

375481"



**Memoria descriptiva**

SECCION TECNICA  
REGISTRACION S. A. C.  
CLASE C11  
SUBCLASE d

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S

entidad / ~~de nacionalidad~~ danesa

con domicilio en Fuglebakkevej 115, Copenhague, Dinamarca

por: "UN PROCEDIMIENTO EN LA PRODUCCION DE COMPOSICIONES  
-DETERGENTES Y DE LAVADO" (Clase Internacional C11d)



El presente invento se refiere a un procedimiento en la producción de composiciones detergentes y de lavado, incluidas las composiciones de lavado de platos. Estas composiciones son bien conocidas en la técnica y pueden contener jabones solubles en agua, detergentes sintéticos aniónicos, tales como sales solubles en agua de productos orgánicos de reacción de ácido sulfúrico, detergentes sintéticos no iónicos, tales como compuestos producidos por condensación de grupos de óxido de alcoholeno con compuestos hidrófobos orgánicos, detergentes sintéticos anfotéricos y otros detergentes sintéticos. También pueden estar presentes en las composiciones formadores alcalinos orgánicos y formadores inorgánicos, tales como carbonatos, boratos, fosfatos, polifosfatos, silicatos y sulfatos de metales alcalinos, preferiblemente sodio.

El procedimiento según el invento se caracteriza principalmente por incorporar en toda clase de composiciones detergentes y de lavado una o más enzimas proteolíticas que muestren actividad proteolítica óptima contra la hemoglobina en presencia de urea a un valor de pH superior a 9.

Estas enzimas proteolíticas son desconocidas hasta ahora y su presencia en las composiciones detergentes y de lavado da por resultado varias ventajas que se explicarán más adelante, con detalle en la memoria descriptiva.

Durante su metabolismo, un gran número de bacterias hasta ahora desconocidas forman enzimas proteolíticas que pueden ser usadas en el procedimiento del invento.

11 FEB 1961



A partir de muestras de tierra, estiércol  
o abono animal y cierto número de otras fuentes naturales,  
los inventores han aislado alrededor de un ciento de ce-  
pas o géneros de bacterias, han llevado a cabo investiga-  
5 ciones taxonómicas y han encontrado que todas las bacte-  
rias hasta ahora desconocidas pertenecen al género Bacil-  
lus, pero que ninguna de ellas pertenece a ninguna espe-  
cie conocida para los inventores, y que, hasta donde lle-  
gan los conocimientos de los inventores, no pertenecen a  
10 las mismas especies. Además, dentro de las mismas especies  
había en la mayoría de los casos diferentes géneros y di-  
versas variedades.

Con el fin de aislar las bacterias hasta  
ahora desconocidas referidas anteriormente, se ha hecho  
15 uso de una nueva técnica.

Muestras de tierra, estiércol animal u otras  
fuentes naturales han sido diseminadas sobre medios nu-  
trientes que tienen un valor de pH elevado (9 a 11) y las  
bacterias capaces de crecer bajo tales condiciones alcali-  
20 nas son luego aisladas y sometidas a posteriores investi-  
gaciones como a producción de especies y enzimas.

En la mayoría de los casos, se ha hecho uso  
también de cierto número de diferentes métodos de enrique-  
cimiento.

Métodos de enriquecimiento son conocidos en  
la técnica. Se puede hacer referencia a Hayaishi, Methods  
in Enzymology, Vol. 1, 126-131. Un principio consiste en  
dejar una muestra de cultivo natural sobre un medio nu-  
triente que tiene una composición específica y elegida que  
25 favorece el crecimiento de un microorganismo que da produc  
30



tos metabólicos que tienen las propiedades ya deseadas.

Otro principio consiste en guardar la muestra natural juntamente con un compuesto, tal como una sal inorgánica, favoreciendo el desarrollo del deseado microorganismo, cfr.

5 M.A. EL-Nakeeb y H.A. Lechevalier, Appl. Microbiol., Vol. 11, 75 (1963), y después de ello diseminar la muestra sobre un medio nutriente adecuado ajustado a un valor de pH dentro del orden de 8 a 12.

10 Algunos de los miembros hasta ahora desconocidos del género Bacillus que han sido aislados y probados taxonómicamente y para producción de enzimas proteolíticas han sido recopilados en la Tabla I de abajo, en la cual la primera columna contiene el número de referencia de los inventores, la segunda columna el número bajo el cual la bacteria ha sido depositada en The National Collection of  
15 Industrial Bacteria, Torry Research Station, Aberdeen, Scotland, la tercera columna la fuente de aislamiento, y la cuarta columna el método de enriquecimiento utilizado.

20

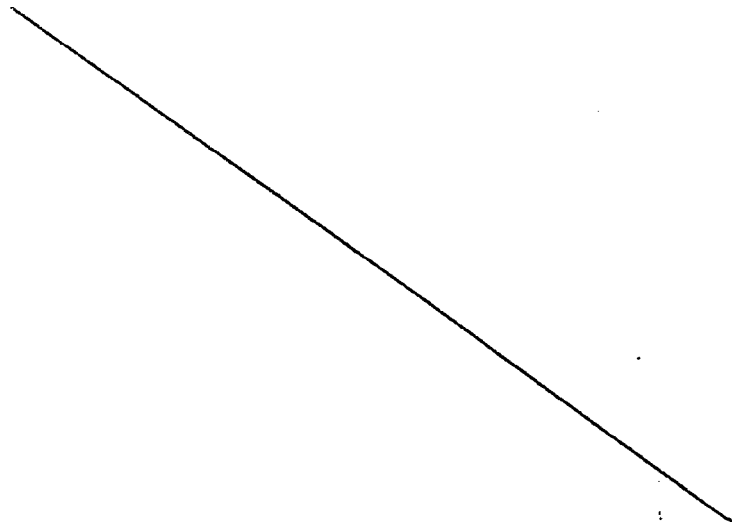


Tabla I

24 A



	Nº de refe.	Número de NCIB	Puente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:
5	C 300	10144	Tierra de cementerio de Copenhague	Medio de caseína - almidón (pH elevado escalonadamente de 10 a 12)
10	C 301	10145	Tierra de cementerio de Copenhague	Diseminación de muestras de tierra sobre agar con sesquicarbonato (pH = 9,6 - 9,8). Pruebas de sosas de hidrólisis sobre agar neutro con leche desnatada.
	C 302	10146	Tierra de la orilla del río de Copenhague	
	C 303	10147	Montón de hojas y tierra del cementerio de Copenhague	
15	C 304	10148	Arena de madera de Blokhus, Jutlandis	Agar de perborato
20	C 311	10281	Tierra de madera de Ascheberg, Holstein	Agar de perborato
	C 323	10282	Tierra de campiña de ciudad danesa	
	C 325	10284	Infección sobre placa con orificios con perborato	
25	C 334	10286	Tierra de orilla de río de ciudad danesa	Agar de perborato
	C 335	10287	Tierra de jardín de ciudad danesa.	
	C 336	10288	Estiércol de caballo y elefante	

30  
16.4.70.

