

G.205.



R 1964

297462

297462

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE CAROTENOIDES Y AMINOSIDINA", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, residente en MILANO (Italia) Largo Guido Donegani, 1-2.

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a nuevos piensos que contienen carotenoides y al procedimiento microbiológico para la producción de dichos carotenoides y aminosidina. Más particularmente, son objeto de este invento nuevos piensos que contienen el micelio portador de carotenoides de un nuevo mutante de la raza Streptomyces chrestomyceticus llamado por nosotros Streptomyces chrestomyceticus var.

10



297462

aurantioideus, así como el procedimiento microbiológico para preparar dichos carotenoides y aminosidina por medio de la nueva raza, separación del micelio que contienen los carotenoides aparte del caldo de fermentación que contiene aminosidina y aislamiento, de manera conocida, de los carotenoides y la aminosidina aparte del micelio y del caldo de fermentación, respectivamente.

10. La aminosidina es un antibiótico conocido en la literatura (Patente norteamericana Nº 3,065.147). Los carotenoides, que comprenden carotenos y xantófilos, son compuestos conocidos que se caracterizan por gran poder de pigmentación, por la propiedad de favorecer el aumento del peso corpóreo y por una actividad semejante a la de la vitamina A.

15. La literatura (Patente norteamericana Nº 2,974.044) proporciona solo un procedimiento para producir carotenoides (carotenos y xantófilos) mediante fermentación de un hongo de la familia de las Dacrymycetaceae y bajo irradiación luminosa.

20. Ahora se ha descubierto que el nuevo microorganismo Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus produce, no solo carotenoides, sino también aminosidina, según un procedimiento que, en comparación con el conocido, presenta la ventaja de dar mayores rendimientos sin exigir recursos especiales, tales como las radiaciones luminosas.

25.



- 3 -

297462

El nuevo microorganismo Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus se obtiene por un tratamiento mutágeno de la raza conocida Streptomyces chrestomyceticus (Streptomyces Krestomyceticus - Patente norteamericana Nº 3,065,147

5. - es sinónimo de Streptomyces chrestomyceticus - Canevazzi G. y colaboradores, *Giornale di Microbiologia* 7, 1959, páginas 242-250-).

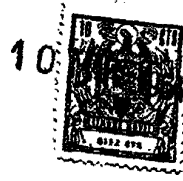
10. Como agente mutágeno se emplea una solución, en fosfato tampón, de N-nitroso-N-metil-uretano, conocido en la literatura (Zetterberg G., *Exp. Cell. Res.* 20, 1960, página 659). Del micelio obtenido por dicho tratamiento, se aíslan los microorganismos sobrevivientes en un terreno apropiado, según las técnicas conocidas, y se seleccionan las razas capaces de producir carotenoides y aminosidina.

15. El Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus llamada también raza 1131 de la colección Farmitalia, presenta las siguientes características morfológicas microscópicas, macroscópicas y bioquímicas:

20. Aspecto microscópico.

En los medios de cultivo ordinarios, el micelio vegetativo presenta hifas sutiles (0,5 a 1 micra de espesor) más o menos largas, ramificadas. Las hifas son por lo general derechas, algunas veces incurvadas hasta formar ganchos.

25. Los conidios son cilíndricos u ovalados y de un tamaño de



297462

0,3 a 0,4 micras por 0,6 a 0,8 micras.

Aspecto macroscópico.

En la tabla 1, se reseñan las propiedades cultura-

5. les observadas en los terrenos indicados, haciendo crecer el microorganismo a 28°C y realizando las observaciones 3, 8, 15, 21 y 30 días después de la siembra.

Propiedades bioquímicas.

