



PATENTE DE INVENCIÓN

Br. 285.

302907

302907

Memoria Descriptiva
sobre

"Procedimiento de preparación de un aditivo
para piensos de animales"

Solicitante: TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION LIMITED,
entidad israelita, residente en Haifa, Israel.

Este invento se refiere a un aditivo pa
ra piensos animales y a nuevas mezclas para los
mismos que contienen el aditivo mencionado. El adi
tivo que este invento se refiere se destina espe
5. cialmente a las aves de corral especialmente vola--

302907



tería tal como pollos, para aumentar el color de las yemas de los huevos y oscurecer las patas, picos, plumas, grasa y carne. Sin embargo, dicho aditivo puede emplearse para oscurecer carnes distintas de las de aves de corral. Consiguientemente, puede suministrarse con buen efecto a otros animales de la granja en la que sea conveniente un color más oscuro en la carne.

- El objeto principal de este invento es
10. proporcionar un medio sencillo, eficiente y económico para tratar las aves ponedoras con objeto de comunicar un color más elevado a las yemas de los huevos y dar a la carne un color más oscuro. Otro objeto de este invento es proporcionar nuevas mezclas para el
 15. alimento de la volatería que no solo eleven el color de las yemas de los huevos sino que además se utilicen eficientemente por las aves de corral. Todavía otro objeto de este invento es proporcionar un aditivo para los piensos de las aves de corral que produzca eficientemente un color más pronunciado en las yemas de los huevos sin efecto perjudicial. Otro nuevo objeto todavía es proporcionar un pienso animal que oscurezca el color de la carne de los animales de la granja distintos de la volatería. Otros objetos, características y ventajas de este invento resultarán
 25. evidentes de la descripción siguiente leída en combinación con las reivindicaciones adjuntas.

Es bien sabido que el color de las yemas de los huevos y de la carne de las aves, es afectado

30. por la naturaleza de los piensos que sirven de ali -

302967



mentación para la volatería. Por ejemplo, los polluelos criados con piensos formulados, sin material verde o fresco o con muy poca cantidad del mismo produce huevos con yemas de color pálido en mayor cantidad que el color amarillo intenso deseado. Se ha comprobado que esta falta de color se debe a la deficiencia de xantofila.

5.

En los distintos remedios anteriores, para este inconveniente de pastos formulados,

10.

Con anterioridad se habían propuesto varios remedios para este inconveniente de los pastos formulados. Así, se han añadido a los pastos, para mejorar el color de las yemas de huevo y de la carne, alfalfa y harina de gluten de cereales, pigmentos de plantas naturales, pigmentos sintéticos tales como β -apo-8'-carotenal y hongos productores de xantofila.

15.

Sin embargo, ninguno de estos remedios ha sido completamente satisfactorio. La alimentación con alfalfa, ha demostrado ser relativamente inestable y oponerse a la eficiencia de los pastos. La harina de gluten de cereales no es satisfactoria a causa de la gran variación de su contenido de xantofila. Los concentrados comerciales de xantofila se consideran demasiado caros para el uso en alto grado, y los hongos productores de xantofila son difíciles de producir.

20.

25.

De acuerdo con este invento, las aves de corral u otros animales de granja, se alimentan con un cultivo seco de fermento que tiene característi-

30.

302907



- cas carotenógenas. Los fermentos carotenógenos de este invento, son fácilmente asequibles, económicos y producidos con relativa facilidad. Adicionalmente, suministran el denominado "factor no identificable de crecimiento" y constituyen una excelente fuente de vitaminas. A causa de estos factores, los aditivos a base de fermento carotenógeno de este invento constituyen un avance significativo en la técnica. Los fermentos carotenógenos preferidos de este invento pertenecen a la familia Cryptococcales, sub-familia Rhodotoruloideas. Otros fermentos carotenógenos desde luego previstos por este invento, pertenecen a la familia Sporobolomycetales. Debe tenerse presente además, que este invento no se limita a los fermentos taxonómicamente designados sino que comprende en general todos los fermentos carotenógenos. Ninguno de los alimentos conocidos o de las preparaciones a base de fermentos, se ha mencionado en ningún caso que produzca algún efecto sobre el color de las yemas de huevo y/o la carne. Este efecto se realiza por primera vez de acuerdo con este invento.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- La taxonomía de la familia de Cryptococcales (Asporogenos) fermento sub-familia Rhodotoruloideas se describe por completo en muchos manuales científicos, por ejemplo en Lodder, los fermentos, estudio taxonómico (North Holland Publ. Co., Amsterdam) 1.952. La sub-familia Rhodotoruloideas, género Rhodotorula, se prevé especialmente por este invento. En la familia Sporobolomycetas, que se
- 25.
- 30.