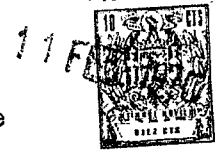
375491

24 A



	Nº de refe.	Número de NCIB	Puente de aislamiento:	Método de enriquecimiento
	C 339	10291	Tierra de orilla de río de ciudad danesa	Agar de perborato
5	C 341	10293	Tierra de campiña de ciudad danesa	Agar de perborato
	C 351	10301	Estiércol de pollos	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH de 8,8 a 9,7)
10	C 352	10302	Estiércol de aves-truz de Zoo	Enriquecimiento con sesquicarbonato sódico (pH 9,2 - 9,6)
	C 354	10304	Basura de corral de pollos	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 40°C.
15	C 356	10306	Corteza de jardín	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 50°C.
	C 357	10307	Basura de corral de pollos	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 50°C.
20	C 358	10308	Basura de corral de pollos	Enriquecimiento sobre nitrato de glucosa básico a 50°C
25	C 360	10309	Basura de jardín de ciudad danesa	Agar de perborato

16.4.70.



Nº de refe.	Número de NCIB	Fuente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:	
5	C 364	10310	Raspaduras de cisternas de N.C.	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH: 8,8 - 9,7)
	C 365	10311	Líquido de baño de limo de tenería	Enriquecimiento con salvadososa
10	C 366	10312	Heces de bebés	Enriquecimiento con almidón (pH 11) con nitrógeno inorgánico
15	C 367	10313	Estiércol de elefante	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH: 8,8 - 9,7)
	C 369	10314	Estiércol de aves-truz de Zoo	Proteosa peptona (botellas de agitación) pH 9,7.
20	C 370	10315	Raspaduras de depósitos de baños de limo de tenería	Enriquecimiento con manitol-NO <sub>3</sub> K alcalino.
25	C 371	10316	Estiércol de elefante	Proteosa peptona (botellas de agitación) pH 9,7.
	C 372	10317	Arcilla de campiña de césped de Ascheberg, Holstein	Enriquecimiento con detergente de caseína de almidón.
30	C 373	10318	Basura de jardín de ciudad danesa	Agar de perborato

4-2-70

375484



	Nº de refe.	Número de NCIB	Fuente de aislamiento:	Método de enriquecimiento:
5	C 374	10319	Arcilla de campiña de césped de Ascheberg, Holstein	Enriquecimiento con caseína de almidón sal sódica del ácido etilendiamintetraacético.
10	C 375	10320	Estiércol de avestruz de Zoo	Enriquecimiento con sesquicarbonato sódico (pH: 9,2 - 9,6).
	C 376	10321	Estiércol de elefante	Enriquecimiento con sesquicarbonato sódico (pH: 9,2 - 9,6).
15	C 377	10322	Agua de estanque de hipopótamo	Enriquecimiento con almidón de caseína termofílica con NaOH.
20	C 378	10323	Raspadura de depósitos de baños de limo de tenería	Enriquecimiento con manitol-NO <sub>3</sub> K.
	C 410	10324	Estiércol de tigre	Enriquecimiento con sesquicarbonato termofílico (50°C, pH: 8,8 - 9,7).
	C 411	10325	Estiércol de paloma	
25	C 412	10326	Basura de corral de pollos de ciudad danesa	Almacenamiento sobre harina de patata y sesquicarbonato sódico.
30	C 413	10327	Arcilla de campiña de césped de Ascheberg, Holstein	Enriquecimiento con almidón (pH 11) con nitrógeno inorgánico.



Las investigaciones taxonómicas de todos estos miembros del género Bacillus han sido llevadas a cabo utilizando los métodos descritos por Smith, Gordos & Clark en "Aerobio Spore-ferming Bacteris", U.S. Department of Agr., Mosegraph No. 16 (1952). Estos métodos están considerados aún ahora como unos de los más satisfactorios, pero hubieron de ser modificados en vista del hecho de que todos los medios nutrientes tenían que ser ajustados sobre unos valores de pH mucho más altos que los indicados por Smith, Gordos & Clark porque todas las especies de Bacillus enumeradas en la Tabla I crecen a valores de pH elevados.

Las bacterias pueden ser divididas bastante correctamente en grupos morfológicos. Estos grupos difieren unos de otros en una magnitud tal que actualmente representan especies separadas.

Entre los grupos morfológicos se han encontrado variaciones en las reacciones bioquímicas. Sobre las bases de estas variaciones los grupos se han subdividido en variedades que son representadas por una o más cepas.

Las investigaciones taxonómicas se describen con detalle en la memoria de la Patente española nº. 358.722.

Sobre las bases de las investigaciones taxonómicas de los inventores los miembros del género Bacillus recopilados en la Tabla I serían clasificados como aparece en la Tabla II siguiente.

16.4.70.



Tabla II

Especies:	Variedad:	Cepas:
I	a	C 300, C 301, C 360
		C 372, C 374
	b	C 302, C 334
	c	C 323, C 339, C 352, C 369
	d	C 304, C 311, C 336
II		C 335, C 341
IV	a	C 303, C 354, C 357, C 366, C 367, C 371, C 375, C 378
	b	C 351, C 356, C 364, C 376, C 377, C 411
	c	C 358, C 410
V		C 365, C 412
VI	a	C 373
	b	C 325, C 413
VII		C 370

375481



Las enzimas proteolíticas a utilizar en el procedimiento según el invento pueden producirse por cultivo aerobio de cualquiera de las especies y cepas de las Tablas I y II. El cultivo se lleva a cabo de acuerdo con los principios conocidos en la técnica, salvo que durante el cultivo el medio nutriente que contiene fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, se mantiene a un valor de pH superior al utilizado hasta ahora, preferiblemente dentro del margen de 7,5 a 10,5. Los rendimientos obtenidos se determinan por el bien conocido método de la hemoglobina de Anson, cfr. Journal of General Physiology, 22, 79-89 (1959). Una unidad de Anson significa durante toda esta Memoria la cantidad de enzima proteolítica que digiere hemoglobina a un valor de pH de 10,1 y a una temperatura de 25°C durante un tiempo de reacción de 10 minutos con una velocidad inicial tal que por minuto hay formada una cantidad tal de productos divididos que no puede ser precipitada con ácido tricloroacético que estos productos divididos dan el mismo color con reactivo de fenol como lo hace un miliequivalente de tirosina.

El medio nutriente está compuesto en conformidad con los principios del arte conocidos. Fuentes convenientes de carbón asimilables son hidratos de carbono, tales como sacarosa, glucosa, almidón, harina de granos cereales, malta, arroz, sorgo etc. La concentración de carbohidratos puede variar entre límites bastante grandes, por ejemplo, por encima del 25% y por debajo del 1 - 5%, pero generalmente sería adecuado del 8 - 10%, estando calculado el porcentaje como dextrosa. Se ha encontrado que la presencia en el medio nutriente de carbohidratos dará

30  
16.4.70.

375 58 71

91F



lugar a la formación de componentes ácidos, resultando un decrecimiento del valor de pH durante el cultivo. Como es esencial mantener el valor del pH del medio nutriente entre el orden de 7 a 12 durante el cultivo, deben ser tomadas medidas que no dejen caer el valor del pH por debajo de 7 en un período esencial durante el cultivo. A fin de mantener el valor de pH entre el margen requerido, puede ser usada una cantidad limitada de carbohidratos juntamente con una sustancia reguladora que sea capaz de mantener el requerido valor de pH. Se ha encontrado que carbonatos, particularmente sesquicarbonatos, utilizados en una concentración de hasta 0,2 M en el medio, es capaz de crear un valor de pH de aproximadamente 10,5 y 9,3, respectivamente.

