remanente, o 1280 gamma por gramo, consiste de beta-caroteno y otros carotenos.

EJEMPLO 9.

Un sesgo de agar de 16 días de Dacrymyces deliques-cens es empleada para inocular un frasco de 500 ml que contiene 100 ml de medio de la composición siguiente :

	<u>Gramos por litro</u>
25. Glucosa (técnica)	15
Nitrato amónico	1.0
Sulfato magnésico	1.5
Levadura hidrolizada por enzima	1.0
Fosfato de ácido potásico	1.5



253338

- |    |                                     |        |
|----|-------------------------------------|--------|
|    | Licor de remojo de maiz             | 1.0    |
|    | Lactalbumina hidrolizada por enzima | 1.0    |
|    | 1 (+) Acido glutámico               | 1.0    |
|    | Heptahidrato de sulfato de zinc     | 20 mg. |
| 5. | Tiamina                             | 5 mg.  |

El pH es ajustado a 6.0 con hidróxido sódico antes de esterilización.

- El frasco inoculado es colocado en una mesa en un local de temperatura constante de 26°C, y dejado reposar sin
10. agitación durante 71-1/2 horas. Luego el frasco es colocado en una máquina sacudidora giratoria que opera a 260 r.p.m. y es dejada incubar con agitación aerobia a 26°C, mientras que es expuesta a la radiación de un dispositivo que contiene dos lámparas fluorescentes que emiten principalmente a 4800
15. A°. Después de 41-1/2 horas de incubación, 60 ml (3% v/v) del cultivo desarrollado es transferido a 2500 ml de medio siguiente contenido en un frasco de 4000 ml:

- |     | <u>Gramos por litro</u>             |       |
|-----|-------------------------------------|-------|
|     | Glucosa (técnica)                   | 5.0   |
|     | Nitrato amónico                     | 1.0   |
| 20. | Sulfato magnésico                   | 1.5   |
|     | Levadura hidrolizada por enzima     | 1.0   |
|     | Fosfato de ácido potásico           | 1.5   |
|     | Licor de remojo de maiz             | 1.0   |
|     | Lactalbumina hidrolizada por enzima | 1.0   |
| 25. | 1 (+) Acido glutámico               | 1.0   |
|     | Tiamina                             | 5 mg. |

El pH es ajustado a 6.0 con hidróxido sódico antes de esterilización.

- El frasco inoculado es colocado en un sacudidor giratorio funcionando a 220 r.p.m. y es incubado de modo aerobio
- 30.

253338



a 26°C, mientras es irradiado con la luz de una lámpara incandescente deslustrada de 300 w.

Una alícuota de 350 ml de la vegetación desarrollada es transferida a un fermentador de jarro con agitador conteniendo 5000 ml del medio siguiente :

	<u>gramos por litro</u>
5.	Glucosa (técnica) 35
	Licor de remojo de maíz 3
	Fosfato diamónico 2
	Fosfato de ácido potásico 1.5
10.	Sulfato magnésico 1.5
	Cloruro potásico 1.0
	Lactalbumina hidrolizada por enzima 1.0
	Proteína de haba de soja hidrolizada por enzima 1.0
15.	Pantotenato cálcico 10 mg.

El pH es ajustado a 6.0 con NaOH y 3 ml de Silicona Dow Corning son añadidos antes de esterilización.

Después de inoculación, el jarro es aerado con 3 litros de aire por minuto y es agitado con dos turbinas de 3 pulgadas funcionando a 350 r.p.m. La temperatura es mantenida a 25-27°C y el jarro es iluminado continuamente con la luz de una lámpara incandescente deslustrada de 500 w, colocada a una distancia de 30 pulgadas.

25. Después de 163 horas de incubación, el hongo ha desarrollado una vegetación profusa presentando un matiz rojo anaranjado subido. El peso seco fúngico recuperado es equivalente a 10.3 gramos por litro, conteniendo un total de 3360 gamma por gramo de pigmentos de carotenoide. Estos comprenden 1600 gamma por gramo de pigmentos de xantófilo y 30. 1760 gamma por gramo de beta-caroteno y otros carotenos. El



253338

total de peso seco recuperado pesa 51,5 gramos y contiene un total de 173,500 gamma de pigmentos de carotenoide, comprendiendo 82,600 gamma de pigmentos de xantófilo y 91,000 gamma de beta-caroteno y otros carotenos.

5. EJEMPLO 10.

El procedimiento descrito en el ejemplo 9 es repetido, excepto en que la composición del medio de fermentación tiene los ingredientes siguientes :

	<u>Gramos por litro</u>
	50
10. Glucosa (técnica)	3
Agua de remojo de maíz	3
Lactalbumina hidrolizada por enzima	4
Fosfato diamónico	1.5
Fosfato de ácido potásico	1.5
Sulfato magnésico	1.0
15. Glicina	1.0
Cloruro potásico	10 mg.
Pantotenato cálcico	

Después de 163 horas de incubación, el peso seco micélico producido es igual a 18 gramos por litro, conteniendo un total de 3140 gamma por gramo de pigmentos de carotenoide. Estos comprenden 1550 gamma por gramo de xantófilos y 1590 gamma por gramo de beta-caroteno y otros carotenos. Un total de peso seco micélico de 90,2 gramos es producido, conteniendo un total de 283,230 gamma de pigmentos de carotenoide.

