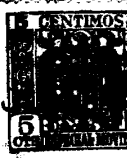


P.- 9150.-
Case 3.207.-

198931

198931



24 JUL 1951

27 JUL 1951

**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

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

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ESTREP-
TOMICINA".

-o-

Este invento se refiere a la producción de es-
treptomicina y, más particularmente, a procedimientos para
obtener estreptomicina en rendimiento aumentado por la uti-
lización del cultivo nuevo y distinto de Streptomyces gri-
5 seus que luego se describe y caracteriza.

En la solicitud de Patente número 187.020, pre-
sentada el 12 de Febrero de 1949, se han descrito procedi-
mientos para producir estreptomicina en rendimientos del or-

198931



den de 800 a 1100 mcgrs/ml. por medio del cultivo nuevo y distinto de S. griseus Dulaney L-118. Este cultivo se obtuvo sometiendo esporas de una cepa de S. griseus caracterizada como resistente a una concentración inicial de estreptomycinina de al menos 500 mcgrs/ml. a la acción de luz ultra-violeta, dejando que las esporas que sobreviven a tal tratamiento crezcan y seleccionando de las colonias resultantes de S. griseus las que exhiben una capacidad incrementada para producir estreptomycinina, sometiendo de nuevo esporas de las colonias seleccionadas a la acción de luz ultra-violeta y repitiendo el desarrollo de las colonias, la selección y la irradiación de las esporas hasta que se obtenía una cepa modificada de S. griseus que poseía la capacidad de producir consistentemente estreptomycinina con rendimientos de al menos 800 mcgrs/ml.

Aun cuando los rendimientos de estreptomycinina de 800 a 1100 mcgrs/ml. producidos por el cultivo de S. griseus Dulaney L-118 son marcadamente superiores a los que pueden obtenerse con cepas de S. griseus anteriormente disponibles, se ha descubierto ahora que los rendimientos de estreptomycinina pueden aumentarse todavía a unos 1800 a 2200 mcgrs/ml. utilizando el cultivo nuevo y distinto que luego se designa S. griseus mutante albus (Dulaney Z-38). Este nuevo cultivo o mutante se obtuvo sometiendo esporas de S. griseus Dulaney L-118 a la acción mutante de luz ultra-violeta y rayos X blandos. El procedimiento experimental que condujo al aislamiento del nuevo mutante fué como sigue:

Esporas de S. griseus Dulaney L-118 se lavaron

198931



desde un crecimiento superficial con agua destilada y estéril, y la suspensión resultante de esporas se filtró a través de varias capas de algodón absorbente estéril. La suspensión de esporas filtrada se expuso luego a rayos ultravioleta con una longitud de onda de 2.537 Å durante un tiempo suficiente, unos 2 minutos, para matar aproximadamente el 99% de las esporas. La suspensión de células tratadas se diluyó luego con agua destilada, y una cantidad de la suspensión diluida se extendió sobre placas de Petri de agar nutritivo, es decir, un medio acuoso que contiene 2,5% de glucosa, 4% de harina de soja, 0,25% de cloruro sódico, 0,5% de solubles de destilería y solidificado con agar. Después de incubación hasta que tuvo lugar un buen crecimiento y esporulación, las colonias se transfirieron a cultivos inclinados de agar del mismo medio y, después de incubación hasta que tuvo lugar un crecimiento y esporulación buenos, se añadió agua estéril a cada uno de los cultivos inclinados, y se prepararon de cada uno de ellos suspensiones separadas de esporas.

Cantidades de cada suspensión de esporas se transfirieron a matraces que contenían un medio de inóculo compuesto de 1% de glucosa, 1% de producto de la digestión enzimática de caseína, 1% de cloruro de sodio, 0,6% de extracto de carne, y agua destilada hasta completar el volumen. Los matraces inoculados se incubaron luego con agitación constante durante 48 horas, y el crecimiento vegetativo que se desarrolló se usó para inocular matraces de medio acuoso de fermentación que tenía la composición: 2,5% de glucosa,

198931

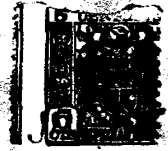


4% de harina de soja, 0,25% de cloruro sódico y 0,5% de solubles de destilería. Estos matraces inoculados se incubaron luego a 28°C con agitación constante durante 4 a 5 días para permitir la máxima producción de estreptomicina.