También pueden utilizarse otros sistemas reguladores o tamponadores, tales como reguladores de fosfato.

Es también posible iniciar el cultivo con un bajo contenido de carbohidratos y añadir pequeñas cantidades de carbohidratos sucesivamente durante el cultivo:

Una tercera posibilidad es hacer uso del control de pH automático por adición de varias sustancias de reacción básica utilizadas en esta técnica.

El uso de carbonatos y sesquicarbonatos como sustancias controladoras de pH es muy útil y es sorprendente que es posible durante el cultivo utilizar estos compuestos en las concentraciones ya referidas.

La fuente de nitrógeno en el medio nutriente puede ser de naturaleza inorgánica y/u orgánica. Fuentes inorgánicas de nitrógeno adecuadas son algunos nitratos



y sales de amonio, y entre las fuentes de nitrógeno orgánicas hay todo un número conocido para uso en procedimientos de fermentación y en los cultivos de bacterias. Ejemplos que ilustran son harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de cacahuet, caseína, licor de maceración de maiz, extractos de levaduras, urea, albúmina, etc.

Además, el medio nutriente contendría naturalmente las sustancias traza habituales.

La temperatura a la que tiene lugar el cultivo está normalmente en el mismo margen que la del cultivo conocido de las especies conocidas del género Bacillus. Generalmente es conveniente una temperatura entre 25 y 55°C. La temperatura es preferiblemente 30 a 40°C.

Como los cultivos se han de llevar a cabo bajo condiciones aerobias, es decir, cuando se usan tanques de fermentación, se hace necesario el uso de aireación artificial. La cantidad de aire es semejante a la que se usa en procedimientos de cultivo conocidos.

En general los rendimientos máximos de enzimas proteolíticas serán obtenidos después de un tiempo de cultivo de 1 a 5 días.

Ejemplos ilustrativos de medios de cultivo adecuados son:

1) Medio BPEA con la siguiente composición:

25	Harina de patata	50	g	por	litro	de	agua	corriente
	Sacarosa	50	g	"	"	"	"	"
	Harina de cebada	50	g	"	"	"	"	"
	Harina de soja	20	g	"	"	"	"	"
	Caseinato sódico	10	g	"	"	"	"	"
30	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	9	g	"	"	"	"	"

375481

14 JUL



Pluronic 0,1 g por litro de agua corriente

2) Medio BSX con la siguiente composición:

Harina de cebada 100 g por litro de agua corriente

Harina de soja 30 g " " " " "

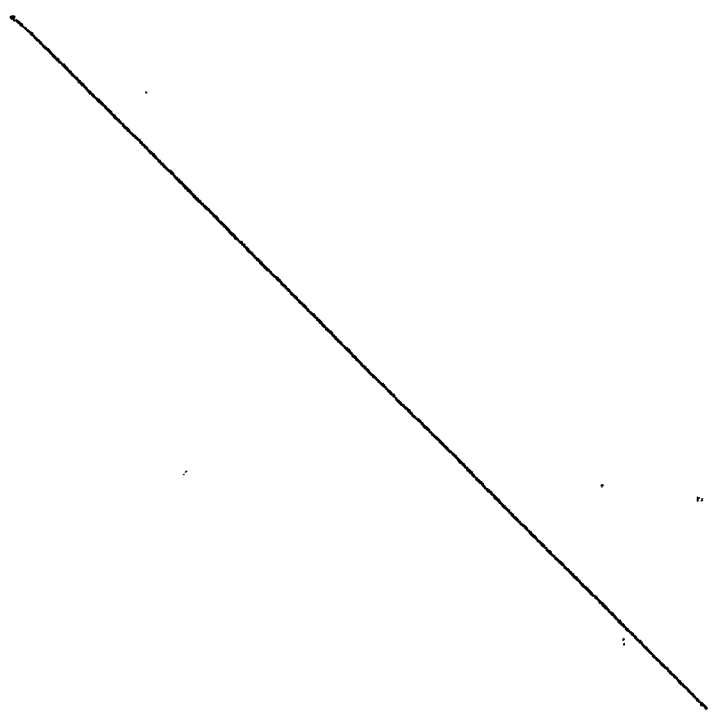
5 Pluronic 0,1 g " " " " "

Ambos medios son ajustados al valor de pH deseado por adición de sesquicarbonato o sosa bajo condiciones estériles. El almidón contenido en los medios fue licuado por medio de alfa-amilasa antes de la esterilización.

10

Los dos medios de cultivo BPEA y BSX cuando se usan para cultivo en tanques de acero inoxidable de 550 litros bajo condiciones sumergidas y aireación artificial, darán los resultados compilados en la siguiente Tabla III que da también información de las cepas utilizadas y de las condiciones de cultivo.

15



1.7.71.

375489



Tabla III

Cepa	C 335	C 339	C 351
Medio	BPFA	BPFA	BSX
Valor de pH antes de la inoculación	10,2	10,5	10,2
Temperatura de cultivo en grados Celsius	34	34	34
Aire, m <sup>3</sup> por minuto	0,25	0,25	0,3
Tiempo de cultivo en horas	84	97	83
Valor de pH final	9,2	9,1	9,35
Actividad proteolítica final expresada en unidades Anson por kg de sustrato	40	29	33

Con la cepa C 303 en cuatro series bajo diferentes condiciones se obtienen los resultados compilados en la siguiente Tabla IV.

16.4.70.

375481



Tabla IV

Cultivo Nº	1	2	3	4
Harina de cebada				
g/litro	100	100	150	200
Harina de soja g/litro	30	30	45	60
Pluronic ml/l	0,03	0,03	0,03	0,03
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (adición estéril antes de la inoculación)	0,2 M	0,2 M	0,2 M	0,4 M
pH antes de la inoculación	10,0	10,0	10,35	10,1
Temperatura de cultivo °C	34	34	34	34
Aire m <sup>3</sup> /minuto	0,3	0,3	0,3	0,3
Tiempo de cultivo en horas	125	104	113	126
pH máximo	9,3	9,3	9,6	9,3
Máximo de unidades Anson por kg	67	80	77	66

375481

Las enzimas proteolíticas pueden ser recuperadas a partir del caldo de cultivo por centrifugación, precipitando la enzima a partir del líquido así obtenido por adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ó etanol, separando el precipitado del líquido por filtración con kieselgur como auxiliar de filtración y secando el precipitado para formar un polvo que contiene las enzimas proteolíticas activas.



En la memoria de la Patente española nº 358.722 se encuentra más información detallada sobre la producción y separación de las enzimas proteolíticas a utilizar en el procedimiento del presente invento.

Pruebas de las enzimas proteolíticas obtenidas por los géneros enumerados en la Tabla II han mostrado que hay diferencias materiales entre las enzimas con respecto a sus propiedades.

Con respecto a la actividad proteolítica parece que las enzimas pueden dividirse en dos grupos o tipos cuando la actividad proteolítica se mide a pH 12 por el método de Anson y se expresa en porcentaje de actividad máxima, a saber:

Tipo 1: 100 a 80 %

Tipo 2: 80 a 50 %

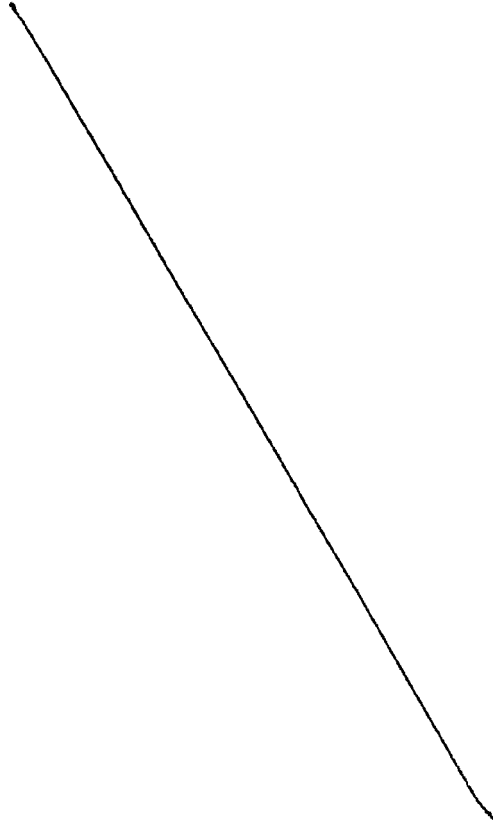
En el procedimiento del presente invento se prefiere incorporar en las composiciones detergentes y de lavado una o más de las enzimas proteolíticas de tipo 1, pero también son útiles las enzimas de tipo 2.

Es sabido en la técnica que los iones calcio estabilizan la actividad de la mayoría de las enzimas proteolíticas. Las nuevas enzimas producidas por las bacterias enumeradas en la Tabla I y divididas en especies y varie-



dades en la Tabla II han sido probadas con respecto a los efectos estabilizadores de los iones calcio en una concentración de 0,01M a pH 10,5 u 11, y la estabilización ha sido señalada en porcentaje de actividad residual después de dejar estar 30 minutos a 50°C. Los resultados de los tipos de enzima probados y el efecto de estabilización de los iones calcio son recopilados en la Tabla V en la que "mas" da a entender que la actividad proteolítica residual en ausencia de iones calcio está por debajo del 80 % de la correspondiente actividad del control en presencia de iones calcio, y "menos" significa que la actividad proteolítica residual en ausencia de iones calcio está por encima del 80% de la actividad correspondiente del control en presencia de iones calcio.

15



917



Tabla V

Especies	Var.	Cepas	Tipo de Enzima	Estabilización CA <sup>++</sup>
I	a	C 300, C 301, C 360, C 372, C 374	1	++++
	b	C 302, C 334	1	++
	c	C 323, C 339, C 352, C 369	2	?+++
	d	C 304, C 311, C 336	1	+++
II		C 335, C 341	2	++
IV	a	C 303, C 354, C 357, C 366, C 367, C 371, C 375, C 378	1	-----?
	b	C 351, C 356, C 364, C 376, C 377, C 411	1	-?-----
	c	C 358, C 410	1	-+
V		C 365, C 412	1	-?
VI	a	C 373	1	-
	b	C 325, C 413	1	??
VII		C 370	1	-

375481

24 ABR



De acuerdo con el invento, se prefiere incor-  
porar enzimas que muestren su actividad proteolítica ópti-  
ma en ausencia de iones calcio. La actividad proteolítica  
de las enzimas producidas por los géneros enumerados en la  
5 Tabla V ha sido probada no solamente a pH 12, sino también  
a valores de pH inferiores para dar una impresión más de-  
tallada de la actividad proteolítica a diferentes valores  
de pH y más información de la actividad de los tres tipos  
de enzimas. Con propósito de ilustración se hace referen-  
10 cia a los dibujos en los que

Fig. 1 muestra la actividad proteolítica de  
la enzima producida por la cepa C 311,  
perteneciendo dicha enzima al tipo  
1, y

15 Fig. 2 muestra de la misma manera la actividad  
de la enzima producida por la cepa  
C 335, perteneciendo dicha enzima al  
tipo 2.

Debería entenderse que el propósito de mos-  
20 trar las curvas de actividad en los dibujos es para ilus-  
trar en principio la diferencia de actividad de los tres  
tipos de enzimas proteolíticos al variar los valores de pH  
y que la curva de actividad para cada tipo puede variar  
algo sin pérdida de su apariencia característica. En estas  
25 curvas se ha llevado sobre el eje de abscisas el pH y so-  
bre el de ordenadas, la actividad en porcentajes.

La utilidad de las nuevas enzimas para su  
incorporación en composiciones detergentes y de lavado se  
desprenderá de las siguientes pruebas:

16.4.70.

375481



f) Estabilidad de pH

En conexión con las cinco preparaciones de enzima ha sido determinada la estabilidad a diferentes valores de pH bajo las siguientes condiciones:

- 5                      Duración:            24 horas a 25°C  
                          Valores de pH    5 - 7 - 8 - 10 - 12  
                          Concentración de enzima 0,2 unidades Anson  
                          por litro.

- 10                    En la Tabla VI se indica el margen de pH  
dentro del cual se hubo encontrado una actividad residual de 80 a 100%.

- 15                    Pruebas de la preparación de enzima producidas por la cepa C 303 contra sulfito sódico han demostrado que la enzima no es sensible a este agente reductor, lo cual puede indicar que los puentes S-S no son esenciales para la estructura terciaria de la enzima.

16.4.70.

375481



Tabla VI

Cepa	Preparación de enzima en forma de polvo	Actividad Unidades Anson por g a pH	Tipo de enzima	Estabilidad			Temperatura óptima °C	Serina	pH de estabilidad		
				TFF	surfactantes						
					perbo	jabón				DES	TAS
C 300	2	0,5 (10)	1	2	89	82/71	56/48	7/6	50	+	
C 301	2	0,7 (10)	1	4	47	50/47	35/31	4/2	50	+	
C 302	3	0,7 (10)	1	1	48	59/56	60/-	3/1	50	+	
C 303	600	3,0 (7,5)	1	91	95	85/50	40/30	23/18	60	+	6,0 - 10,5
C 304	2,5	0,3 (7,5)	1	2	4	57/56	34/31	3/0	50	+	
C 334	1500	0,5 (7,5)	1	95	39	100/83	90/27	93/73	40	+	
C 351	9	1,3 (7,5)	1	78	66	93/67	67/50	53/45	60	+	
C 354	42	0,6 (7,5)	1	94	82	77/33	60/38	60/53	60	+	
C 360	117	0,4 (7,5)	1	0	83	97/94	76/70	75/75	50	+	
C 364	456	0,9 (7,5)	1	90	80	81/31	27/11	16/8	60	+	
C 365	2000	0,4 (7,5)	1	94	86	100/0	72/30	92/48	60	+	
C 366	26	0,8 (7,5)	1	100	96	92/42	67/14	68/61	60	+	
C 367	500	2,2 (7,5)	1	94	100	88/2	58/34	71/52	60	+	5,0 - 11,0
C 370	3000	0,6 (7,5)	1	89	91	94/4	33/15	67/30	60	+	
C 371	50	1,0 (7,5)	1	95	93	97/60	70/44	93/57	60	+	
C 372	430	2,7 (7,5)	1	6	60	98/95	75/68	87/85	50	+	6,0 - 10,5
C 376	17	7,8 (7,5)	1	88	78	66/42	25/10	15/12	60	+	
C 377	213	1,9 (7,5)	1	93	86	100/10	59/27	74/59	60	+	
C 335	1500	0,3 (7,5)	2	60	29	95/51	40/32	78/71	55	+	
C 339	217	1,4 (7,5)	2	16	76	89/10	75/57	83/62	45	+	6,3 - 10,3
C 369	7,2	1,4 (7,5)	2	81	2	28/28	6/6	0/0	50	+	

