



18 8997

188997

- 9 JUL. 1949

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana,
establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva
Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR SUSTANCIAS VITAMINICAS".

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

Este invento se refiere en general a la pro-
ducción por fermentación de sustancias de valor terapéutico
y nutritivo, y en particular a un método perfeccionado pa-
ra la producción microbiológica de sustancias vitamínicas
que tienen propiedades promotoras del crecimiento del

5



188997

micro-organismo lactobacillus lactis Dorner. También se refiere a un método perfeccionado para la producción microbiológica de vitamina B 12. La vitamina B 12 es una combinación cristalina, de color rojo, soluble en agua, derivable del hígado y valiosa en el tratamiento de ciertos tipos de anemia humana, por ejemplo, la anemia perniciosa. Es además valiosa como factor duplitivo para animales.

Las sustancias vitamínicas tales como la vitamina B 12 que se producen utilizando nuestro procedimiento perfeccionado, se ensayan convenientemente utilizando la respuesta al crecimiento del micro-organismo lactobacillus lactis Dorner en las condiciones de ensayo descritas por Shorb (J. Biol. Chem. 169, 455-6). Las potencias de estas sustancias vitamínicas y de caldos fermentados y concentrados enriquecidos en ellas se expresan en términos de actividad LLD a base de un patrón de hígado arbitrario que tiene una potencia de 1000 unidades LLD por milígramo. Se ha determinado que la vitamina cristalina pura B 12 tiene una actividad LLD de unos 11.000.000 LLD de unidades por mg.

Las sustancias vitamínicas que tienen actividad LLD se producen por fermentación de agentes nutritivos por razas seleccionadas de varias especies de subtribu Fungi. La potencia de los caldos resultantes de la fermentación de agentes nutritivos ordinarios por dichos organismos, es sin embargo en extremo pequeña en comparación con las potencias de la vitamina pura B 12. Estos productos varían en su contenido de sustancias de actividad LLD,



1949

según la especie de hongo empleada, pero ordinariamente contiene una actividad IID equivalente a un contenido de vitamina B 12 del orden de 0.00003 mg/ml. Es en extremo difícil separar vitamina pura B 12 o concentrados de alta actividad IID de las grandes cantidades de impurezas presentes en dichos medios. Por tanto, ha sido de gran importancia encontrar una manera de aumentar la potencia IID del caldo fermentado y aumentar al mismo tiempo la concentración de sustancias de actividad IID con relación a los sólidos totales del caldo.

Ahora se ha descubierto que estos sujetos pueden conseguirse propagando razas de hongos que producen sustancias dotadas de actividad IID, en agentes nutritivos acuosos a los que se ha añadido cobalto. Se ha descubierto que, cuando estos hongos se cultivan en presencia del cobalto añadido, se producen por el micro-organismo cantidades muy aumentadas de sustancias de actividad IID. Esto da por resultado un caldo final de actividad IID muy aumentada y también un gran aumento en la concentración de vitamina B 12 en relación con el total de sólidos del caldo. Este mayor rendimiento microbiológico de material de actividad IID no sólo facilita el aislamiento de la vitamina pura B 12 del caldo fermentado, sino que también hace posible usar el contenido sólido del caldo como suplemento de alimentación para animales.

Es en especial sorprendente que la adición del cobalto pueda estimular la mayor producción microbiológica de sustancias de actividad IID, tales como la vitamina



1949

188997

B 12 porque se sabe que el cobalto es en extremo tóxico para muchos micro-organismos. Hemos descubierto que, a concentraciones más altas, el cobalto es de hecho también tóxico para las razas de hongos que producen sustancias dotadas de actividad ILLD. Por ejemplo, una cantidad de cobalto, (en forma de nitrato de cobalto) superior a 10-20 partes por millón a base del agente inhibe de hecho la producción de sustancias de actividad ILLD por el hongo Streptomyces griseus.

La cantidad de cobalto presente durante la fermentación puede variar según el agente usado, pero ordinariamente preferimos emplear una cantidad de cobalto entre 0.1 y 20 partes aproximadamente por millón de partes del agente. En algunos casos puede ser deseable usar cantidades mayores o menores de cobalto según la toxicidad de éste para el hongo Streptomyces griseus empleado. En el caso de Streptomyces griseus, hemos preparado caldos de fermentación de alta actividad ILLD y hemos conseguido excelentes rendimientos de vitamina cristalina B 12 cultivando el micro-organismo en agentes que contenían aproximadamente dos partes por millón de cobalto (como nitrato de cobalto).

El cobalto puede añadirse en forma metálica, pero ordinariamente se añade en forma de una combinación del mismo, con preferencia una sal como el nitrato de cobalto; o bien en la forma de una sal natural de cobalto o complejo tal que pueda estar presente en agentes nutritivos microbianos ricos en cobalto. En vista de lo inconveniente de ofrecer la cantidad de cobalto deseada añadiendo estos materiales nutritivos naturales, preferimos añadir el cobalto en forma



188997

de una sal del mismo.

Al realizar el presente invento, podemos emplear agentes nutritivos ordinariamente utilizados en la propagación de hongos. La producción de actividad LLD por un hongo dado puede ciertamente variar según el agente nutritivo usado, pero se ha descubierto que, para cualquier tipo de agente deficiente en cobalto, la adición de pequeñas cantidades de éste da por resultado invariable un gran aumento en el rendimiento de sustancias de actividad LLD.

Los agentes nutritivos usuales incluyen una fuente de carbono asimilable, otra de nitrógeno asimilable, sales inorgánicas y factores de crecimiento cuando se desea. El carbono puede suministrarse por un hidrato de carbono tal como dextrosa, maltosa, xilosa, azúcar invertido, jarabe de maíz, etc. El nitrógeno puede suministrarse por una sal amónica, amino-ácidos o proteínas, tales como habas de soya, avena, levadura de cerveza, extracto de carne, cáina de sangre, carne de proteína y raspaduras de huesos, harina de salmón, harinas de pescado, solubles de pescado, solubles de destilería, etc. Si se quiere, los hongos pueden propagarse usando proteínas (o amino-ácidos) sin que esté presente ningún hidrato de carbono en el agente, y en tal caso las proteínas (o amino-ácidos) sirven como fuente del carbono y el nitrógeno requeridos por el micro-organismo.

Los micro-organismos cuyas razas seleccionadas consideramos adecuada para nuestra fermentación, utilizando agentes nutritivos acuosos que contienen cobalto añadido, forman parte de los hongos, según se definen en las páginas



188997

1 y 2 del libro " An Introduction to Industrial Mycology",
de Smith y Raistrick (Londres, Edwar Arnold and Co, tercera
edición 1946) esto es, mixomicetos, esquizomicetos y eumi-
cetos. Son especialmente adecuados los esquizomicetos y en
5 particular ciertas razas de la especie Streptomyces griseus
que pueden usarse también para la producción de los anti-
bióticos estreptomycinina y griseina. Otras especies de
Streptomyces, tales como Streptomyces albidoflavus, Strep-
tomyces colombienses nov. sp. Streptomyces roseo chromogenus
10 y Streptomyces antibioticus incluyen razas que producen
grandes rendimientos de sustancias de actividad LLD. Otros
esquizomicetos adecuados son especies del género Clostridium,
y hemos descubierto que razas seleccionadas de las siguien-
tes especies producen sustancias de actividad LLD en las con-
15 diciones de fermentación de nuestro procedimiento: Clostridium
tetanomorphum, Clostridium cochlearium, Clostridium flabe-
llicerum y Clostridium butydicum. Otros micro-organismos
entre los hongos que hemos descubierto que también producen
actividad LLD son Torula, Eremothecium ashbyii y Escherichia
20 coli. Deseamos recalcar, sin embargo, que para cualesquiera
especies dadas de hongos, es preciso seleccionar razas que
produzcan sustancias de actividad LLD. Nuestro invento no
se limita a ningún hongo en particular ni incluye cualquier
raza de un hongo dado. Por otra parte, cada micro-organismo
25 tratado hasta ahora que produce sustancias de actividad
LLD producirá estas sustancias en rendimiento muy aumentado
cuando se propaga en un agente nutritivo acuoso que contenga
una concentración de cobalto óptima.



49

188997

El agente se esteriliza y el agente esterilizado que contiene la deseada cantidad de cobalto se inocular con un cultivo del hongo seleccionado y la mezcla se incuba hasta que se obtiene la actividad óptima ILD. La fermentación se realiza ordinariamente durante un período de unos dos a siete días aunque si se quiere puede emplearse tiempo más corto o más largo. Usualmente la incubación se lleva a cabo en condiciones sumergidas y a temperaturas adecuada para el hongo específico empleado.

La vitamina B 12 puede aislarse de la mezcla de fermentación en forma cristalina si se quiere filtrando el caldo de alimentación y tratando el caldo filtrado con carbón vegetal activado, adsorbiendo así la vitamina B 12. El carbón activado se lava con una solución acuosa de piridina o α -picolina y el lavado resultante se evapora a sequedad. El concentrado sólido se extrae con un alcohol alifático bajo, tal como alcohol metílico, y el extracto alcohólico se hace pasar por una columna empaquetada con alúmina activada con lo cual ésta adsorbe la vitamina B 12. La columna se desarrolla con más disolvente de alcohol alifático bajo y las fracciones del lavado que muestran actividad de vitamina B 12 (determinada por ensayo microbiológico) se combinan y los lavados combinados se concentran. Luego la solución alcohólica concentrada se mezcla con un líquido miscible con ella y en el cual sea insoluble la sustancia activa, como la acetona. El precipitado que forma se depura por reprecipitación de alcohol añadiendo acetona y el producto se purifica más por cristalización de agua, por la adición de acetona



para producir vitamina B 12 cristalina.

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de realizar el presente invento pero debe entenderse que sólo se dan por vía de ilustración y no de limitación.

5

Ejemplo 1.

Agentes que contenían 2% de levadura de cerveza seca suspendida en agua destilada y cantidades variables de cobalto (como nitrato de cobalto) según se indica en el siguiente cuadro se prepararon y subdividieron en frascos de Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 40 ml. por frasco. Después de esterilizar los frascos y su contenido a 120°C durante media hora, los frascos se inocularon con un 2.5% aproximadamente de volumen de un cultivo vegetativo de 48 horas de Streptomyces griseus 25G (una raza productora de griseína) crecido en un digesto triptico de extracto de carne de agente de caseína. Después de la inoculación, los caldos inoculados se mantuvieron a 28°C durante cuatro días, tiempo en el cual se agitaron continuamente en una máquina agitadora giratoria. Terminado este período de fermentación, las actividades de los caldos, determinados por ensayos con Lactobacillus lactis Dorner, fueron los siguientes:

	<u>Cobalto</u> <u>ppm.</u>	<u>Unidades LLD</u> <u>por ml. de caldo fermentado</u>
	0	300
25	1	2760
	2	3000
	10	4600
	20	3000



348

188997

Ejemplo 2.

Se preparó un agente que contenía:

	Carne de proteína y raspaduras de huesos	8%
	Cloruro sódico	0.5%
5	FeSO ₄ .H ₂ O	1500 ppm.
	Agua destilada hasta un total de	100%

Este agente se preparó, esterilizó, inocularé e incubó como se describe en el ejemplo 1. Una segunda porción del mismo agente a que se añadieron 2 ppm. de cobalto (como nitrato de cobalto) se esterilizó, inocularé e incubó de igual modo. Al fin del periodo de fermentación el ensayo de los caldos fué el siguiente:

	<u>Sin cobalto</u>	<u>Cobalto 2 ppm.</u>
	160 unidades LLD/ml.	590 unidades LLD/ml.

15

Ejemplo 3.

Se prepararon agentes de fermentación que contenían:

	Digesto triptico de caseína	1%
	Extracto de carne	0.3%
20	Cloruro sódico	0.5%
	FeSO ₄ .7H ₂ O	50 ppm.
	Aceite de habas de soya	0.15% (como antiespumante)
	Agua corriente a razón total de	100%

25

El agente anterior se prepara en un fermentador de 3000 galones y se esteriliza. El agente se inocularé con 275 galones de inoculación vegetativa de una raza de Streptomyces griseus productora de griseína designada con 25G y la mezcla se incubó a 28°C durante 48 horas en condiciones de



1949

188997

agitación, sumersión y aireación.

El caldo fermentado se ensaya usando lactobacillus lactis Dorner como organismo de ensayo, y luego el caldo se trata para recuperar la vitamina B 12 cristalina. Esto se hace filtrando el caldo y adsorbiendo el material activo del mismo por medio del carbón vegetal activado, el adsorbido de carbón se lava con una solución acuosa de piridina y el lavado resultante se evapora a sequedad a presión reducida. El concentrado sólido así obtenido se extrae con alcohol metílico y el extracto alcohólico se adsorbe luego en columna usando alúmina activada, y el material activo se lava de él con alcohol metílico nuevo. Estas fracciones que tienen muy pronunciada actividad microbiológica se concentran juntas y la solución concentrada se mezcla con acetona, con lo cual precipita y se recupera vitamina B 12 bruta. Este producto se purifica por reprecipitación de solución de etanol añadiendo acetona. El producto se purifica más por cristalización de agua y acetona para producir vitamina B 12 cristalina.

Se obtuvieron los siguientes resultados en obtenciones duplicadas que muestran el efecto de cobalto, añadido en forma de su nitrate:

Obtención número	Cobalto ppm	Potencia del caldo unidades ILD/ml.	Vitamina B 12 cristalina aislada
1	nada	173	18.4 mg.
2	2 ppm.	2250 (media)	106.7 mg.

Se preparó un agente de fermentación que contenía:



188997

	Harina de habas de soya (Staley 4-5)	3%
	Dextrosa	2%
	NaCl	0.25%
	Solubles de destilería	0.75%
5	Agua para un total de	100%

Este agente se preparó y subdividió en frascos de Erlenmeyer de 250 ml. que contenían 40 ml. por frasco. Se añadieron cantidades variables de cobalto (como su nitrate) como se indica en el siguiente cuadro, y los frascos y su contenido se esterilizaron calentando a 120°C durante media hora. Los frascos se inocularon con un 2.5% aproximadamente de volumen de un cultivo vegetativo de cuarenta y ocho horas de una raza de Streptomyces griseus productora de estreptomina. Después de la inoculación los caldos inoculados se mantuvieron a 27°C durante tres días con agitación continua en un agitador giratorio. Terminado este periodo de fermentación, la estreptomina y las actividades LLD de los caldos dieron el siguiente ensayo:

	<u>Co. ppm</u>	<u>Estreptomina μ/ml.</u>	<u>Unidades LLD/ml.</u>
20	0.0	850	300
	0.5	825	3000
	1.0	845	3100
	2.0	650	4200
	4.0	235	5000
25	6.0	< 150	2400
	8.0	< 150	2000
	12.0	< 150	220

Se preparó un agente que contenía lo siguiente:



1949

18 8997

Infusión de corazón y sesos	18.5 g.
Agar	1.85 g.
Agua	495 ml.
pH	7.0-7.2

5 Este agente se preparó y subdividió en frascos de Erlenmeyer de 125 ml. que contenían 100 ml. de agente por frasco. Los frascos y su contenido se esterilizaron calentando a 120°C durante veinticinco minutos. Los agentes se enfriaron a 37°C y se inocularon con 1 ml. por frasco de una suspensión de Clostridium tetanomorphum crecido anaeró-
 10 bicamente en agente de sesos-hígado-corazón Bacto. Después de la inoculación, los caldos inoculados se mantuvieron en condiciones estacionarias a 37°C durante el periodo indicado en el cuadro de abajo. Un segundo grupo de frascos que
 15 contenían el mismo agente suplementado con 10 microgramos de hexahidrato de nitrato de cobalto por ml. (aproximadamente dos partes de cobalto por millón de partes de agente) se esterilizaron, inocularon e incubaron de igual modo. Terminado el periodo de fermentación el ensayo de los caldos fue
 20 el siguiente: (los valores dados se obtuvieron por promedio de valores obtenidos en cuatro fermentaciones diferentes realizadas en cada una de las condiciones indicadas).

	Periodo de fermentación días	Sin cobalto	Actividad IID por ml. cobalto 2 ppm.
25	4	660	4600
	7	760	6300

Varios cambios y modificaciones pueden hacerse en la realización del presente invento sin apartarse del espíritu y finalidad; por ejemplo, pueden emplearse
 30 agentes nutritivos sólidos tales como salvados en grano en

11 FEB 1950



188997

ves de los agentes nutritivos acuosos especificados. Como estos cambios y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, deben considerarse como parte de nuestro invento.

5 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 10 de Julio de 1948, bajo el número 38.176, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

10 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

15 1ª. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprende fermentar un agente nutritivo al que se ha añadido cobalto por medio de una raza, productora de actividad ILLD, de un microorganismo perteneciente a la subtribu Fungi.

20 2ª. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprende fermentar un agente nutritivo acuoso al que se ha añadido cobalto por medio de un Streptomyces que produce sustancias de actividad ILLD.

3ª. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprenden fermentar un agente nutritivo acuoso al que se ha añadido cobalto por medio de un



11 188997

Clostridium que produce sustancias de actividad LLD.

4^a. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprenden fermentar un agente nutritivo acuoso que contiene no menos de 0.1 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente mediante una raza productora de actividad LLD, de un micro-organismo perteneciente a la subtribu Fungi.

5^a. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprenden fermentar, en condiciones de sumersión aireada, un agente nutritivo acuoso al que se ha añadido cobalto, siendo la proporción de cobalto añadido no menor de 0.1 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente, por medio de un Streptomyces que produce sustancias de actividad LLD.

6^a. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprende fermentar, en condiciones de sumersión aireada, un agente nutritivo acuoso, que contiene entre 0.1 y 20 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente, por medio de un Streptomyces que produce sustancias de actividad LLD.

7^a. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprende fermentar, en condiciones sumergidas, un agente nutritivo acuoso que contiene entre 0.1 y 20 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente por medio de un Clostridium que produce sustancias de actividad LLD.

8^a. - Un procedimiento de producir vitamina B 12 que comprende fermentar, en condiciones sumergidas y



188997

aireadas, un agente nutritivo acuoso, que contiene de 0.1 a 20 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza de Streptomyces griseus que produce vitamina B 12.

5 9^a. - Un procedimiento de producir vitamina B 12 que comprende fermentar en condiciones sumergidas y aireadas un agente nutritivo acuoso, que contiene unas dos partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza de Streptomyces griseus que produce vitamina B 12.

10 10^a. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas que comprende fermentar en condiciones sumergidas, un agente nutritivo acuoso que contiene entre 0.1 y 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza de Clostridium tetanomorphum que produce sustancias de actividad LLD.

15 11^a. - Un procedimiento para la síntesis de la vitamina B 12 que comprende fermentar, en condiciones sumergidas y aireadas, un agente nutritivo acuoso que contiene de 0.1 a 20 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente, por medio de una raza de Streptomyces griseus que produce griseína.

20 12^a. - Un procedimiento para la síntesis de la vitamina B 12 que comprende fermentar en condiciones sumergidas y aireadas un agente nutritivo acuoso que contiene de 0.1 a 20 partes aproximadamente de cobalto por millón de partes de agente por medio de una raza de Streptomyces griseus que produce estreptomina.



188997

13^a. - Un procedimiento de producir vitamina B 12 que comprende fermentar en condiciones sumergidas y aireadas un agente nutritivo acuoso que contiene cobalto equivalente a unas 0.1-2 partes por millón de partes de agente, añadido como nitrato de cobalto, por medio de una raza de Streptomyces griseus productora de griseína.

14^a. - Un procedimiento de producir sustancias de actividad LLD que comprende fermentar, en condiciones de aireación sumergida, un agente nutritivo acuoso que contiene cobalto equivalente a unas 0.1-2 partes por millón de partes de agente, añadido como nitrato de cobalto, por medio de una raza de Streptomyces griseus productora de griseína.

15 15^a. - Un procedimiento de producir vitamina B 12 que comprende fermentar en condiciones sumergidas y aireadas, un agente nutritivo acuoso que contiene cobalto equivalente a unas 0.1-2 partes por millón de partes de agente, añadido como nitrato de cobalto, por medio de una raza de Streptomyces griseus productora de estreptomycinina.

20 16^a. - Un procedimiento de producir sustancias de actividad LLD, que comprende fermentar en condiciones de aireación sumergida, un agente nutritivo acuoso que contiene cobalto equivalente a unas 0.1-2 partes por millón de partes del agente, añadido como nitrato de cobalto, por medio de una raza de Streptomyces griseus productora de estreptomycinina.

17^a. - Un procedimiento que comprende propa-



1 5 950 188997

gar un microorganismo perteneciente a la subtribu Fungi que, al crecer en un agente nutritivo acuoso, produce sustancias de actividad LLD, realizándose la propagación en condiciones sumergidas en un agente nutritivo acuoso que contiene una
5 fuente de carbono asimilable y sales inorgánicas, conteniendo también el agente una adición de cobalto en forma de una combinación soluble de éste.

18^a. - Un procedimiento que comprende propagar un microorganismo perteneciente a la subtribu Fungi que
10 al crecer en un agente nutritivo acuoso produce sustancias de actividad LLD, realizándose la propagación en condiciones sumergidas en un agente nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales inorgánicas, conteniendo también el agente
15 entre unos 0.1 y 20 partes de cobalto por millón de partes de agente.

19^a. - Un procedimiento que comprende propagar un Streptomyces que, al crecer en un agente nutritivo acuoso produce sustancias de actividad LLD realizándose la
20 propagación en condiciones sumergidas y aireadas en un agente nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales inorgánicas, conteniendo también el agente entre 0.1 y 20 partes de cobalto por millón de partes de agente.

20^a. - Un procedimiento que comprende propagar un Clostridium que al crecer en un agente acuoso, produce sustancias de actividad LLD realizándose la propagación
25 en condiciones sumergidas en un agente nutritivo acuoso que



188997

contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales inorgánicas, conteniendo también el agente entre unas 0.1 y 20 partes de cobalto por millón de partes de agente.

5 21^a. - Un procedimiento que comprende sumergir una raza de Streptomyces griseus, productora de griseína, en un agente nutritivo acuoso, que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales inorgánicas, conteniendo además el agente entre unas 0.1
10 y 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, y mantener agitación y aireación a través del agente inoculado para dispersar oxígeno al través de él a temperatura de unos 28°C durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 7 días.

15 22^a. - Un procedimiento que comprende sumergir una raza de Streptomyces griseus, productora de estreptomizina en un agente nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y sales inorgánicas, conteniendo además el agente
20 entre unas 0.1 y 20 partes de cobalto por millón de partes de agente, y mantener agitación y aireación a través del agente inoculado para dispersar oxígeno al través de él a temperatura de unos 28°C durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 7 días.

25 23^a. - Un procedimiento de producir sustancias vitamínicas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que



antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas por una sola cara.

Madrid,

P. A.
Albe EN E 1950 uru
Por E. G. G. G.

188997