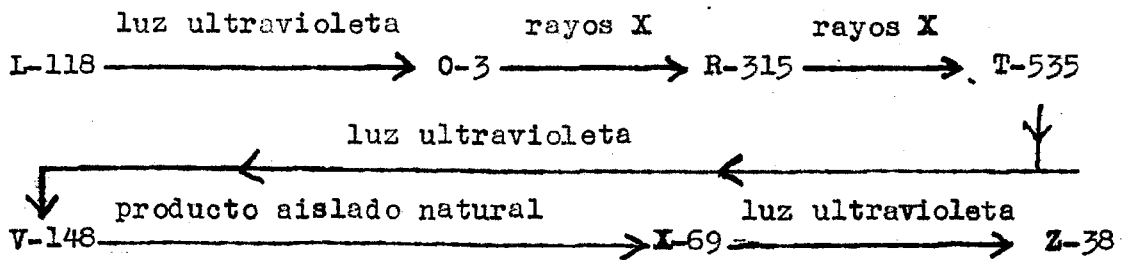
5 Los anteriores procedimientos de mutación y selección se repitieron con suspensiones adicionales de esporas de S. griseus Dulaney L-118 hasta que se obtuvo un mutante con una producción superior de estreptomicina, como se puso en evidencia por un rendimiento incrementado en el matraz de fermentación.

10 Una suspensión de esporas en agua destilada de este mutante superior se designó O-3 y se expuso a la acción de rayos X blandos hasta que murió aproximadamente el 99% de las esporas. Esta suspensión tratada se diluyó con agua destilada, se dispuso en placas de agar nutricio para el desarrollo de las esporas, y las esporas resultantes se usaron para 15 inocular matraces de medio de inóculo y matraces de medio de fermentación de acuerdo con el procedimiento antes descrito.

20 Así se obtuvo un mutante nuevo y superior a partir del O-3 y se designó R-315. Las esporas de este mutante R-315 se trataron similarmente con rayos X y desde los cultivos así obtenidos se seleccionó el mutante T-535 como sustancia matriz para el trabajo de mutación ulterior. Las esporas del mutante T-535 se trataron con luz ultravioleta y se 25 seleccionó el mutante V-148 de los cultivos resultantes. Uno de los productos aislados naturales de mutante V-148, es decir, la cepa X-69, resultó ser un productor superior de es-



treptomycin y, a su vez, fué tratado con luz ultravioleta dando el mutante superior Z-38, al que se hace luego referencia con más detalle como S. griseus, mutante albus (Dulaney Z-38). El diagrama siguiente ilustra la geneología de la cepa Z-38.



Las propiedades morfológicas comparativas y las reacciones bioquímicas como se dan en Manual of Determinative Bacteriology, de Bergey, y según fueron observadas para S. griseus Dulaney L-118 y S. griseus, mutante albus (Dulaney Z-38) se tabulan como sigue:

Características de cultivo de S. griseus

	<u>Manual of Determinative Bacteriology</u> , de Bergey.	<u>S. griseus</u> L-118	<u>S. griseus</u> Z-38
Filamentos	Ramificación, unas pocas espirales	Recto, ramificación, sin espirales	Recto, ramificación, espirales ocasionales
Conidios	En forma de varilla cilíndrica corta, 0,8 x 0,8 a 1,7 micras.	Conforme	Conforme
Varilla de gelatina	Crecimiento superficial verde amarillento o de color crema, matiz parduzco, licuación rápida.	16 días, 50% del medio, licuado (color no registrado)	16 días, 25% del medio, licuado (color no registrado)

198931



5	Agar sintético.	Delgado, incoloro, extendido, micelio aéreo, oliva canela, grueso, polvo, verde agua.	Crecimientos incoloro sin micelio aéreo.	Crecimiento incoloro sin micelio aéreo.
10	Agar almidón	Extendido delgado, transparente.	Delgado, extendido, no transparente, crecimiento crema, almidón hidrolizado.	Delgado extendido, no transparente, crecimiento crema, almidón hidrolizado
15	Agar dextrosa.	Elevado en el centro, de color crema a naranja radiado, margen desgastado	Crecimiento desvaído extendido, incoloro.	Crecimiento desvaído, extendido, incoloro.
20	Agar simple	Abundante, color crema, casi transparente.	Incoloro, crecimiento transparente.	Incoloro, crecimiento transparente.
25	Caldo de	abundante, película amarillenta con matiz verdoso, muy plé-gada.	película (color y tipo no observados)	película (color y tipo no observados)
30	Lechada de tor-nasol	anillo de color crema coagulado con rápida peptonización, convirtiéndose en alcalino.	peptonizado (pH del sustrato y color y tipo de crecimiento superficial no observados).	Peptonizado (pH del sustrato y color y tipo de crecimiento superficial no observados).
35				
40	patata	amarillento, arrugado.	crecimiento pesado, gris; rugoso; oscurecimiento de la patata.	crecimiento pesado, canela; rugoso; oscurecimiento de la patata.
45	Reducción.	Nitritos producidos desde nitratos.	Nitritos producidos	Nitritos producidos.
	Pigmento.	No soluble	No soluble	No soluble
	Tensión de oxígeno.	Aerobica	Aerobica	Aerobica.