302907



describe también en manuales corriente sobre fermentos, los géneros *Sporobolomyces* y *Bullera*, son los más importantes para los fines de este invento.

- Los cultivos secos de fermentos carotenégenos de este invento se obtienen después de la fermentación de un nutritivo acuoso que contenga orígenes de carbón y nitrógeno, un suplemento mineral y, si se desea un suplemento vitamínico. Después de fermentación, solo significa que el fermento ha producido alguna fermentación antes de su recogida. Esta fermentación, sin embargo, puede haberse interrumpido arbitrariamente y no haber llegado necesariamente a un descanso natural.

- El fermento recogido, si se desea, puede someterse a un tratamiento de hidrólisis antes de secarse y usarse. De este modo, la pigmentación potencial aumenta dado que el pigmento se absorbe más fácilmente por la sangre. La autólisis, o sea el procedimiento de descomponer células por incubación a una temperatura elevada, es también susceptible de uso para aumentar la absorción en la sangre. Incluso sin hidrólisis ni autólisis la coloración de la yema de huevo se consigue por el empleo de este invento.

- Los fermentos carotenógenos, de este invento pueden usarse de cualquier modo conveniente. Si el fermento se suministra en forma de nódulo, polvo, suspensión en agua o similar, sin formulación, la dosis ha de ser aproximadamente de 1 a 6 gramos por día para las aves de corral. Es evidente, sin embargo, que la dosificación variará considerablemente -



con la naturaleza y tamaño de la alimentación animal sin separarse del alcance de este invento.

- Se prefiere emplear estos fermentos carotenógenos como aditivos de las composiciones alimenticias para los animales. Cuando se emplean como aditivo, los fermentos deben constituir aproximadamente de 0,5 a 5% en peso de la mezcla alimenticia. Para los peritos en la materia resultará evidente que las cantidades por encima y por debajo de esta proporción son también de uso posible. En términos generales, sin embargo, las concentraciones inferiores a 0,5 % en peso dan por resultado un oscurecimiento insuficiente del color de la yema cuando la mezcla alimenticia se suministra a las aves de corral. Por encima del 5% en peso, el color de la yema puede resultar demasiado oscuro para ser admitido por el público. Prácticamente, la cantidad de fermento se varía de acuerdo con las exigencias populares, sin separarse del alcance de este invento.
5. En todos los casos, sin embargo, una proporción máxima del alimento animal constituirá la ración básica, y una proporción pequeña estará constituida por el fermento carotenógeno. Si se desea, puede emplearse en una fórmula única, más de un fermento carotenógeno.
10. 15. 20. 25.

Los fermentos carotenógenos de este invento pueden incorporarse en una gran variedad de mezclas para el alimento de las aves de corral, si no se limitan a ninguna fórmula. La tabla siguiente indica algunos de los muchos piensos a que pueden

30.



añadirse los fermentos carotenógenos de este invento, como sustituto para los suministrados de xantofila, tales como cereal amarillo y harina de alfalfa. Debe tenerse presente que las proporciones de los ingredientes pueden variarse y utilizar ingredientes equivalentes en piensos a los que estos fermentos se añaden, sin separarse del alcance de este invento.