375461

-24-

375461

Tabla VI

Cepa	Preparación de enzima en forma de polvo	Actividad Unidades Anson por g a pH	Tipo de enzima	Estabilidad			
				TPP perbo rato	surfactantes		
					jabón	DBS	
C 300	2	0,5 (10)	1	2	89	82/71	56/48
C 301	2	0,7 (10)	1	4	47	50/47	35/31
C 302	3	0,7 (10)	1	1	48	59/56	60/-
C 303	600	3,0 (7,5)	1	91	95	85/50	40/30
C 304	2,5	0,3 (7,5)	1	2	4	57/56	34/31
C 334	1500	0,5 (7,5)	1	95	39	100/83	90/27
C 351	9	1,3 (7,5)	1	78	66	93/67	67/50
C 354	42	0,6 (7,5)	1	94	82	77/33	60/38
C 360	117	0,4 (7,5)	1	0	83	97/94	76/70
C 364	456	0,9 (7,5)	1	90	80	81/31	27/11
C 365	2000	0,4 (7,5)	1	94	86	100/0	72/30
C 366	26	0,8 (7,5)	1	100	96	92/42	67/14
C 367	500	2,2 (7,5)	1	94	100	88/2	58/34
C 370	3000	0,6 (7,5)	1	89	91	94/4	33/15
C 371	50	1,0 (7,5)	1	95	93	97/60	70/44
C 372	430	2,7 (7,5)	1	6	60	98/95	75/68
C 376	17	7,8 (7,5)	1	88	78	66/42	25/10
C 377	213	1,9 (7,5)	1	93	86	100/10	59/27
C 335	1500	0,3 (7,5)	2	60	29	95/51	40/32
C 339	217	1,4 (7,5)	2	16	76	89/10	75/57
C 369	7,2	1,4 (7,5)	2	81	2	28/28	6/6

375481

VI



bibilidad			Temperatura:	Serina	pH de estabilidad:
factantes			óptima °C		
jabón	DBS	TAS			
82/71	56/48	7/6	50	+	
50/47	35/31	4/2	50	+	
59/56	60/-	3/1	50	+	
85/50	40/30	23/18	60	+	6,0 - 10,5
57/56	34/31	3/0	50	+	
00/83	90/27	93/73	40	+	
93/67	67/50	53/45	60	+	
77/33	60/38	60/53	60	+	
97/94	76/70	75/75	50	+	
81/31	27/11	16/8	60	+	
00/0	72/30	92/48	60	+	
92/42	67/14	68/61	60	+	
88/2	58/34	71/52	60	+	5,0 - 11,0
94/4	33/15	67/30	60	+	
97/60	70/44	93/57	60	+	
98/95	75/68	87/85	50	+	6,0 - 10,5
66/42	25/10	15/12	60	+	
00/10	59/27	74/59	60	+	
95/51	40/32	73/71	55	+	
89/10	75/57	83/62	45	+	6,3 - 10,3
28/28	6/6	0/0	50	+	

37 3 48 3



A partir de la tabla VI se verá que cierto número de preparaciones de enzimas muestran propiedades de estabilidad asombrosas.

5 En general, las enzimas proteolíticas se incorporan en las composiciones detergentes y de lavado en forma de una mezcla sólida o líquida de las enzimas proteolíticas y otros componentes, que actúan como vehículos. Cuando las preparaciones o composiciones de enzimas están en forma sólida, pueden consistir en gránulos en los que  
10 están incorporadas las enzimas, por ejemplo juntamente con otras enzimas o sustancias que tienen otra actividad que la enzimática útiles para la utilidad de las composiciones detergentes y de lavado. Cuando las enzimas no son utilizadas en forma cristalina, pueden ir acompañadas por impurezas de naturaleza orgánica, tales como proteínas y carbohidratos del medio de cultivo.  
15

Las composiciones enzimáticas en forma líquida pueden consistir en soluciones o suspensiones que contienen, si es necesario, agentes estabilizadores.

20 Generalmente las nuevas enzimas se incorporan en pequeñas cantidades. En vista de ello las preparaciones o composiciones de enzimas normalmente muestran un contenido en enzima que no excede de alrededor de 10 % en peso.

25 Los siguientes experimentos de lavado muestran los resultados que se pueden obtener incorporando las nuevas enzimas en composiciones detergentes y de lavado.

Los experimentos de lavado fueron llevados a cabo usando las bandas o vendas de prueba EMPA 116 y 112,  
30 respectivamente. En otras palabras, en los experimentos de



lavado habían sido usadas bandas de prueba manchadas con sangre, leche y negro de humo (Nº 116) o con cacao, leche y azúcar (Nº 112). Los experimentos fueron llevados a cabo con los dos tipos de bandas de prueba separadamente y cada experimento fué repetido tres veces a 50°C y a 60°C. La concentración de las enzimas en la solución de lavado era de 0,048 unidades Anson por litro.

El detergente, que ha de ser un detergente enérgico, tenía la siguiente composición:

10	Nansa S (40 % alquilarilsulfonato sódico, 60 % sulfato sódico)	250 g
	Nonilfenol, 10 EO	30 g
	Jabón (80 %)	30 g
15	Tripolifosfato sódico	300 g
	CMC (60 %)	16 g
	Carbonato sódico, anhidro	80 g
	Sulfato sódico, anhidro	74 g
	Perborato sódico, (NaBO <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O)	<u>220 g</u>
20	Total	1000 g

Las otras condiciones fueron como sigue:

	Dureza del agua en grados alemanes	10º
	Proporción de tejido a agua	1:40
25	Tiempo de experimento	30 minutos
	Valor de pH	alrededor de 10
	Concentración de detergente	4,0 g por litro de solución de lavado.

El procedimiento de lavado llevado a cabo

a 50°C fué como sigue:



Por medio de una pipeta fueron añadidos 20 ml de la solución de enzimas con una actividad de 0,288 unidades Anson por litro, a un vaso de precipitados de 150 ml. De antemano, se había ajustado el valor de pH a 10,0 y la temperatura a 20°C. En el tiempo cero fueron añadidos 100 ml de solución detergente ajustada a pH 10,3 y a 56°C. La concentración del detergente era 4,8 g por litro. El vaso fué colocado inmediatamente en un termostato de agua a 50°C y fueron añadidas 6 muestras circulares de prueba EMPA con un peso total de 3,0 g. Se efectuó agitación con una espátula de vidrio durante 10 segundos y el vaso se dejó en el termostato 30 minutos en total, siendo efectuada agitación durante 10 segundos cada 4 minutos. Acto seguido fué separada la solución de lavado, y después del enfriamiento fué medido el valor de pH. Las vendas de prueba fueron aclaradas en agua corriente durante 10 minutos y acto seguido secadas entre dos toallas y planchadas. Cada vonda de prueba fué sometida a medidas de remisión en un espectrofotómetro de Beckman a 460 m $\mu$ .

Además de estos experimentos fueron llevados a cabo experimentos de control en los que la solución de enzimas fué sustituida por agua.

En los experimentos llevados a cabo a 60°C la temperatura de la solución de detergente fué ajustada a 68°C.

Los resultados de estos experimentos son recopilados en la siguiente Tabla VII.

30

4-2-70

- 27 -

375481



Tabla VII

5	Enzima de la cepá	Remisión de las vendas de ensayo EMPA					
		no tra tado	116 Después de empa par y aclarar		no tra tado	112 Después de empa par y aclarar	
			50°C	60°C		50°C	60°C
10	Ningu na	11,9	14,6	17,8	34,0	41,1	40,3
	C 303		32,6	33,4		41,5	43,9
	C 339		27,0	23,0		39,3	39,7
	C 351		30,0	27,7		40,5	40,2
	C 367		34,0	33,0		39,7	41,3
	C 377		34,0	33,2		41,7	43,8
15	C 364		33,6	31,0		41,9	43,5
	C 372		38,1	29,7		43,6	42,5
	C 376		32,7	32,7		42,4	43,2
	C 366		35,8	33,5		41,2	41,5

Los valores de remisión son cifras promedio de medidas de cada una de las seis vendas de prueba en cada uno de los experimentos.

Otras series de experimentos de lavado han sido llevados a cabo con vendas de prueba EMPA N° 116 previamente tratadas con una solución que contiene un surfactante aniónico y perborato sódico a temperatura de 40°C durante 20 minutos. Después del tratamiento las vendas de prueba fueron aclaradas y secadas. El tratamiento con perborato resulta en una fijación grave de la suciedad, que sería luego más difícil de sacar.

16.4.70.

11 FEB



El detergente tenía la siguiente composición:

	Nonilfenol, 10 EO	80 g
	Tripolifosfato sódico	400 g
5	CMC (45 %)	20 g
	Carbonato sódico, anhidro	150 g
	Sulfato sódico, anhidro	<u>350 g</u>
	Total	1000 g

Restantes condiciones:

10 Agua 10º alemanes de dureza

Proporción de tejido a agua 1:40

Tiempo 30 minutos

15 Temperatura 45ºC

pH alrededor de 10

Concentración de detergente 4,0 g por litro de solución de lavado.

20 El procedimiento fué como se indicó en los experimentos de lavado arriba mencionados, excepto que la solución de lavado tenía una temperatura de 50ºC antes de ser mezclada con la solución de enzimas.

25 Se habían llevado a cabo tres experimentos con cada una de las enzimas, y los resultados aparecen en la siguiente Tabla VIII.

30

375481

Tabla VIII



Enzimas de la cepa o género		Remisión de la venda de prueba EMPA Nº 116 no tratado: después de empapar y aclarar	
5	Ninguna	16,4	18,7
	C 303		36,8
	C 339		32,3
	C 351		31,0
10	C 367		34,3
	C 377		37,6
	C 364		34,6
	C 372		43,2
	C 376		36,8
15	C 366		37,3

Los valores de remisión son cifras promedio de medidas de cada una de las seis vendas de prueba en cada uno de los experimentos, excepto que los valores en relación con los experimentos con enzimas del género C 339 y C 351 están basados sobre una medida.

Se han llevado a cabo experimentos también usando diferentes concentraciones de enzimas en la solución de lavado, a saber, en los intervalos entre 0,02 y 0,16 unidades Anson por litro de solución de lavado. Para los experimentos fueron usadas vendas de prueba EMPA Nº 116 y el detergente era el mismo que el utilizado en relación con los primeros experimentos de lavado mencionados, a saber

30



	Nansa S (40 % alkilarilsulfonato sódico, 60 % sulfato sódico)	250 g
	Nonilfenol, 10 EO	30 g
5	Jabón (80 %)	30 g
	Tripolifosfato sódico	300 g
	CMC (60 %)	16 g
	Carbonato sódico, anhidro	80 g
	Sulfato sódico, anhidro	74 g
10	Perborato sódico ( $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	<u>220 g</u>
	Total	1000 g

Las condiciones de prueba fueron como sigue:

	Agua	10º alemanes de du- reza
15	Proporción de tejido a agua	1:40
	Tiempo	30 minutos
	Temperatura	45º C y 60º C
	pH	alrededor de 10
20	Concentración de de- tergente	4,0 g por litro de solución de lavado.

El procedimiento es el mismo que se divulgó en los primeros experimentos mencionados, excepto que la concentración de la solución de enzimas fué variada de tal manera que la actividad en la solución de lavado alcanzara los siguientes valores:

0,02 - 0,04 - 0,08 - 0,16 unidades Anson por litro.

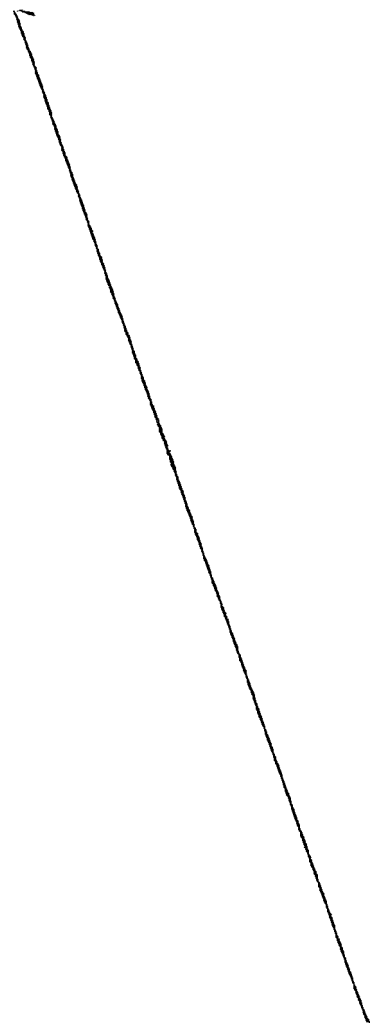
Antes de que la solución del detergente fue-

375484



ra mezclada con la solución de enzimas fue ajustada a 50°C y 68°C, respectivamente, correspondiendo a una temperatura de 45°C y 60°C, respectivamente, en la solución de lavado dispuesta para el uso.

5 Cada preparación de enzimas fue probada a ambas temperaturas. Los resultados de las medidas de remisión son recogidos en la siguiente Tabla IX.



16.4.70.

375481



11 FEB 1964

Tabla IX

Remisión de las vendajes prueba E-PA 116

Encina de la cepa	Temperatura °C	0	Unidades Anson por litro de solución de lavado				
			0,02	0,04	0,08	0,16	
0 303	45	15,0	25,8	28,8	33,5	36,8	
0 339	45	16,02	25,8	29,7	32,5	36,0	
0 351	45	15,7	26,0	30,8	34,2	37,3	
0 367	45	14,0	25,2	28,3	31,7	36,3	
0 377	45	16,5	29,2	32,2	36,8	41,7	
0 364	45	15,3	27,2	29,3	33,7	36,7	
0 372	45	16,2	33,0	36,6	42,0	46,1	
0 376	45	17,5	30,0	33,7	36,3	39,8	
0 366	45	16,7	31,8	34,0	38,3	46,7	
0 303	60	19,2	29,8	32,0	34,1	36,1	
0 339	60	16,9	20,9	21,7	25,4	28,8	
0 351	60	17,4	27,0	28,8	32,4	34,4	
0 367	60	17,3	28,8	30,3	32,6	34,1	
0 377	60	17,4	27,0	28,8	32,4	34,4	
0 364	60	20,8	28,7	29,8	33,0	33,5	
0 372	60	17,0	21,3	23,7	25,7	29,1	
0 376	60	19,0	28,4	31,4	33,6	35,5	
0 366	60	19,0	32,0	32,5	35,0	38,9	

33- 431

-33-

11 FEB 1964

Tabla IX

Remisión de las vendase pruel

Enzima de la cepa	Temperatura °C	0	Unidades
C 303	45	15,0	
C 339	45	16,02	
C 351	45	15,7	
C 367	45	14,0	
C 377	45	16,5	
C 364	45	15,3	
C 372	45	16,2	
C 376	45	17,5	
C 366	45	16,7	
C 303	60	19,2	
C 339	60	16,9	
C 351	60	17,4	
C 367	60	17,3	
C 377	60	17,4	
C 364	60	20,8	
C 372	60	17,0	
C 376	60	19,0	
C 366	60	19,0	

373499

Tabla IX

e las vendase prueba EMPA 116



0	Unidades Anson por litro de solución de lavado			
	0,02	0,04	0,08	0,16
,0	25,8	28,8	33,5	36,8
,02	25,8	29,7	32,5	36,0
,7	26,0	30,8	34,2	37,3
,0	25,2	28,3	31,7	36,3
,5	29,2	32,2	36,8	41,7
,3	27,2	29,3	33,7	36,7
,2	33,0	36,6	42,0	46,1
,5	30,0	33,7	36,3	39,8
,7	31,8	34,0	38,3	46,7
,2	29,8	32,0	34,1	36,1
,9	20,9	21,7	25,4	28,8
,4	27,0	28,8	32,4	34,4
,3	28,8	30,3	32,6	34,1
,4	27,0	28,8	32,4	34,4
,8	23,7	29,8	33,0	33,5
,0	21,3	23,7	25,7	29,1
,0	28,4	31,4	33,6	35,5
,0	32,0	32,5	35,0	38,9

489

Los valores de remisión son cifras promedio

31 FEB



de seis medidas,. Finalmente fueron llevados a cabo los siguientes

EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO (DURACION EN ALMACEN)

Cada preparación de enzima fué mezclada en una mezcladora Turbula con el detergente mencionado en la pág. 26. Experimentos correspondientes fueron llevados a cabo con el mismo detergente, excepto que el perborato fué sustituido por sulfato sódico anhidro. El contenido de agua en el detergente que no contiene perborato era 2,7 %. El contenido de agua en el detergente que contenía perborato era naturalmente correspondientemente más alto porque el perborato contiene aproximadamente un 47 % de agua de cristalización.

Todas las mezclas fueron analizadas en cuanto a su actividad proteolítica inmediatamente después de preparadas y acto seguido fueron colocadas en recipientes de vidrio herméticamente cerrados, a 40°C. Los análisis de actividad proteolítica fueron repetidos con ciertos intervalos. Los análisis fueron llevados a cabo como sigue:

Se tomó una muestra de doce lugares diferentes de los recipientes de vidrio, que pesaba 12,5 g y que fué transferida a un matraz volumétrico de un litro. Respecto a la mezcla que contenía perborato se habían añadido 4,4 g de sulfito sódico a fin de neutralizar el perborato. Se añadió agua desionizada hasta la señal de aforo, y la solución fué acto seguido guardada durante 30 minutos a 25°C mientras se agitaba mecánicamente. Luego fué determi-



nada la actividad proteolítica en unidades Anson.

Las mezclas probadas y la actividad proteolítica residual medida a los varios períodos de almacenamiento han sido recopiladas en la siguiente Tabla X.

5

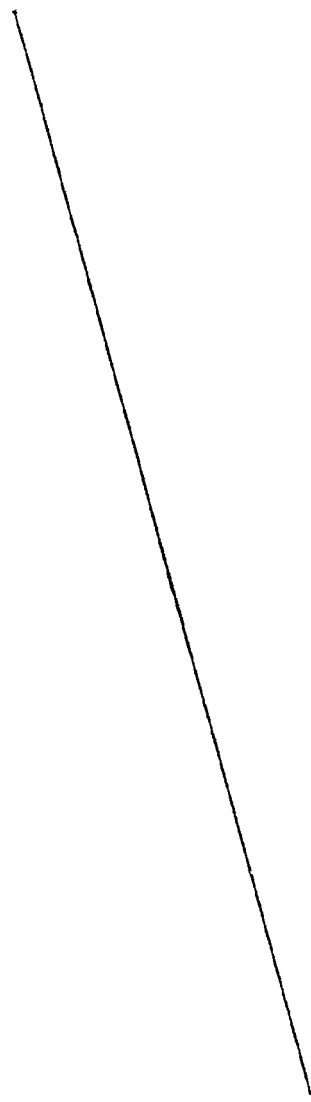




Tabla X

Detergente	Ferbo	Tiempos							
		0 días	1 día	3 días	5 días	8 días	14 días	21 días	28 días
Unidades Anson	Porcentaje	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.
0 303	-	2,90 100	2,94 101	2,85 100		3,00 103	2,95 101	2,80 97	3,00 103
	+	2,90 100	2,78 96	2,90 100		2,50 86	2,50 86	1,86 67	
0 367	-	4,20 100	4,00 95	3,60 86		3,72 88	3,80 90	3,95 94	
	+	4,20 100	4,20 100	4,30 80		2,30 55	2,00 47	1,90 45	
0 377	-	2,65 100	2,50 94	2,38 90		2,40 90	2,50 94	2,41 90	
	+	2,65 100	2,65 100	2,30 86		1,62 61	0,37 52	1,44 54	
0 364	-	0,70 100	0,70 100		0,72 103	0,72 103	0,66 94	0,70 100	
	+	0,70 100	0,70 100		0,72 103	0,57 81	0,46 66	0,43 61	
0 372	-	2,97 100	2,97 100		3,00 100	3,00 100	2,94 100	3,00 100	
	+	2,84 100	2,57 90		2,10 74	2,10 74	1,40 49	1,03 36	
0 376	-	8,60 100	7,70 90		8,60 100	8,60 100	8,00 93	8,10 94	
	+	(7,90)	8,20 96		7,70 90	7,70 90	7,00 81	5,50 64	
0 366	-	0,90 100	0,86 95		0,94 104	0,94 104	0,87 97	0,85 95	
	+	0,90 100	0,70 78		0,70 78	0,70 78	0,71 79	0,68 76	

UA/g = Unidades Anson por gramo  
 Act. % = Porcentaje de actividad proteolítica residual.

375481

-36-

375481 - 36 - B-9

Tabla X

Detergente	Perbo	Tiempos				
		Unidades Anson por gramo de enzima y porcentaje de actividad				
		0 días	1 día	3 días	5 días	8 días
mas enzima	rato	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.	UA/g Act.
a partir de:		%	%	%	%	%
la cepa						
C 303	-	2,90 100	2,94 101	2,85 100		3,00 103
	+	2,90 100	2,78 96	2,90 100		2,50 86
C 367	-	4,20 100	4,00 95	3,60 86		3,72 88
	+	4,20 100	4,20 100	4,30 80		2,30 55
C 377	-	2,65 100	2,50 94	2,38 90		2,40 90
	+	2,65 100	2,65 100	2,30 86		1,62 61
C 364	-	0,70 100	0,70 100		0,72 103	0,72 103
	+	0,70 100	0,70 100		0,72 103	0,57 81
C 372	-	2,97 100	2,97 100		3,00 100	3,00 100
	+	2,84 100	2,57 90		2,10 74	2,10 74
C 376	-	8,60 100	7,70 90		8,60 100	8,60 100
	+	(7,90)	8,20 96		7,70 90	7,70 90
C 366	-	0,90 100	0,86 95		0,94 104	0,94 104
	+	0,90 100	0,70 78		0,70 78	0,70 78

UA/g = Unidades Anson por gramo

Act. % = Porcentaje de actividad proteolítica residual.

375481

-36-

X



OS  
centaje de actividad después de almacenamiento a 40°C en

8 días		14 días		21 días		28 días	
UA/g Act. %		UA/g Act. %		UA/g Act. %		UA/g Act. %	
3,00	103	2,95	101	2,80	97	3,00	103
2,50	86	2,50	86	1,86	67		
3,72	88	3,80	90	3,95	94		
2,30	55	2,00	47	1,90	45		
2,40	90	2,50	94	2,41	90		
1,62	61	0,37	52	1,44	54		
0,72	103	0,66	94	0,70	100		
0,57	81	0,46	66	0,43	61		
3,00	100	2,94	100	3,00	100		
2,10	74	1,40	49	1,03	36		
8,60	100	8,00	93	8,10	94		
7,70	90	7,00	81	5,50	64		
0,94	104	0,87	97	0,85	95		
0,70	78	0,71	79	0,68	76		

11 FEB 1968

La estabilidad de algunas de las enzimas en presencia de perborato es considerable.

5 Las preparaciones de enzimas para su incorporación en composiciones detergentes y de lavado son generalmente puestas al mercado en forma de polvo, del cual la enzima o enzimas activas constituyen la menor cantidad, el resto del polvo consiste en sales inorgánicas, tales como sulfato sódico, fosfato cálcico y cloruro sódico, a veces juntamente con otras sustancias que forman los constituyentes de los detergentes finales.

10 Como las enzimas proteolíticas han encontrado ya uso como constituyentes de composiciones detergentes, todas las personas capacitadas en la técnica sabrán cómo incorporar las preparaciones de enzima o composiciones en las composiciones detergentes y de lavado.

15 Es una mejora esencial que muchas de las enzimas muestren óptima actividad proteolítica a elevados valores de pH y estabilidad mejorada en presencia de perboratos.

20 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 3 de Octubre de 1.967, bajo el Nº 45046/67 prov., el 26 de Julio de 1.968, bajo el Nº 35921/68 prov., y el 3 de Octubre de 1.968 Completa, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

30

4-2-70

375481



## REIVINDICACIONES

5

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

10

1.- Un procedimiento en la producción de composiciones detergentes y de lavado, caracterizado por incorporar en las composiciones una o más enzimas proteolíticas que muestran actividad proteolítica óptima contra la hemoglobina en presencia de urea a un valor de pH superior a 9.

15

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por incorporar una o más enzimas que muestran una actividad proteolítica que es de 80 a 100% de la actividad máxima cuando se mide por el método de Anson a un valor de pH de 12.

20

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por incorporar una o más enzimas que muestran una actividad proteolítica que es de 50 a 80% de la actividad máxima cuando se mide por el método de Anson a un valor de pH de 12.

25

4.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por incorporar una o más enzimas que muestran su actividad proteolítica óptima en ausencia de iones calcio.

5.- Un procedimiento según cualquiera de

30

4-3-70



las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por incorporar una o más enzimas producidas por cultivo de especies del género Bacillus capaces de crecer y producir las enzimas a un valor de pH del medio nutriente dentro del margen de 9 a 11.

5

6.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por incorporar una o más enzimas producidas por cultivo de una o más de las especies I, II y IV a VII definidas en la memoria descriptiva.

10

7.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por incorporar una o más de las enzimas producidas por las bacterias recogidas en la Tabla I de la memoria descriptiva.

15

8.- Un procedimiento en la producción de composiciones detergentes y de lavado.

Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

20

La presente Memoria consta de treinta y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 FEB. 1970

P.A.

Alberto de Elizabury  
 Por Poder

25

4-2-70 RMM

375481

375481

11 FEB 1970



Fig. 1

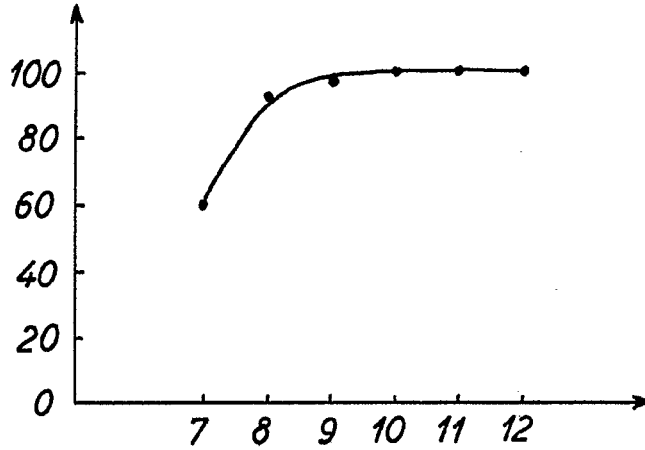
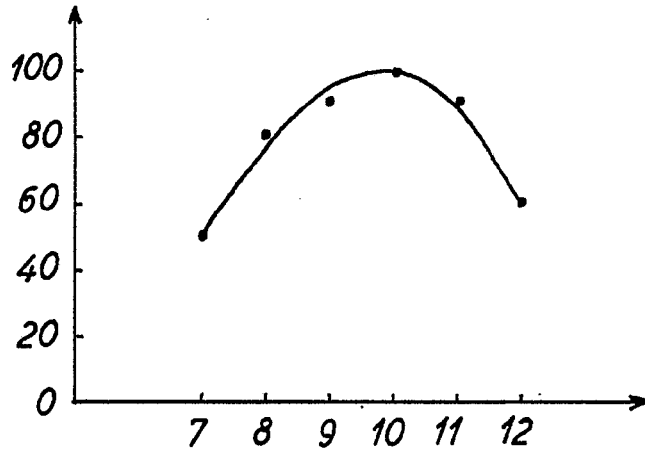


Fig. 2



Alberto de Eizaguru  
Por Poder.