**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**



198931

Ensayos adicionales no mencionados por Bergey dieron los resultados siguientes:

Ensayo	S. griseus L-118	S. griseus Z-38
5 Descomposición de la celulosa.	Sin descomposición	Sin descomposición.
Agar de malato de Ca	Crecimiento ligero	Crecimiento ligero.
Agar de tirosina	Sin crecimiento aparente	Sin crecimiento aparente
10 Agar de fosfato	Hifas que contienen esporas, en aglomeraciones.	Micelio vegetativo.
15 Agar de soja (composición, véase página 2 líneas 1 y 2).	Esporulación abundante, esporas grises a verde grisáceo	Esporulación abundante, esporas blancas.
20 Agar con 1% de extracto de levadura y 0,5% de glucosa.	Esporulación abundante.	Sin esporulación
(1) Inóculo de esporas sobre agar de buey y levadura Difco NL B244	(2) Esporulación ligera	(4) Prácticamente sin esporulación (4)
(3) Inóculo vegetativo sobre Agar de buey y levadura Difco (Nº B244)	(5) Como un 80% de las colonias muestran esporulación (5)	(5) Menos de 1% de las colonias muestran esporulación (5)

- 30 (1) Esporas de matraz de Blake de agar en suspensión en agua destilada como antes se ha descrito.
- (2) La composición del Agar de Difco de buey y levadura (Nº. B244) es como sigue:

Ingrediente	Gramos por 100 c.c. de medio acuoso.
40 Extracto de Buey Bacto.	0,15
Extracto de levadura Bacto.	0,3
Peptona Bacto.	0,6
Dextrosa Bacto.	0,1
Agar Bacto.	1,5

198931



(Nota: A este medio se le añadió 1 gr. por 100 c.c. de agar deshidratado Difco para dar un medio solidificado más firme.

5 (3) El inóculo vegetativo se preparó por inoculación de 40 c.c. de un medio líquido estéril que luego se describe en un matraz Erlenmeyer de 250c.c. con tapón de algodón e incubando a 27°C durante 20 horas sobre un agitador rotativo.

10 El medio usado para el desarrollo del inóculo vegetativo tenía la siguiente composición:

<u>Ingrediente.</u>	<u>Grs. por 100 c.c. de medio acuoso</u>
N-Z-amina (enzima de caseína hidrolizada)	1
dextrosa	1
extracto de buey	0,3

15

20

(4) Al inocular con esporas, esporas de un cultivo en matraz de Blake se pusieron en suspensión en agua estéril a una dilución suficiente de modo que cuando se rayaron sobre el medio de ensayo y se incubaron a 27°C durante unos 6 días, se desarrollaron colonias separadas y se examinaron individualmente para la esporulación.

25

(5) Un bucle de inóculo vegetativo, preparado como se ha descrito en la Nota (3), se rayó sobre el medio de ensayo. La dilución fue tal que después de incubación de la placa de ensayo durante unos 6 días a 27°C, se desarrollaron colonias separadas y se examinaron individualmente en cuanto a la esporulación.

30

Los ejemplos siguientes se dan como procedimientos ilustrativos para la producción de estreptomicina usando el nuevo cultivo S. griseus, mutante albus (Dulaney Z-38).