25. Estos comprenden 139,810 gamma de pigmentos de xantófilo y 143,420 gamma de beta-caroteno y otros carotenos.

EJEMPLO 11.

Un medio de inoculación sumergido de Dacrymyces deliquescens es desarrollado en 60 litros de medio de la composi



253333

ción siguiente, contenido en un fermentador forrado de vidrio de 40 galones :

		<u>Gramos por litro</u>
	Glucosa (técnica)	15
	Fosfato de ácido potásico	1.5
5.	Heptahidrato de sulfato magnésico	1.5
	Levadura hidrolizada por enzima	1.0
	1 (+) Acido glutámico	1.0
	Nitrato amónico	1.0
	Agua de remojo de maíz	1.0
10.	Heptahidrato de sulfato de zinc	20 mg.
	Tiamina	5 mg.
15.	El pH es ajustado a 6,0 con amoníaco antes de esterilización y se añaden 50 ml de Silicona Dow Corning emulsión desespumante A.	

La partida es esterilizada a 120°C durante 20 minutos y es enfriada inmediatamente. Después de inoculación, la partida es agitada continuamente siendo simultáneamente aerada con 10 pies cúbicos por minutos de aire estéril. La temperatura es mantenida a 25-27°C y no se proporciona iluminación.

Dentro de las 72 horas se desarrolla un crecimiento denso pesado. Se transfieren treinta y seis litros de esta vegetación en 240 litros de medios de fermentación, el cual está contenido en un fermentador forrado de vidrio de 380 litros. El medio de fermentación tiene la misma composición que el medio de inoculación excepto que la concentración de heptahidrato de sulfato de zinc está incrementada a 40 mg por litro, y se añade decahidrato de borato sódico a un nivel de 20 mg por litro.

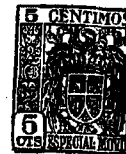
El interior del fermentador es iluminado por dos lám

253338



paras de vapor de mercurio de 400 w que están protegidas por pozos de vidrio resistentes al calor que entran por la tapa del recipiente y se extienden hacia abajo, dentro del medio en el recipiente.

5. El contenido del fermentador es agitado continuamente y es aerado continuamente con aire estéril en proporciones que fluctúan de 5 c.p.m. a 20 c.p.m., manteniendo a la vez una ligera presión de aire positivo en el fermentador, y manteniendo el caldo a una temperatura de 25-28°C.
10. Después de 164 horas de incubación, se recuperan 8,87 kg de moho húmedo por filtración en una centrífuga de cesto. Una alícuota es ensayada y se encuentra que contiene el 23% de sólidos. Los sólidos de moho seco contienen 2460 gamma por gramo de pigmentos de carotenoide, conduciendo el rendimiento total de pigmentos de carotenoide a 5000 mg para la partida. Estos comprenden 2710 mg de xantófilos y 2290 mg de caroteno y otros carotenos.
15. Mil gramos del micelio húmedo es molido a una pulpa fina con agua en un molino homogeneizador. El agua es separada por filtración y los sólidos micélicos son extraídos con dos cantidades sucesivas de 6 litros de acetona. Luego se efectúan dos extracciones más con cantidades de 3 litros de acetona. Los extractos de acetona encharcados son evaporados a temperatura baja a un jarabe espeso de alrededor 1 litro en volumen. Este jarabe es ensayado y se encuentra que contiene un total de 66,2 g de sólidos, de los cuales 1167 mg comprenden pigmentos de carotenoide y sustancias afines.
20. El extracto concentrado es sacudido con 5 litros de Skellysolve B, se añade agua para interrumpir la emulsión, y la capa de Skellysolve B es separada. Se efectúa otra ex-
- 25.
- 30.



253338

tracción con 3 litros de Skellysolve B. Los extractos de Skellysolve son encharcados y evaporados a un concentrado si ruoso espeso.

5. Es obtenido un concentrado que pesa 43,3 gramos, con teniendo un total de 853 mg de pigmentos de carotenoide. Un producto enriquecido es así obtenido, conteniendo 19,800 gamma por gramo del total de carotenoides, de los que 10,800 gamma por gramo comprenden pigmentos de xantófilo.

E J E M P L O 12.

10. Especies adicionales de la familia Dacrymycetaceae son cultivadas de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 3, con los siguientes rendimientos de carotenoides:

<u>Organismos</u>	<u>γ-gm. Xantófilos</u>	<u>Carotenoides, D.W. Carotenos</u>	<u>D.W. Total</u>	<u>Gms./litro Micelio (D.W.)</u>
Dacrymyces Ellisii, ATCC No. 13293	470	156	626	17.0
Dacrymyces palmatus, ATCC No. 13294	90	90	180	5.9
Dacrymyces minor, ATCC No. 13295	520	1110	1630	5.8
Dacryopinax spathularia, ATCC No. 13297	320	590	910	8.1
Ditiola radicata, ATCC No. 13298	430	250	680	15.1

15. La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, llevarse a cabo con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.