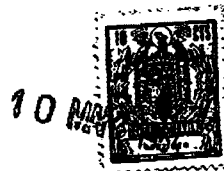
10. Hidroliza la gelatina y asimismo el almidón. No reduce los nitratos. No produce sulfuro de hidrógeno. Produce ácidos utilizando los siguientes carbohidratos: trehalosa d-levulosa, d-sorbitol, d-mannosa, galactosa, lactosa, adonitol, d-mannitol, maltosa, glicerol, dextrosa, dextrina
15. y almidón. Producción negativa de rannosa, l-arabinosa, d-xilosa y sacarosa. Destruye la tirosina. Peptoniza la leche sin coagularla. Produce el cultivo, líquido sumergido aminosidina y carotenoides.

297462



TABLE I.

TERREPOS	CRECIMIENTO	MICELIO AEREO	MICELIO VEGETATIVO	PIGMENTOS SOLUBLES
Agar-patata glucosado (2)	pátina su- til con pliegues	escaso, blan- co amarillen- to	amarillo anaranja- do	ausentes
Agar Ben- nett (1)	pátina gra- nular con pliegues en el fon- do	ausentes	anaranja- de oscuro	-
Agar Emer- son (1)	pátina li- quenoide abundante	ausentes	amarillo anaranjado oscuro	-
Agar Gza- pek (1)	velo	ausentes	amarillo	-
Agar-aspa- ragina (1)	pátina abundante	escaso, blancusco	amarillo anaranjado	-
Agar-gli- cerol-gli- cina (1)	abundante, con plie- gues espe- sos.	escaso, blancusco	anaranjado pardo	-
Agar-almi- dón y se- les de Pridham (3)	pátina su- til granu- lada.	escaso, blancusco	anaranjado intenso	-



297462

	Agar-ave- na (2)	pátina lisa y opaca, granu- lada.	escaso, blanco amarillen- to	anaranjado oscuro	-
5.	Agar-gli- cerol-as- paragina (1)	pátina	escaso, blanco amarillen- to	anaranjado intenso	-

10. (1) Preparado según Waksman "The Actinomycetes", vol.II,
1961, páginas 328 - 333.
- (2) Preparado según Baldacci y colaboradores, "Journal
of Microbiology" 9, 1961, página 39.
15. (3) Preparado según Pridham y colaboradores, "Antibiotics
Annual", 1956-1957, páginas 947 - 953.

Identificación de la raza.

20. La raza 1131 difiere del Streptomyces chrestomy-
ceticus porque no reduce los nitratos, peptoniza la leche,
tiene un micelio aéreo mucho más escaso, tiene un micelio
vegetativo intensamente pigmentado de amarillo anaranjado
y produce carotenoides.

25. Tanto por su origen como por sus características,



297462

no muy diferentes de las del Streptomyces chrestomyceticus, concluimos que el microorganismo en examen debe considerarse una variedad del S. chrestomyceticus y por consiguiente lo designamos como S. chrestomyceticus var. aurantioideus.

5. A base de cuanto se conoce en la literatura, cabe concluir que el S. chrestomyceticus var. aurantioideus difiere de los otros microorganismo conocidos, y en particular de los siguientes, que presentan algunas características comunes. La raza 1131 difiere del Streptomyces rimosus forma paromomycinus (patente Belga 547.976) por no formar espirales y por el color del micelio vegetativo, que es anaranjado intenso en el primero y de incoloro a amarillo claro en el segundo.

10. Difiere del Streptomyces catenulae (Patente Norteamericana 2.895.876) en que este último presenta un micelio vegetativo de color pardo más o menos intenso, con contornos verdosos, un micelio aéreo gris y un pigmento soluble en el substrato.

15. Por otra parte, la raza 1131 difiere del Streptomyces pulveraceus (patente Francesa 1.294.121) en que este último forma espirales y presenta esporas mayores y micelio aéreo gris.

20. El procedimiento de este invento consiste en hacer desarrollar el Streptomyces chrestomyceticus en un medio líquido, previamente esterilizado, y en cultivo sumergido,
- 25.

**297462**

a temperatura de 24° C a 32° C, y de preferencia a 28° C, por 1 a 8 días, de preferencia por 6 días, y a pH de 5 a 8 y en separar el caldo de fermentación, que contiene amiosidina, del micelio, que contiene los carotenoides.