EJEMPLOS DE MEZCLAS DE ALIMENTACION

	Pollos has ta 7-8 se- manas.	Pollos has ta la pos- tura.	Pollas en puesta hasta 7 semanas	Pollos - tiernos más de 7 semanas	Pollos de más de 7 semanas
	% peso	% peso	% peso	% peso	% peso
Polvo de leche descremada	2.0	-	-	2.0	2.0
Harina de pes- cado	3.0	2.0	2.5	3.0	2.0
Harina de si - miente de soja	21.0	10.0	16.0	23.0	16.0
Harina de alfal- fa	2.5	2.5	5.0	2.5	2.5
Salvado de trigo	5.0	10.0	5.0	-	-
Sorbo	63.3	71.8	27.2	66.2	66.2
Cereal amarillo	-	-	35.0	-	-
"Shell/stone"	1.5	1.8	6.5	1.5	1.5
D.C.P.	1.4	1.6	2.5	1.5	1.5
Cloruro de sodio	0.04	0.3	0.3	0.3	0.3
DL-Metionina	-	-	-	0.04	0.04

309117



A esto se añaden mezcla de sal mineral 7
mezcla de vitaminas
antioxidante (BHT)
antibióticos

5. Los medios nutritivos utilizados para la propagación y fermentación con objeto de obtener los cultivos de fermentos en un estado de post-fermentación, son de tipo convencional. El origen de carbono puede ser, por ejemplo, dextrosa, sucrosa, azúcar, melaza y similares. Como origen de nitrógeno pueden citarse sulfato amónico, nitrato amónico, carbonato amónico, nitrato potásico y urea, así como material orgánico rico en nitrógeno tal como peptona, líquido de maceración del maíz, harina de soja, extractos de fermentos y similares. Como suplemento mineral pueden citarse fosfato potásico, sulfato magnésico, carbonato cálcico, cloruro férrico, sulfato de manganeso, sulfato de cinc o cualquier combinación de estas sales. Como suplemento vitamínico, pueden indicarse tiamina -
10. que es esencial para la propagación de la Rhodotorula mucilagonosa.
- 15.

Los fermentos del género Rhodotorula pueden cultivarse fácilmente en condiciones de laboratorio y las variaciones y mutaciones de cualquier especie de la misma pueden prepararse por procedimientos convencionales. El cultivo puede realizarse bien por el método de crecimiento en superficie o por crecimiento sumergido.

25.

La recuperación de los cultivos después de la fermentación, puede realizarse de cualquier modo -

30.

302937



adecuado tal como por centrifugado, filtración a través de un filtro-prensa, secado por pulverización y análogos.

5. Este invento se aclara por los ejemplos siguientes que no son limitativos; todas las indicaciones de composición son en peso/peso %.

EJEMPLO 1.

10. Se inculó un cultivo de *R.mucilaginososa* en un frasco de sacudida de 500 cc, que contenía 100 cc de medio de siembra constituido por una solución en agua corriente de pH 6 y que contenía 5 % de glucosa, 1,3 % de peptona y 0,2 % de extracto de fermento. Después de 48 horas de crecimiento en una máquina de sacudir a 300^oC, el cultivo se trasladó a una segunda etapa que consistía en 4 frascos de sacudida de 15. 2.000 cc. que contenían 500 cc de medio de siembra cada uno. Después del crecimiento adicional de 48 horas, el cultivo se introdujo en un propagador de fermentos de acero inoxidable, con 8 litros de medio constituido por 20. una solución de agua corriente que contenía 4,6 % de sucrosa, 1,2 % de lactato amónico preparado de ácido láctico de grado comestible, 0,5 % de fosfato monoácido de potasio, 0,5 % de sulfato magnésico bihidratado, 0,001% de cloruro de hierro hexahidratado y 0,0001% de cloro - 25. de tiamina. El pH se ajustó con ácido clorhídrico 10N, al 5 %. La fermentación se realizó a 20^o y la aireación, a razón de 1,5 l/l medio/minuto. Después de 30 a 35 horas de crecimiento, se inocularon 4 l del cultivo en un propagador análogo que contenía 16 l. del medio ante - 30. rior con adición de 0,1 % del agente de superficie acti



302907

va TWEEN 80 (nombre comercial de una mezcla de éteres - de polioxietileno. La fermentación se condujo en condiciones análogas a las anteriores durante otras 30-32 horas. Al final de la fermentación, todo el azúcar se había consumido; el pH era de 4,3 a 4,5. No se precisó -

5. ajuste del pH durante ninguna de las dos etapas en el propagador de fermentos. En este momento, se obtuvo una cerveza con un peso en seco de 2,8 a 3% y un contenido total de carotenoides de 1.800 a 2.000 u g/g de sólidos

10. secos (expresados como equivalentes de caroteno).