253338

NOTA

Descrito el invento, se declaran nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad estadounidense Núm. 773 184, del 12 de noviembre de 1.958 :

5. 1. Procedimiento para la preparación de carotenoides que consiste en cultivar un hongo de la familia de la *Dacrymycetaceae* en cultivo sumergido en un medio acuoso conteniendo una fuente de nitrógeno orgánico asimilable, una fuente de nitrógeno amónico, una fuente metabolizable de carbono, una fuente metabolizable de fósforo y minerales trazadores
10. 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el hongo es de la especie *Dacrymyces deliquescens*.
15. 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el hongo es de la especie *Dacryopinax spathularia*.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el hongo es de la especie *Dacryomitra nuda*.
20. 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el hongo es de la especie *Calocera cornea*.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el hongo es de la especie *Femsonia luteoalba*.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el hongo es de la especie *Guepinopsis torta*.
25. 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el

253338



- que el medio acuoso comprende nitrógeno orgánico en una proporción de 0,025 a 2,5 gramos de nitrógeno por litro de medio, nitrógeno amónico en una proporción de 0,025 a 2,0 gramos de nitrógeno por litro de medio, carbono metabolizable
5. en una proporción de 1 a 80 gramos por litro de medio, fósforo metabolizable en una proporción de 0,1 a 2,0 gramos por litro de medio, y minerales trazadores esenciales en una proporción de 1 a 500 miligramos por litro de medio, y el material fúngico es irradiado con luz del orden de alrededor
10. 3200  $\text{A}^\circ$  a 7600  $\text{A}^\circ$ .
9. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio acuoso comprende 0,025 a 0,40 gramos por litro de nitrógeno de aminoácido, 0,025 a 0,40 gramos por litro de nitrógeno amónico, 10 a 50 gramos por litro de carbono de
15. carbohidrato, 0,1 a 2 gramos por litro de fósforo y 1 a 25 miligramos por litro de minerales trazadores esenciales, el cultivo es agitado y aerado con aire del orden de alrededor 0,2 a 2,5 volúmenes de aire por minuto por litro, y el material fúngico es irradiado con luz en el orden de alrededor
20. 4800  $\text{A}^\circ$  a 6500  $\text{A}^\circ$ .
10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el medio acuoso comprende nitrógeno orgánico en una proporción de 0,025 a 2,5 gramos de nitrógeno por litro, nitrógeno amónico en una proporción de 0,025 a 2,0 gramos de nitrógeno por litro, carbohidrato en una proporción de 5 a 150
25. gramos por litro, fósforo en una proporción de 0,1 a 2 gramos por litro, y minerales trazadores esenciales en una proporción de 1 a 500 miligramos por litro, el cultivo es aerado y agitado, el material fúngico es irradiado con luz del
30. orden de alrededor 3200  $\text{A}^\circ$  a 7600  $\text{A}^\circ$ , el material fúngico es

253338



separado del caldo de fermentación y el tejido fúngico es se  
cado.

11. Procedimiento según se reivindica en la reivin-  
dicación 8, en el que el medio acuoso comprende nitrógeno or  
gánico en una proporción de 0,025 a 2,5 gramos de nitrógeno  
5. por litro, nitrógeno amónico en una proporción de 0,025 a  
2,0 gramos de nitrógeno por litro, carbohidrato en una pro-  
porción de 5 a 150 gramos por litro, fósforo en una propor-  
ción de 0,1 a 2 gramos por litro y minerales trazadores esen  
10. ciales en una proporción de 1 a 500 mg por litro, el cultivo  
es aerado y agitado, el material fúngico es irradiado con  
luz del orden de alrededor 3200 A° a 7600 A°, el material  
fúngico es separado del caldo de fermentación, el material  
fúngico es sometido a la extracción de disolvente para recu-  
15. perar el pigmento y el disolvente es evaporado para obtener  
un concentrado rico en xantófilo.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a  
11, por el que se obtiene una composición que contiene caro-  
tenoide, preparada según cualquiera de las reivindicaciones  
20. mencionadas o por un equivalente químico obvio de la misma.

13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a  
12, por el que se obtiene una composición que contiene xan-  
tófilo siempre que esté preparada según cualquiera de las  
reivindicaciones 8 a 11 o por un equivalente químico obvio  
25. de la misma.

14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a  
13, por el que se obtiene una composición rica en xantófilo  
preparada de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 11, o por  
un equivalente químico obvio de la misma.

30. 15. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a

= 33 =

253338



14, en el que las composiciones que contiene carotenoide de las reivindicaciones 12 a 14 son empleadas con una parte mayor de una ración básica como alimento animal.

5. 16. Procedimiento para la obtención microbiológica de carotenoides.

Según se describe y reivindica en la presente memoria, que consta de treinta y tres hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 11 de noviembre de 1.959

10. F. HOFFMANN-LA ROCHE & Cie. S. A.

p. a.

*[Handwritten signature]*

tr : jpt  
R/.ag.