5. El medio de cultivo consiste en una fuente de carbono, de nitrógeno, y de sales minerales, la fuente de carbono puede estar constituida por almidón, dextrina, glucosa, lactosa, sorbitol, solubles de los destiladores, maltosa manitol, glicerina, corn steep, liquor, aceite de semillas de soja y aceite de semillas de algodón.

10. La fuente de nitrógeno, además de las sustancias complejas que contienen nitrógeno que se han citado antes, puede estar constituida por levadura seca, peptona de carne, caseina, hidrolizados de caseina, harina de soja, malta, lisina, leucina, triptófano, asparagina, alanina y ácido glutámico.

También pueden obtenerse buenos resultados utilizando sales amónicas, como el nitrato, el sulfato o el fosfato de amonio.

20. Las sales minerales empleadas en el procedimiento de este invento pueden ser fosfatos de sodio o potasio, sulfatos de hierro, cinc, magnesio o cobre, carbonato de calcio y otras sales que se emplean de ordinario para estos fines.

25. La fermentación puede llevarse a cabo en matraces



297462

de laboratorio o en fermentadores de laboratorio, o también en fermentadores industriales de diversa capacidad.

- Durante la fermentación y al final de élla, la aminosidina permanece en el caldo de fermentación, mientras que
5. los carotenoides se hallan en el micelio. Variando apropiadamente la composición del terreno, pueden inclinarse los rendimientos en favor de la aminosidina o de los carotenoides. En particular, se ha comprobado que la producción de carotenoides se estimula empleando glucosa, dextrina, lactosa o
 10. manitol como fuente de carbono, mientras que la presencia de almidón estimula la producción de aminosidina. Pueden lograrse buenos rendimientos tanto de aminosidina como de carotenoides usando aceite de semillas de soja o aceite de semillas de algodón como fuente de carbono. Por lo general, la
 15. ventilación intensa favorece la producción de carotenoides y restringe la producción de aminosidina, mientras que una ventilación relativamente menos intensa favorece la producción de aminosidina y restringe la producción de carotenoides.
 20. La mayor producción de aminosidina o de carotenoides o los buenos rendimientos de ambos se debe por consiguiente a la elección de un terreno y unas condiciones apropiadas. El último caso, o sea gran producción tanto de aminosidina como de carotenoides, además de deberse al empleo de
 25. un terreno apropiado, que contenga aceite de semilla de soja



297462

o de semilla de algodón, se logra también desarrollando la producción de las dos sustancias en tiempos diferentes y, más precisamente como sigue.

5. En una primera operación, fermentativa, se cultiva la raza 1131 en un terreno de almidón, en condiciones favorables a la producción de aminosidina; después de un período de 4 a 6 días de fermentación, el micelio es separado de la fase líquida que contienen la aminosidina.

10. Luego se suspende el micelio en una solución que contiene glucosa o una de las otras sustancias que favorecen la formación de carotenoides y se hace desarrollar la fermentación en condiciones de ventilación intensa, para obtener gran producción de carotenoides.

15. La extracción de la aminosidina del caldo de fermentación, previa separación del micelio, se efectúa tal como está descrito en la literatura (patente norteamericana - 3.065.147), mediante absorción sobre resinas de cambio iónico sucesiva elución optativa con disolventes o con ácidos, si sedesean obtener las sales correspondientes.

20. Los carotenoides contenidos en el micelio pueden aislarse por extracción con un disolvente orgánico apropiado de preferencia, cloroformo, acetona o cloruro de metileno,

25. La separación de los carotenos aparte de los xantófilos puede efectuarse por cromatografía, de manera conocida, sobre sustancias absorbentes, como el óxido de magnesio,



207462

tierra silicea, alúmina y análogos.