Ejemplo 1

35

Esporas de cultivos inclinados de agar nutricio de la cepa S. griseus L-118, X-69 y Z-38 a que antes se ha hecho referencia, se usaron para inocular matraces separados que contenían el siguiente medio nutricio: 1% de glucosa, 1% de digestión enzimática de caseína, 1% de cloruro sódico, 0,6% de extracto de carne y agua destilada hasta comple-

198931



tar el volúmen. Los matraces que contenían el medio inoculado se incubaron sobre un agitador rotativo a 28°C hasta que se produjo un buen crecimiento. Después de 48 horas de incubación, este crecimiento vegetativo se usó para inocular matraces Erlenmeyer de 250 mls. que contenían 40 mls. del medio siguiente:

- Glucosa 2,5%
- Harina de soja 4 %
- Cloruro de sodio 0,25%
- Solubles secos de destilería 0,5 %
- Agua destilada hasta volúmen
- pH antes esterilización . . . 7,38%

Los matraces que contenían el medio inoculado se incubaron sobre un agitador rotativo, a 220 r.p.m. a 28°C, hasta que se obtuvo la máxima producción de estreptomicina, medida por el ensayo en cubeta con Bacillus subtilis. Los resultados del experimento comparativo se dan en la tabla siguiente:

Cepa N.º.	Potencia del caldo de estreptomicina γ /ml. después de	
	4 días	5 días
L-118	670 +	635 +
X-69	860	1480
Z-38	1205	2000

El rendimiento en estreptomicina es bajo para la cepa L-118 debido al hecho de que la temperatura de incubación es mayor que el valor óptimo para la cepa L-118.

Ejemplo 2

Un fermentador de 5 litros se cargó con 3,2 litros de un medio que contenía 4% de harina de soja, 0,25% de cloruro de sodio, 0,5% de solubles de destilería, 2,5% de dextrosa, y agua destilada hasta completar el volúmen. También se añadieron al medio aproximadamente 0.5 p.p.m. de co-

198931



balto como nitrato de cobalto, y el medio, después de este-
 rilización, se inoculó con 5% de un cultivo vegetativo de
S. griseus, mutante albus (Z-38). Otro fermentador de 5 li-
 tros se cargó con 3,2 litros de un medio que contenía 3% de
 5 harina de soja, 2% de dextrosa, 0,75% de solubles de desti-
 llería, 0,25% de cloruro de sodio, agua destilada hasta com-
 pletar el volúmen y 0,5 p.p.m. de cobalto como nitrato de
 cobalto. Este medio, después de esterilización, se inoculó
 con 5% de un cultivo vegetativo de S. griseus Dulaney L-118.
 10 Los dos medios inoculados se incubaron a 27°C, con agitación
 mecánica y aireación hasta que se obtuvo en cada uno la pro-
 ducción máxima de estreptomycin. Al final de la fermenta-
 ción, los siguientes rendimientos de estreptomycin y vita-
 mina B₁₂ fueron obtenidos:

15

Inóculo	Estreptomycin		B ₁₂ aislada color refe- rida a volúmen de 4000 litros, mgrs.
	máximo, mcgrs/ml.	Tiempo de máximo horas.	
L-118	1140	113 + +	950
Z-38	1830 +	118 + +	0

20 + El rendimiento en estreptomycin con cepa Z-38 habría
 sido algo mayor si se hubiera empleado en este experi-
 mento la temperatura óptima de 28,5°C.

25 + En fermentadores de 60.000 litros, el tiempo para la
 producción máxima de estreptomycin es de 80 horas pa-
 ra L-118 y 110 horas para Z-38.

Ejemplo 3

30 Se preparó un inóculo propagando esporas de S.
griseus, mutante albus (Dulaney Z-38) en un medio estéril
 que contenía 1% de dextrosa, 1% de digestión enzimática de

198931



1951

caseína, 0,6% de extracto de carne y agua destilada hasta completar el volúmen, en condiciones aireadas y agitadas a 27°C durante 36 a 48 horas hasta que se obtuvo un buen crecimiento. Porciones de 1 ml. del caldo resultante se usaron para inocular cada uno de una pluralidad de matraces que contenían el medio antes descrito, y estos cultivos se dejaron crecer a 27°C en condiciones aireadas y agitadas durante 20 a 24 hora-s hasta que se obtuvieron aproximadamente 5-7 mgrs/ml. de crecimiento vegetativo (peso seco) y quedaron 3-4 mgrs/ml. de azúcar. El contenido de los matraces se mezcló luego para dar inóculo para la producción real de estreptomicina.