El cultivo se recogió retirando el líquido en exceso por decantación y concentración por medio de una centrífuga de cesta. La suspensión espesa restante de células de fermento, se secó por pulverización en un -

15. atomizador. El polvo de fermento así obtenido contenía 8% de agua. Se incorporó en la mezcla alimenticia siguiente.

	Simiente de sorgo	67.5%
	Harina de soja desgrasada	21.0%
20.	Harina de pescado	2.0%
	Granos de piedra caliza	6.5%
	Fosfato bicalcico	2.5%
	Sales minerales	0.5%

A 100 kg de la mezcla alimenticia anterior,

25. se agregaron 300 g de una preparación vitamínica comercial, junto con algunos granos de basalto y "aureofac". En seis diferentes ensayos, el polvo de fermento se incorporó al nivel de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 %.

El ensayo en el gallinero se realizó del modo siguiente: se separaron 7 grupos de 12 aves cada -

30.



302907

una (4 Rock y 8 Rock x Leghorn por grupo) en un sistema de cajas de 2 aves cada una. La alimentación era "ad libitum". La duración del experimento fué de 28 días. Durante la primera semana las aves no recibieron suplemento alguno de fermento con objeto de suprimirles los pigmentos carotenoides. En cuanto a la segunda semana, cada uno de los grupos 2 a 7 recibieron uno de una de las seis mezclas anteriores mientras que el grupo 1 se utilizó como testigo. Cada día se abrieron 4 huevos por grupo y el color de la yema se determinó utilizando la escala "Roche" para la evaluación del color de los huevos. Los resultados figuran en la tabla 1.

TABLA Nº 1

Grupo nº	% de fermento rojo añado.	Huevos en total obtenidos (28 días)	Media nº de la escala Roche obtenido después de días			
			7	14	21	28
1	0	268	3.5	3.0	3.3	3.5
2	0.5	265	4.0	5.8	5.8	6.0
3	1.0	257	4.5	6.0	6.3	6.8
4	2.0	267	4.3	6.0	6.5	7.0
5	3.0	272	4.2	6.0	6.5	6.8
6	4.0	260	4.5	6.3	7.0	7.3
7	5.0	287	3.5	6.0	7.3	7.5



EJEMPLO 2.

302907

- Se propagó análogamente al ejemplo 1 un cultivo de *R. mucilaginoso*, excepto que las últimas etapas de fermentación se realizaron en una solución en agua corriente como medio que contenía -
5. 4,6 % de sucrosa sulfato amónico 0,7 %, fosfato monoácido de potasio 0,5%, sulfato magnésico heptahidratado 0,5 %, y cloruro de hierro hexahidratado 0,005 % e hidrocioruro de tiamina 0,0001%. El pH se ajustó con
10. ácido clorhídrico 10N a 5,5. Durante la fermentación, el pH se conservó a 4,5-4,8 por adiciones sucesivas de hidrato sódico al 10%. La fermentación se terminó después de 16-18 horas proporcionando un 2,5-2,8 % de células de *Rhodotorula* y un contenido total de carotenoides de 1.700-1.800 u g/g de materia sólida. El cultivo se recogió, se concentró en un filtro prensa y se añadió a la mezcla alimenticia, al nivel del 1%.
15. Las yemas obtenidas después de ensayos de alimentación análogos a los del ejemplo 1, tenían un color de
20. valor 6-7.

EJEMPLO 3.