Se ha comprobado que los piensos preparados según este invento, que contienen el micelio del Streptomyces chrestomyceticus, var. aurantioideus, favorecen notable-

5. mente el crecimiento de los animales tratados y además, cuando se administran a las aves de corral, han demostrado poseer notable poder pigmentativo. Se han logrado particularmente buenos resultados con los pollos, los pavos, los ánades, los cerdos y las vacas.

10. Para la preparación de los piensos según este invento se prefiere usar directamente el micelio que contiene los carotenoides. Con tal fin, se separa del caldo de cultivo, mediante técnicas conocidas, de preferencia por filtración o centrifugación, el micelio formado durante
15. la fermentación y seguidamente se les seca con aire caliente y en vacío según técnicas conocidas.

Se obtienen por término medio de 20 a 60 g de residuo seco por litro de caldo de cultivo. El residuo seco contiene de 0,2% a 0,1% de carotenoides, de los cuales 10%
20. a 60% están constituidos por carotenos y 40% a 90% por xantófilos.

El micelio seco se muele luego en molinos corrientes u otros medios aptos para estos fines y el polvo obtenido se mezcla perfectamente con las composiciones empleadas de ordinario para la alimentación de los animales.
25.



297462

Estas composiciones comprenden normalmente carbohidratos, protefinas, vitaminas y sales minerales.

- Ejemplos de dichas sustancias son el trigo y otros cereales; los residuos de carne y de pescado, como fuente de proteínas animales; las semillas de soja, como fuente de proteínas vegetales; los complejos vitamínicos que contienen principalmente vitamina D, vitamina PP y vitamina B₁₂; y el carbonato cálcico, los fosfatos y la harina de huesos como sales minerales.
- 5.
10. Para obtener una dispersión unifrorme del micelio en el pienso, de preferencia el micelio pulverizado se mezcla intimamente con un ingrediente de la alimentación, de preferencia uno de los ingredientes de alimentación empleados corrientemente, como el carbonato cálcico y la harina de huesos. Para tal fin puede emplearse un mezclador cualquiera.
15. A la mezcla obtenida se añaden luego los otros ingredientes de alimentación.
- Si se desea añadir al pienso un producto que contenga mayor cantidad de carotenoides, se puede extraer el micelio para disolventes orgánicos y utilizarse el producto oleoso que se obtiene, previa evaporación del disolvente, como aditivo, para los piensos.
- 20.



E J E M P L O 1.

Según este invento el Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus se ha obtenido del modo siguiente:

Se ha centrifugado una suspensión de micelio de

5. Streptomyces chrestomyceticus con alto grado de fragmentación y el micelio así obtenido se ha añadido una solución del agente mutégeno, preparada disolviendo 13 mg de N-nitroso-N-metil-uretano en 100 cc de tampón fosfato M/15, ajustado a pH 7,2.

10. La mezcla resultante se ha mantenido a 24°C durante 30 minutos y luego se ha separado el micelio de la solución, por centrifugación. Los microorganismos sobrevivientes se han aislado sobre placas de terreno de la composición siguiente:

15.	Hidrolizado enzimático de caseína	10 g
	Glucosa	10 g
	Extracto cárnico	3 g
	Cloruro sódico	5 g
	Agar	20 g
20.	Agua del grifo	1000 g
	pH no corregido.	

Se han examinado las colonias sobrevivientes respecto a su capacidad para producir aminosidina y carotenoides. Entre ellas se ha seleccionado una colonia caracterizada por la capacidad de producir gran cantidad de

25.



297462

carotenoides y aminosidina, y se la ha designado con el número 1131.

Se emplea un cultivo de 8 días de la raza 1131 para inocular un matraz de Erlenmeyer de 300 cc, que contiene 60 cc del medio vegetativo siguiente:

	Dextrina	30 g
	Caseina	5 g
	CaCO ₃	4 g
10.	Corn steep liquor	3 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
	K ₂ HPO ₄	0,1 g
	Agua del grifo	1000 cc

Esterilización: a 120°C durante 20 minutos.

15. Sigue incubación a 28°C durante 48 horas en un agitador giratorio a 220 r.p.m., con excentricidad de 6 cm, y luego se emplea 1 cc del caldo de cultivo así obtenido para inocular matraces de 300 cc que contienen 70 cc del medio productivo siguiente:

20.	Almidón	40 g
	Caseina	15 g
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5 g
	K ₂ HPO ₄	P, 2 g
25.	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,010 g



- 15 -

297462

ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,010 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,001 g
Agua del grifo	1000 cc

Esterilización: a 120°C durante 20 minutos.

5. Al cabo de 6 días de incubación a 28°C en un agitador giratorio semejante al que se ha descrito antes los caldos de cultivo contienen una cantidad de aminosidina correspondiente a 1200 gammas/cc y una cantidad de carotenoides correspondiente a 60 gammas/cc.
10. Del caldo de cultivo obtenido después de apartar el micelio mediante filtración, se separa la aminosidina por absorción sobre resinas de cambio iónico y sucesiva elución con ácido mineral. Los carotenoides se aíslan del micelio que los contiene extrayendo primeramente el micelio con acetona, molturándolo luego en un molino de bolas con polvo de vidrio y sulfato sódico y efectuando por último repetidas extracciones con cloroformo. Los extractos reunidos, que contienen los carotenoides, se evaporan en vacío y luego se saponifican con 12% de hidróxido potásico alcohólico, a temperatura ambiente,
20. durante 20 minutos y bajo atmósfera de nitrógeno. Después de diluir con agua, se vuelven a extraer los carotenoides con cloroformo. Se lava con el agua el extracto cloroformico, se le seca sobre sulfato sódico y se le evapora en vacío.
- 5.



297462

El residuo obtenido se recoge con cloroformo, y 5 cc de la solución clorofórmica que contiene 274 gammas/cc de carotenoides (considerando $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 460 micras = 1.900), se colocan en una columna de óxido de magnesio - Celice (Marca comercial registrada) - en la

5. proporción de 1 : 1 y luego se eluyen varias veces con cloroformo que contiene de 1 a 10% de etanol. Las bandas de absorción obtenidas corresponden a un 10% a 60% de carotenos y a un 40% a 90% de xantófilos.

Se obtienen los mismos resultados efectuando

10. la separación de los carotenos y los xantófilos con el método descrito por Hope y colaboradores, "Handbuch Physiol. Pathol. Chem. Analyse" (1955), III/2, página 1054.

15. E J E M P L O 2.

Un cultivo vegetativo obtenido tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, se emplea para inocular matraces de 300 cc que contienen 30 cc del siguiente medio de cultivo:

20.

Glucosa	80 g
Levadura seca	30 g
MgSO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,010 g

25.



247432

ZnSO₄ · 7 H₂O 0,010 g

CuSO₄ · 5 H₂O 0,001 g

pH no corregido

Esterilización: a 120°C, durante 20 minutos.

5. Al cabo de 5 días de incubación en las condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1, se obtiene una producción correspondiente a una cantidad superior a 500 gammas/cc para los carotenoides y a 120 gammas/cc para la aminosidina.

10.

EJEMPLO 3.

Se efectua la fermentación como en el Ejemplo 2, con la diferencia de que en el medio productivo se substituye la glucosa por la dextrina.

15.

Al cabo de 144 horas de fermentación se obtienen 240 gammas/cc de carotenoides y 250 gammas/cc de aminosidina.

EJEMPLO 4.

20.

La fermentación es efectuada como en el Ejemplo 2, con la diferencia de que en el medio productivo se substituye la glucosa por 2% de una mezcla 1:1 de aceite de semilla de algodón y de semilla de soja. Al cabo de 6 días de fermentación, se obtienen 200 gammas/cc de

25.

carotenoides y 950 gammas/cc de aminosidina.



7462

EJEMPLO 5.

Se efectua la fermentación como en el Ejemplo 2, con la diferencia de que el medio productivo tiene la composición siguiente:

5. Solubles de los destiladores 50 g
Almidón 10 g
Glucosa 40 g
Extracto de levadura 1 g
10. Agua del grifo 1000 g
pH 6,2 - 6,5

Al cabo de 6 días de fermentación, se obtienen 280 gammas/cc de carotenoides y 400 gammas/cc de aminosidina.

15.

EJEMPLO 6.

20. Se centrifugan a 5000 vueltas durante 40 minutos los caldos de cultivo obtenidos efectuando la fermentación tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. El líquido sobrenadante, que contiene casi toda la aminosidina producida, se usa para la extracción de esta, y el micelio se suspende en una cantidad correspondiente al volumen original de una solución así compuesta:



432

	Glucosa	60 g
	Levadura seca	10 g
	K_2HPO_4	0,2 g
	$MgSO_4$	0,5 g
5.	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,010 g
	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,010 g
	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,001 g.

Esta suspensión se distribuye a razón de 30 cc por matraz de 300 cc y se incuba en las condiciones que se han descrito antes. Al cabo de 4 días, se obtiene una

10. cantidad de carotenoides correspondiente a 200 gammas/cc.

E J E M P L O 7.

En un fermentador de 10 litros, se esterilizan,

15. mediante calentamiento a $120^{\circ}C$ durante 40 minutos, 6 litros del siguiente medio de cultivo.

	Solubles de los destiladores	50,6 g
	Levadura seca	5 g
20.	Dextrina	80 g
	$MgSO_4$	0,5 g
	K_2HPO_4	0,2 g
	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 mg
	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 mg
	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	1 mg
25.	Agua del grifo	1000 cc



297432

pH 6,5.

Para inocular este medio, se usan 600 cc de un cultivo vegetativo preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

5.

Se incuba el cultivo a 28°C con una corriente de aire de 5 litros por minutos y con agitación a 350 r.p.m.

Al cabo de 6 días se obtiene una producción de 280 gammas/cc de carotenoides y 100 gammas/cc de amino-
sidina.

10.

EJEMPLO 8.

Se ha preparado un pienso para polluelos de la composición siguiente (las cifras significan porcentajes en peso):

15.

Harina de pescado 6,00

Extracción de soja 25,75

Levadura de cerveza 1,00

Alfalfa deshidratada 1,00

20.

Maiz 60,20

Fosfato tricálcico 1,40

Carbonato cálcico 0,80

Cloruro sódico 0,30

Grasa estabilizada 1,55

25.

Mezcla de vitaminas y oligoelementos 2,00.



297462

La mezcla de vitaminas y oligoelementos tiene la composición siguiente (los pesos se refieren a 2 kg de mezcla):

5.	Vitamina D ₃	100.000 U.I.
	Vitamina PP	1,5 g
	Vitamina B ₁₂	1 mg
	Riboflavina	300 mg
	Pantotenato cálcico	1,5 g
10.	Cloruro de colina	75 g
	DL - metionina	20 g
	Clorotetraciclina	1 g
	Penicilina G-procaína	5 g
	Cobalto	25 mg
15.	Hierro	1,5 g
	Yodo	50 mg
	Manganeso	7,5 g
	Zinc	4, g
	Cobre	125 mg
20.	Vehículo	c.s. (para completar).

A 100 kg de pienso de la composición anterior, se añadieron 150 g de micelio seco en polvo.

Administrado a los polluelos, el pienso anterior, que contiene carotenoides, suscita al cabo de 60 días un aumento de peso igual al obtenido con un pienso de la com-



237462

posición anterior que contenga 1,000.000 U.I. de vitamina A en lugar del micelio.

5 Se ha comprobado además que los polluelos alimentados con pienso de la composición anterior presentan una pigmentación cutánea y de los huevos notablemente superior a la obtenida con el pienso normal que contiene vitamina A.

E J E M P L O 9.

10 Se ha preparado pienso para cerdos de la composición siguiente:

	Harina de pescado	4,0
	Soja de extracción	16,0
	Maiz	61,3
15	Salvado de trigo	12,0
	Harina de alfalfa	3,0
	Fosfato tricálcico	1,5
	Carbonato cálcico	0,7
	Cloruro sódico	0,5
20	Mezcla de vitaminas y oligoelementos	1,0.

La mezcla de vitaminas y oligoelementos tiene la composición siguiente (los pesos se refieren a 1 kg de la mezcla):

	Vitamina D ₃	200.000 U.I.
25.	Vitamina B ₁₂	2 mg



297462

	Vitamina PP	2 g
	Riboflavina	300 mg
	Pantotenato cálcico	1 g
	Cloruro de colina	50 g
5.	DL - metionina	25 g
	Clorotetraciclina	1,5 g
	Penicilina G-procaina	500 mg
	Zinc	2,5 g
	Hierro	2,8 g
10.	Cobre	500 mg
	Cobalto	25 mg
	Yodo	50 mg
	Manganeso	2 g
	Vehículo	c.s. (para completar).

15. A 100 kg de pienso de la composición anterior, se añadieron 250 g de micelio seco de Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus.

- Administrado a cerdos de 20 kg de peso, el pienso anterior, que contiene carotenoides, suscita al cabo de 60 días un aumento de peso correspondiente al que se obtiene administrando un pienso de la composición anterior, pero que contenga 1,000.000 de U.I. de vitamina A en lugar del micelio.

= . =



297462

N O T A

Descrito el objeto de la invención, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la demanda italiana núm. 4965/63 del 11 de Marzo de 1.963.

5. 1. Un procedimiento para la preparación de carotenoides y aminosidina, caracterizado por cultivarse el microorganismo Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioides en cultivo sumergido y en condiciones aeróbicas, en un medio nutritivo acuoso que contenga una fuente de carbono, de nitrógeno, y de sales minerales y por separarse el micelio, que contiene carotenoides, del caldo de fermentación, que contiene aminosidina, por filtración y centrifugación de manera conocida.
10. 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por efectuarse la fermentación a temperatura de 24^o a 32^oC, por 1 a 8 días y con pH de 5 a 8.
15. 3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado por efectuarse la fermentación en presencia
- 20.



297462

de glucosa, dextrina, lactosa o manitol, como fuente de carbono, y/o en condiciones de ventilación intensa, para obtener grandes rendimientos de carotenoides y bajos rendimientos de aminosidina.

5

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado por efectuarse la fermentación en presencia de almidón, como fuente de carbono, y /o en condiciones de ventilación escasa, para obtener grandes rendimientos de aminosidina y bajos rendimientos de carotenoides.

10

5. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado por efectuarse la fermentación en presencia de aceite de semilla de soja o aceite de semilla de algodón, como fuente de carbono, para obtener buenos rendimientos tanto de carotenoides como de aminosidina.

15.

6. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por efectuarse la fermentación en las condiciones de la reivindicación 4, para obtener grandes rendimientos de aminosidina, y por fermentarse luego en las condiciones de la reivindicación 3 el micelio obtenido, para obtener grandes rendimientos de carotenoides, con lo que se obtiene al final gran contenido de carotenoides en el micelio y gran contenido de aminosidina en el caldo de fermentación.

20.
25.



297462

7. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por separarse del micelio del microorganismo Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioides carotenos y xantófilos, de manera conocida, por extracción con un disolvente orgánico, de preferencia acetona, cloroformo, metanol o cloruro de metileno, seguida por separación cromatográfica sobre sustancias adsorbentes, tales como óxido de magnesio, compuestos silíceos o alúmina.
- 5.
8. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por secarse y molerse según las técnicas conocidas el micelio del microorganismo Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioides, para añadirlo al pienso para los animales.
- 10.
9. Un procedimiento para la preparación de carotenoides y aminosidina.
- 15.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de veintiseis páginas, foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

25.

Madrid, 210 MAR 1964

SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA.

p.a.

JAIME ISERN

p. p.