Una pluralidad de fermentadores de 5 litros se cargaron con porciones de 3200 mls. de medio estéril que contenía 3,5% de harina de soja, 2,75% de dextrosa, 0,5% de solubles secos de destilería, 0,25% de cloruro de sodio, 0,4 c.c. por 100 c.c. de aceite de soja y agua destilada hasta completar el volúmen, que es el medio preferido para Z-38. Cada uno de los fermentadores se inoculó con 150 mls. del inóculo preparado y se inoculó a una temperatura de 28,5°C durante 112 a 118 horas con agitación mecánica, comunicada por un árbol rotativo que llevaba una hélice, y con aireación en condiciones variables. Los rendimientos de estreptomicina obtenidos con las diferentes condiciones de agitación y aireación se tabulan a continuación, siendo el rendimiento en estreptomicina en cada caso un promedio de valores obtenidos en 3 o más fermentadores separados.

198931



Efecto de la potencia sobre la producción de estreptomocina con Z-38

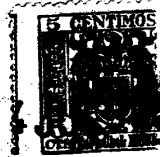
	Potencia total absorbida HP/litro de medio de fermentación aireado.	Velocidad superficial del aire, m/hora.	Rendimiento en estreptomocina mcgrs/ml. de caldos fermentados.
5	0,0006	21,6	938,5
	0,0012	11	1656
	0,0018	11	1726
	0,0023	11	1919
10	0,0024	11	2051
	0,0057	11	2077

Con fines comparativos, se realizó un experimento similar en los mismos fermentadores de 5 litros en el cual se usó un inóculo vegetativo de cultivo de L-118 para la fermentación a 27°C del siguiente medio estéril preferido: harina de soja 3%, dextrosa 2%, solubles secos de destilería 0,75%, y cloruro de sodio 0,25%. Los resultados obtenidos fueron como sigue:

	Potencia total absorbida, HP/litro de medio de fermentación aireado.	Velocidad superficial del aire, m/hora.	Rendimiento en estreptomocina mcgrs/ml. de caldo fermentado.
20	0,0003	11	350
	0,0004	11	780
25	0,0006	11	1000
	0,0230	11	980

Como se observará por las anteriores Tablas, el aumento en la potencia mecánica absorbida por litro de medio de fermentación desde 0,0006 con cultivo de L-118 no incrementa el rendimiento de estreptomocina por encima de 1000 mcgrs/ml de caldo fermentado al paso que, con cultivo Z-38, tal aumento en la potencia mecánica absorbida hasta 0,0024 HP

198931



por litro de medio fermentado aumenta el rendimiento de estreptomicina hasta 2000 mcgrs/ml. de caldo de fermentación.

Ejemplo 4

Se repitió, como se describe en el Ejemplo 3, el procedimiento de preparar un inóculo de S. griseus, mutante albus (Dulaney Z-38) y usando este inóculo para inocular porciones de 3200 mls. de medio en una pluralidad de fermentadores de 5 litros. Los medios inoculados se incubaron luego a las diferentes temperaturas como se ha indicado con agitación mecánica constante y aireación hasta que se obtuvo la producción máxima de estreptomicina. La agitación en cada caso se aportó por medio de dos turboimpulsores que giraban a tal velocidad que la potencia total absorbida era de 0,0023 HP/litro. El rendimiento en estreptomicina a las diferentes temperaturas de incubación empleadas se indica en la tabla siguiente, representando los valores en cada caso un promedio de dos o más fermentaciones separadas.

Temperatura °C	Rendimiento en estreptomicina mcgrs/ml.	Tiempo para el rendimiento max. en estreptomicina, horas.
----------------	---	---

25	1180	118
27	2041	118
29	2194	104
31	414	72

Experimentos adicionales han indicado que la temperatura óptima de incubación con el organismo S. griseus, mutante albus (Dulaney Z-38) es de 28,5°C.

Ejemplo 5

Se repitió, como se describe en el Ejemplo 3, el

1951
6

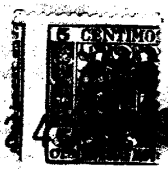
198931

procedimiento de preparar un inóculo de S. griseus, mutante albus (Dulaney Z-38) y usando este inóculo para inocular porciones de 3200 mls. de medio en una pluralidad de fermentadores de 5 litros. Los medios, antes de la inoculación, se ajustaron cada uno a valores predeterminados de pH por adición de cáustico, es decir, solución de hidróxido sódico, antes de la esterilización o después de ella, como se ha indicado. Los medios inoculados se incubaron luego a una temperatura de 28,5°C con agitación mecánica constante y aireación hasta que se obtuvo la máxima producción de estreptomicina, siendo proporcionada la agitación en cada caso por dos turboimpulsores que giraban a tal velocidad que la potencial total absorbida fué de 0,0023 HP/litro. Las fermentaciones se realizaron como dos experimentos separados, uno para determinar la eficacia comparativa del ajuste del pH antes y después de la esterilización, y otro para determinar el ajuste óptimo del pH antes de la esterilización. Los rendimientos en estreptomicina obtenidos en estos experimentos se tabulan a continuación, representando los valores en cada caso un promedio de dos o más fermentaciones separadas.