- Se propagó un cultivo de *R. glutinis*, análogamente al ejemplo 1, excepto que las etapas de fermentación se realizaron con una solución de
25. agua corriente como medio y contenían 5 % de dextrosa, 1,1% de nitrato potásico, 0,1 % de fosfato monoácido de potasio, 0,1 % de sulfato magnésico heptahidratado, 0,0001 % de cloruro de hierro hexahidratado, 0,0001 % de sulfato de cinc heptahidratado, 0,0001 %
30. de sulfato de magnesio hidratado, 0,1 % de Tween 40



(marca comercial de una mezcla de éteres de polioxietileno). El pH se ajustó a 5 y se mantuvo de 4,8 a 5,2 durante la fermentación.

5. Se obtuvo un caldo de cultivo que contenía de 2,5 a 2,8 % de materia sólida, con un contenido total de carotenoides de 1.600-1.700 u g/g de materia seca. Las células de fermentos se recuperaron de modo análogo al del ejemplo 2 y se incorporaron en una mezcla de alimentación a un nivel de 1%. Las yemas obtenidas después de un ensayo de alimentación análogo al del ejemplo 1, tenían un valor de color de 6-7.

EJEMPLO 4.

15. Se examinó la posibilidad de emplear agua del mar para la propagación de segmentos pigmentados. Se preparó un cultivo de *R. mucilaginosa* en frascos de sacudida en una solución de agua de mar como medio, ajustada al pH de 7 y que contenía: dextrosa 5 %, sulfato amónico, 7 %; fosfato monoácido de potasio 0,05%, sulfato magnésico heptahidratado, 0,05%,
20. carbonato cálcico 1,5 %; (el agua del mar se obtuvo de la bahía de Haifa). Al cabo de 6 días de crecimiento se obtuvo un caldo que contenía 2,5% de materia sólida con un contenido total de carotenoides de unos 1.500 u g/g de materia seca.

25. EJEMPLO 5.

30. Se obtuvo una masa de fermento de *Rhodospirillum rubrum*, análogamente al ejemplo 1 y luego se re-suspendió en una pequeña cantidad de ácido diluido (1 g de peso en seco en 10 cc de NHCl 0,5). Se realizó la hidrólisis a 100°C durante 30 minutos en



un baño de agua. El exceso de ácido se neutralizó - con unas gotas de hidrato sódico concentrado. Las células se recuperaron por decantación y filtración. El fermento hidrolizado de rhodotorula se añadió a 5. la mezcla de alimentación, a una concentración de - 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 %. Los resultados figuran en la tabla nº II.

TABLA Nº 2

Grupo nº	% de fermento rojo añadido hidrolizado	Número medio de la escala Roche - después de días		
		7 (a)	14	21
1	0	3.5	3.5	3.5
2	0.5	3.8	6.2	7.5
3	1.0	4.0	6.5	8.0
4	2.0	4.3	7.3	8.5
5	4.0	3.5	8.6	10.0(aa)

(a) El agotamiento del contenido de ca rotenoide se realizó durante 7 días.

(aa) Rojo pigmentación no-natural

302907



EJEMPLO 5.

- Se inoculó un cultivo de *Sporobolomyces salmonicolor* en un frasco de sacudida de 500 ml que contenía 100 ml de medio de siembra, dextrosa 5 %, peptona 0,5 % extracto de fermento 0,2 %; pH, 6,8. Después de 40 horas de crecimiento en una máquina de sacudir a 25°, el cultivo se traspasó a la segunda etapa - constituida por medio de siembra con 5 % de inóculo de la primera etapa. Al cabo de 48 horas de crecimiento a 25°C, el cultivo de la siembra se trasladó a un nivel de 5 % a un propagador de fermento que contenía el medio siguiente; dextrosa 5 %, sulfato amónico 0,5 %, extracto de fermento 0,1 %, fosfato monoácido de potasio 0,05%, sulfato magnésico heptahidratado, 0,05 %, cloruro de hierro hexahidratado 0,0001 %. La fermentación se realizó a una temperatura de 27°; aireación 2 l/1 - minuto. El pH se conservó alrededor de 5 por adición - manual de ácido sulfúrico o hidróxido potásico 10N.

- El cultivo se recogió después de 60 horas con una concentración ponderal en seco de 2,7 % y se concentró por centrifugación. Se obtuvo un polvo seco de fermento de la suspensión espesa por secado mediante pulverización. El polvo de fermento se incorporó en la mezcla de comida siguiente.

25.	Granos de sorgo	71.8 %
	Harina de soja	10.0 %
	Salvado de trigo	10.0 %
	Harina de pescado	2.0 %
	Fermento de <u>Sporobolo</u>	
30.	myces	2.5 %

302907



Piedra caliza	1.8 %
D.C.P.	1.6 %
NaCl	0.3 %

5. Se añadieron granos de basalto y "aureo - fac" como en el ejemplo 1. Después de un experimento análogo de alimentación, el color de la yema de los huevos tenía un valor de 6,5 a 7.5.

EJEMPLO 7.

10. Se inculó un cultivo de rhodotorula aurantiacea en un frasco de sacudida de 500 cc que contenía 100 cc de medio de siembra: maltosa 0,5 %, Casitona (digesto pancreático de caseína) 0,5 %, hidrolizato de caseína (ácido) 0,1 %, autolizado de fermento de panaderos 0,15 % en agua corriente, pH, 6,8.

15. Después de 48 horas de crecimiento en una máquina sacudidora a 30°C, el cultivo se trasladó a la segunda etapa constituida por un medio de siembra con 5 % de inóculo de la primera etapa.

20. Después de otras 60 horas de crecimiento a 30°C, el cultivo de siembra se trasladó a un nivel de 7 %, al interior de un propagador de fermentos que contenía el medio siguiente: sucrosa comercial, 5 %; sulfato amónico 0,4 %; glutamato monosódico, 0,05 %, autolizado de fermento, 0,2 %; fosfato monoácido de potasio, 0,05%; sulfato magnésico heptahidratado, 0,05 %; cloruro de hierro hexahidratado, 0,0001 %, Tween 80, 0,1 %.

25.

30. La fermentación se realizó a una temperatura de 30°C; aireación 1,5 l/l/minuto. El pH se conservó alrededor de 5 por adición manual de ácido o

302907



álcali. El cultivo se recogió después de 48 horas a una concentración ponderal en seco de 2,5 % y se concentró por centrifugación. Se obtuvo un polvo seco de fermento, por secado mediante pulverización.

5. Se incorporaron células secas de Rhodotoru la aurantiácea en una mezcla de alimentación (ejemplo 1), a una concentración de 2 % peso/peso. Las yemas de los huevos tenían un valor de color de 7 - 8.

N O T A

10. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Israel acogiéndose, por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años, en España "Procedimiento de preparación de un aditivo para piensos de animales", caracterizándose por lo siguiente:

25. 1ª.- "Procedimiento de preparación de un aditivo para piensos de animales", especialmente aves, caracterizado por comprender un cultivo seco de fermento carotenógeno recogido después de fermentación de un medio nutritivo acuoso que contiene origenes de carbono y Nitrógeno, un suplemento mineral y vitamínico.

30.



302907

2ª.- Procedimiento, según reivindicación-
1ª, caracterizada, porque el cultivo de fermentos se
ha sometido a un tratamiento de hidrólisis.

5. 3ª.- Procedimiento, según reivindicación -
1ª, caracterizada, porque el cultivo de fermentos se
ha sometido a un tratamiento de autólisis.

10. 4ª.- Procedimiento, según cualquiera de
las reivindicaciones anteriores, caracterizado, por-
que el fermento carotenógeno pertenece a la familia -
Cryptococaceas, sub-familia Rhodotorulaideas, genero-
Rhotorulas.

15. 5ª.- Procedimiento de preparación de un -
aditivo para piensos de animales, según reivindicacio-
nes 1ª a 3ª, caracterizado, porque el fermento carote-
nógeno pertenece a la familia Sporobolomycetaceas.

6ª.- Procedimiento de preparación de un
aditivo para piensos de animales, con un rendimiento-
en disolución que oscila entre 2 a 3 % en peso.

20. 7ª.- "Procedimiento de preparación de un
aditivo para piensos de animales"; tal y como queda -
substancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta memoria consta de dieciocho hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid,

27 AGO 1964

TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT
FOUNDATION LIMITED.

J. GOMEZ ALBU Y MODEI