Efecto del ajuste del pH antes y después de la esterilización.

pH inicial de la muestra.	Ajuste del pH.		Tiempo para el rendimiento máximo en estreptomicina.	Rendimiento en estreptomicina, Mcgrs/ml.
	antes	después	esterilización horas	
6,6	7	antes	112	1769
6,8	7	después	118	1555
6,4	6,5	" "	104	1378
6,2	6	" "	104	1266

198931



Efecto de diferentes ajustes del pH antes y después de la esterilización.

	Ajuste del pH mls. de NaOH 30% añadidos antes de la esterilización.	Tiempo para la max. producción de estreptomina, horas.	Rendimiento en estreptomina, mcgrs/ml.
5	pH inicial de la muestra.		
	6,65	3,2 (pH aprox. 7)	112
	6,33	2,2 (pH menor de 7)	118
10	6,5	4,2 (pH mayor de 7)	96
			1913
			1859
			1799

Por las tabulaciones que anteceden, es evidente que se obtienen mejores resultados cuando el pH se ajusta antes de la esterilización y que se obtienen resultados óptimos cuando el pH se ajusta a aproximadamente 7% antes de la esterilización.

Por los ejemplos citados, es evidente que pueden usarse los siguientes criterios, además de los resultados típicos de ensayo ya expuestos, para distinguir el S. griseus mutante albus (Dulaney Z-38) de su antecesor, S. griseus Dulaney (L-118):

	Z-38	L-118
Temperatura óptima de fermentación	28,5°C	27°C
25 Tiempo de fermentación para producción máxima de estreptomina	110 horas.	80 horas.
pH óptimo del medio: antes de la esterilización	7	6,2 - 6,4
30 después de la esterilización	6,5 - 6,6	6,1 - 6,3
35 Potencia mínima de agitación absorbida para producción máxima de estreptomina EP/litro de medio de fermentación aireado	0,0023	0,0006

198931



Rendimiento máximo aproxima-
do de estreptomocina -
mcgrs de estreptomocina por
ml. de caldo fermentado.

2000

1000

5 Potencia en vitamina B₁₂ del
caldo fermentado.

ninguna

950 mcgrs. por
4000 litros de
caldo.

10 Pueden hacerse diversos cambios y modificaciones
al llevar a la práctica el presente invento sin apartarse por
ello de su espíritu y alcance. En la medida en que tales
cambios y modificaciones estén dentro de los límites de la
reivindicación aneja, han de considerarse que forman parte
del invento.

15 Esta solicitud, que corresponde a la presentada
en los Estados Unidos, el 25 de Julio de 1950, bajo el Nú-
mero 175.891, se acoge a los beneficios del artículo 51 del
vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

----- N O T A -----

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

198931



1º. El procedimiento para la producción de estreptomina, que comprende fermentar un medio nutritivo acuoso por medio del organismo Streptomyces griseus, mutante albus (Dulaney Z-38), que se ha descrito en esta Memoria.

5

2º. El procedimiento según se reivindica en el punto 1º., en el cual la fermentación se realiza en condiciones aireadas sumergidas.

10

3º. El procedimiento según se reivindica en los puntos 1º. ó 2º., en el cual la fermentación se realiza en condiciones mecánicamente agitadas.

4º. El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º. a 3º., en el cual la fermentación se realiza a entre 27 y 29°C.

15

5º. El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º. a 3º., en el cual la fermentación se realiza a unos 28,5°C.

6º. El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º. a 5º., en el cual el medio nutritivo acuoso es un medio estéril.

20

7º. El procedimiento según se reivindica en el punto 6º., en el cual el pH del medio nutritivo acuoso se ajusta a aproximadamente 7 antes de la esterilización.

25

8º. El procedimiento según se reivindica en el punto 6º., en el cual el pH del medio nutritivo acuoso se ajusta aproximadamente a 6-7 antes de la esterilización.

9º. Un procedimiento para la producción de estreptomina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

198937



tecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diez y siete hojas y la presente, escritas a máquina por una sola cara.

14 NOV 1951

Madrid

P. A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder