

SECCION INTERNACIONAL
REGISTRACION I. P. C.
CLASE e 12
SUBCLASE 1

P.- 45.965

B 1 5208
Case P.C. (CH)
5213 A LH(SDG)

384356

20 NOV. 1970



Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de PFIZER INC.

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 235 East 42nd Street, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR ACIDO CITRICO".-
(Clase Internacional C12d).-

20 NOV



5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir ácido cítrico por fermentación. En particular se refiere a un procedimiento para producir ácido cítrico en forma de ácido libre, permitiendo así su cristalización directa a partir del caldo de fermentación.

10 Debido a su facilidad de asimilación, buen sabor al paladar y baja toxicidad, el ácido cítrico es uno de los ácidos más comúnmente usados en la industria alimenticia y farmacéutica. Es muy usado como acidulante de bebidas, y también como antioxidante para inhibir el enranciamiento de grasas y aceites. Tanto el ácido libre como sus sales se emplean como tampones en la preparación de mermeladas, jaleas y preparaciones de gelatina, y se usan también como estabilizantes en diversos productos alimenticios.

15 La mayor parte del suministro mundial de ácido cítrico es producida por procedimientos de fermentación, usando generalmente cepas elegidas de Aspergillus niger, con carbohidratos, tales como melazas y dextrosa, como fuente principal de carbono asimilable. Aunque estos procedimientos de fermentación con Aspergillus niger son atractivos, se experimentan muchas dificultades. Por ejemplo, durante un periodo de tiempo tiende a degenerar la capacidad del cultivo de Aspergillus niger para producir ácido cítrico. Tiene más importancia el hecho de que el ácido cítrico es recuperado en forma de sal, que luego ha de ser acidificada y convertida en el ácido libre. Además, se requiere un periodo de tiempo relativamente largo, generalmente mayor que 7 días, para producir grandes cantidades de ácido cítrico por tales fermentaciones.

384356

20 NOV



Este largo tiempo de fermentación, y la etapa extra de convertir la sal de citrato en ácido libre son factores grandes en el corte de producción de ácido cítrico. Así, es evidente que tiene considerable importancia comercial el desarrollo de un procedimiento de fermentación rápido, para la producción y recuperación directos de ácido cítrico.

La patente belga 716.247 presenta un procedimiento para producir ácido cítrico usando como inoculantes diversas levaduras del género Candida, que son capaces de acumular ácido cítrico y de asimilar hidrocarburos, y fermentando a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7,5 hasta que se haya acumulado en el caldo una cantidad sustancial de ácido cítrico. Sin embargo, aquí el ácido cítrico es producido de nuevo como citrato cálcico, y ha de ser acidificado, usualmente con ácido sulfúrico, para convertirlo en el ácido cítrico libre, más deseable.

Hay otros informes en la bibliografía describiendo la propagación de miembros de género Candida en medios que contienen hidrocarburos, por ejemplo I. Tanabe, J. Okada y H. Ono, Agr. Biol. Chem., 30, 1175 (1.966), E.J. Nyns, J.P. Auquierre, N. Chiang y A.L. Wiaux Nature 215, 177 (1967), M.J. Klug y A.J. Markovetz, Appl. Microbiol., 15, 690 (1967), J. Bacteriol., 93, 1847 (1967). Sin embargo, aparentemente nadie ha tenido éxito hasta ahora en la producción de ácido cítrico libre en tales sistemas de hidrocarburo. Una propiedad característica de la mayoría de las cepas de Candida que acumulan ácido cítrico es que los alcoholes polivalentes eritrita, arabinita y manita son coproducidos en el caldo de fermenta-

384356

20 NO



5 ción, con los citratos. Una característica distintiva
adicional de la presente invención es que las propieda-
des superiores de acumulación de ácido cítrico que tiene
la nueva cepa de Candida lipolytica están acompañadas
por una coproducción de solo pequeñas cantidades de eri-
trita, y como máximo de solo trazas de arabita y manita.
Así, la mayor concentración de ácido cítrico, presente
en forma de ácido libre el bajo pH final del caldo fer-
mentación, y la pequeña cantidad de impurezas coproduci-
10 das, en combinación, permiten aislar directamente el áci-
do cítrico del caldo de fermentación filtrado.

La presente invención proporciona ahora un pro-
cedimiento para producir ácido cítrico fermentado aerobia-
mente un medio nutriente acuoso que contiene un hidrocar-
buro o mezcla de hidrocarburos como fuente principal de
15 carbono asimilable, con una cierta cepa nueva del género
Candida, durante aproximadamente de 4 a 7 días, y recupe-
rando el ácido libre directamente por concentración del
caldo de fermentación filtrado. En particular, esta in-
vención comprende un procedimiento para producir ácido
20 cítrico fermentando aerobiamente Candida lipolytica ATCC
Nº 20.228, en un medio nutriente que contiene al menos
un hidrocarburo n-alcano o n-alqueno de 9 a 19 átomos de
carbono, que es mezclado íntimamente con una fase acuosa
que contiene una fuente asimilable de nitrógeno, minerales
25 y otros productos nutrientes usuales.

En el procedimiento de la invención no se re-
quiere generalmente ajuste del pH durante el ciclo de fer-
mentación, y hacia el final de la fermentación, general-
mente tras estar el procedimiento completado en al menos
30

384356

la mitad o tres cuartas partes, el pH del caldo de fermentación disminuye hasta de aproximadamente 2 a aproximadamente 3. En comparaciones estrechas con Candida lipolytica IFO-1437, mencionada en la antes mencionada patente belga 716.247, la nueva cepa de Candida lipolytica, ATCC N^o 20.228, produce aproximadamente de 5 a 10 veces más de ácido cítrico. En ningún momento durante el ciclo de fermentación disminuye por debajo de 3 el pH del caldo de fermentación inoculado con la cepa Candida lipolytica IFO-1437 de la técnica anterior. Sin embargo, sorprendentemente, se ha descubierto que el pH del caldo de fermentación, usando la nueva cepa ATCC 20.228, no necesita ser ajustado durante el ciclo de fermentación, y que se acumulan altos rendimientos de ácido cítrico en el intervalo de pH final, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3. El ácido cítrico libre acumulado es recuperado directamente por concentración del caldo de fermentación filtrado, tras eliminar los iones metálicos del tampón.

Se ha hallado ahora que una cierta cepa de la levadura Candida lipolytica tiene la peculiar capacidad de acumular ácido cítrico en forma de ácido libre, durante la fermentación aerobia de medios acuosos que contienen un hidrocarburo como fuente, principal o exclusiva, de carbono asimilable, con tal que, sin embargo, el pH de la fermentación sea mantenido bajo, es decir, el ácido cítrico no sea neutralizado a medida que se produce. Actualmente solo se conoce una cepa de lipolytica que permita la cristalización directa de ácido cítrico a partir del caldo de concentrado. Se han ensayado la mayoría de las cepas públicamente disponibles, y se ha hallado que no poseen es-

384356



ta propiedad sin igual. La cepa utilizable ha sido depositada en una colección pública reconocida, la Colección americana de cultivos tipo, y se le ha dado el número - ATCC 20.228.

5 Para aprovechar al máximo las ventajas de esta propiedad del cultivo, la fermentación se efectúa a pH bajo, es decir, sin neutralizar el ácido cítrico producido. Es sorprendente, pero cierto, que la cepa nº 20.228 permanece viable, y fuerte productora de ácido cítrico, incluso a pH de aproximadamente 2-3, o incluso menos. Inicialmente es necesario mantener un pH de aproximadamente 4-7 (usualmente de aproximadamente 5-6) para permitir que tenga lugar el crecimiento de células. Sin embargo, tras haberse desarrollado la masa de células, se deja que el pH disminuye de forma natural, a medida que se produce más ácido cítrico, sin añadir más tampón sin otra base que reaccione con el producto. La fermentación se completa usualmente en de 5 a 7 días. Antes de que hayan pasado los 2 días primeros, el pH está ya por debajo de 4, y continúa disminuyendo hasta un intervalo final de aproximadamente 2-3, a medida que se produce más ácido. Como se ha indicado antes, ello significa que la mayoría del producto está ya en forma de ácido libre, no de citrato, y está lista para ser recuperada.

15
20
25 El mantenimiento del pH inicial se podría efectuar añadiendo un cáustico u otra base. Sin embargo, lo más conveniente es añadir simplemente una cantidad limitada de un carbonato, al principio, de manera que su capacidad para tamponizar haya sido consumida, por el ácido cítrico producido, aproximadamente en el momento en que

384356



la masa de células esté desarrollada de forma adecuada para ser usada como inoculación de la fermentación. Se prefiere añadir al medio como tampón carbonato cálcico. Este reacciona con el ácido cítrico que se acumula durante la etapa de crecimiento, evitando así que el pH del medio se haga demasiado ácido. Es bien sabido que durante las etapas iniciales de propagación de la levadura, si el pH del medio se reduce hasta menos que aproximadamente 4,0 el crecimiento de las células de levadura cesará o se reducirá notablemente. También se cree que algo del dióxido de carbono producido en la reacción del ácido cítrico con carbonato cálcico puede ser metabolizado por las células de levadura, promoviendo así su crecimiento en el medio. Además del carbonato cálcico se puede usar también carbonato de bario, óxido cálcico, óxido bórico y otros tampones bien conocidos.

Aunque generalmente se prefiere usar n-hexadecano como hidrocarburo principal o único en la fermentación, pueden usarse otros n-alcanos y n-1-alquenos. También se pueden usar mezclas de hidrocarburos, incluyendo materiales crudos y semirrefinados, pero al menos una porción debe consistir en un hidrocarburo que tenga una longitud de cadena de aproximadamente de 9 a 19 átomos de carbono.

Generalmente, el hidrocarburo se emplea a concentración de aproximadamente 5-9% en peso, basado en el medio, aunque este aspecto no es crítico, y puede usarse una concentración de hidrocarburo menor o mayor. Entre las fuentes de nitrógeno inorgánicas disponibles se prefieren las sales de nitrógeno tales como sulfato amónico,

384356



5 cloruro amónico y nitratoamónico. De entre las numero-
sas fuentes de nitrógeno orgánicas se prefieren el sal-
vado de trigo, harina de soja, urea, aminoácidos y pep-
tonas. Se ha hallado que la NZ Amine YTT, de la que se
10 dispone en el comercio, vendida por Sheffield Chemical
co., Norwich, N.Y., es una fuente de peptona adecuada,
Desde luego, es bien sabido que también son beneficiosos
para el crecimiento de las levaduras las vitaminas tales
como biotina y los cationes y aniones minerales tales -
15 como sodio, potasio, cobalto, fosfato y sulfato. La ma-
yoría de estas trazas de vitaminas y minerales están dis-
ponibles en el líquido de maceración de grano, y en al-
gunas de las fuentes de nitrógeno, por ejemplo la harina
de soja, y por tanto no es usualmente necesario añadir-
las individualmente al medio de fermentación.

 Como se ha indicado antes, el medio de fermen-
tación contiene fuentes usuales de nitrógeno asimilable,
minerales, y otros factores de crecimiento que están con-
tenidos en la fase acuosa. Un medio que ha resultado ser
20 especialmente adecuado es uno que contenga una sal amó-
nica, líquido de maceración de grano, e hidrocarburo. El
líquido de maceración de grano puede ser reemplazo, op-
cionalmente, por dihidrogenofosfato potásico. El nivel
de hidrocarburo debe ser al menos aproximadamente 3% en
25 peso del medio, para producir concentraciones y rendi-
mientos significativos de ácido cítrico, y el intervalo
de aproximadamente 5 a 20% en peso es el mejor general-
mente para obtener los resultados óptimos. La misión -
del agua consiste esencialmente en proporcionar un me-
30 dio para las fuentes de nitrógeno, minerales y factores

384356



de crecimiento, aunque desde luego se necesita algo de agua para mantener de forma apropiada las células de levadura. Así, aunque se pueden emplear concentraciones muy altas de hidrocarburos, por ejemplo de 50% o incluso más, desde el punto de vista práctico se consigue la producción óptima de ácido cítrico cuando el nivel de hidrocarburo es mantenido dentro de los intervalos preferidos.

Aunque es satisfactoria cualquier forma de incubación aerobia, se prefiere la aireación controlada, tal como, por ejemplo, la agitación del medio al aire, o la pulverización de aire a través del medio. Dado que el hidrocarburo es immiscible en la fase acuosa, es deseable mantenerle en forma finamente dispersada, en el medio acuoso, durante la fermentación, asegurando así que estará en contacto con la fase acuosa una superficie grande del hidrocarburo. De esta manera habrá un contacto óptimo entre las células de levadura, la fase acuosa y el hidrocarburo. Un medio preferido para alcanzar estos objetivos es la fermentación sumergida, agitando rápidamente la mezcla mientras se hace pasar simultáneamente aire a través de ella, por ejemplo por pulverización. Para asegurar una buena dispersión del hidrocarburo, se puede incluir también un tensoactivo en el medio.

Se pueden emplear las temperaturas usuales, conocidas en la técnica, para el crecimiento de levaduras, por ejemplo aproximadamente de 20 a 37°C, prefiriéndose un intervalo de aproximadamente 25 a 29°C, con tiempos de fermentación de 4 a 7 días. El periodo de crecimiento inicial de las células de levadura, para preparar la inoculación, es preferiblemente de 24 a 48 horas. Estas con

384356



20

diciones generales de crecimiento y fermentación son bien conocidas en la técnica, igual que lo son los métodos para recuperar el ácido cítrico producido, por ejemplo la centrifugación, filtración, concentración bajo vacío, - etc.

5

Una característica crítica de esta invención es que el ácido cítrico libre es aislado directamente del caldo de fermentación filtrado, con rendimiento y pureza excelentes. Debido a la naturaleza sin igual de la cepa Candida ATCC nº 20.228, se mantienen un buen metabolismo de la levadura y una gran producción de ácido cítrico a medida que el pH del caldo de fermentación disminuye rápidamente hasta aproximadamente de 2 a 3, o incluso menos tras haberse iniciado la fermentación. A diferencia de los medios acuosos que contienen carbohidrato usados en la producción de ácido cítrico con Aspergillus niger, o en las técnicas con Candida de la técnica anterior, el caldo de fermentación hidrocarbonado filtrado, chispeante de la presente invención, tiene pocas impurezas y es casi incoloro. El ácido cítrico cristalino puro es obtenido directamente en rendimientos de recuperación de 50 a 75%, o más, por simple evaporación, o en procedimientos de concentración bajo vacío. Este nuevo procedimiento de fermentación evita la necesidad de ajustar continuamente el pH, y, por recuperación directa de ácido cítrico de gran pureza, con buen rendimiento, se consiguen ahorros sustanciales eliminando las etapas de recuperación intermedias de formación de sal y subsiguiente conversión al ácido libre, por uso de ácidos minerales, intercambio de iones o electrodiálisis.

10

15

20

25

30

384356



Se ha de entender que el procedimiento de la presente invención abarca también el uso de mutantes o variantes de la cepa C. lipolytica, producidos por diversos medios químicos o físicos, con tal de que conserven, desde luego, la resistencia a ácidos y capacidad de acumulación de ácido cítrico que tiene la ATCC nº 20.228. Tales mutantes son producidos por radiación con rayos X y ultravioleta, tratamiento con mostazas nitrogenadas o peróxidos orgánicos, y otras técnicas similares bien conocidas por los expertos en la técnica. Además, el uso de subcultivos, mutantes naturales, variantes y similares está abarcado en la puesta en práctica del procedimiento de la presente invención. Se presentan los ejemplos siguientes para ilustrar la presente invención, pero no para limitar su ámbito.

Ejemplo I

Una porción de agar de patata dextrosa, que contenía células de Candida lipolytica ATCC 20.228, es transferida a un medio líquido preparado con 3 g de NZ Amine YTT, fuente comercial de nitrógeno asimilable que comprende peptonas procedentes de degradación de caseína, y vendida por The Sheffield Co., Norwich, N.Y.; 34,7 g de n-parafinas $C_{14}-C_{16}$, vendida por The Continental Oil Co., N.Y., N.Y.; y 600 ml de agua del grifo. Primero es esteriliza el medio durante 30 min a 120°C. Luego se incuban aerobiamente las células de Candida en el medio, con agitación, a temperatura ambiente (27°C) durante 48 horas, usando un agitador rotatorio. Al final de ese tiempo, una inoculación del 5% del crecimiento de Candida es transferida a un medio nutritivo esterilizado acuoso.

384356



20 NOV 1968

so que contiene, por litro de medio, 5,0 g de líquido de maceración de grano, 4,0 g de sulfato amónico, 15,0 g de carbonato cálcico y 155 g de n-parafinas $C_{14}-C_{16}$. El medio inoculado es agitado durante 48 horas, y aireado con 30 litros normales de aire por hora por litro, a una temperatura de 26°C. Durante este periodo de 48 horas de propagación, el pH es mantenido a aproximadamente de 5 a 6, para permitir un desarrollo óptimo de las células añadiendo más tampón de carbonato cálcico, en pequeños incrementos, según fuera necesario. Esta cantidad limitada de tampón es consumida a medida que la masa de células produce ácido cítrico, de manera que, hacia el final de las 48 horas, el pH ya es ligeramente menor que 4, y esta disminuyendo bastante rápidamente.

Una porción del 5% de esta inoculación, que crece activamente, es añadida luego a un fermentador grande, que contiene los ingredientes siguiente, por litro de medio esterilizado: 4,7 g de urea, 0,001 g de clorhidrato de tiamina, 180 g de n-parafinas $C_{14}-C_{16}$, y 0,375 g de KH_2PO_4 (esterilizado separadamente). El medio de fermentación es agitado durante 44 horas (6 días) a 1725 rpm, con 30 litros normales de aire por hora por litro, y a una temperatura de 26°C. El rendimiento de fermentación del ácido cítrico monohidratado es 225 g/litro. Ya pronto, en esta experiencia de 6 días, el pH se nivela por sí mismo a aproximadamente 2-3, y no se necesitan ajustes. Tras los 6 días, los sólidos y el micelio son separados por filtración, y el caldo de fermentación filtrado es concentrado bajo vacío a 45°C, hasta 40°Baumé. Los cristales de ácido cítrico que se forman tras reposo

384356



20

5 durante la noche son separados por centrifugación. La segunda y tercera recolecciones de ácido cítrico son recuperadas concentrando las aguas madres bajo vacío, hasta 45°Baumé, a 75°C. La recuperación total de ácido cítrico libre es aproximadamente 50% en peso. Por último, el producto residual de las aguas madres finales es recuperado en forma de sal monosódica, neutralizando con hidróxido sódico y concentrando bajo vacío.

Ejemplo II

10 Se repite el procedimiento del Ejemplo I, reemplazando las n-parafinas C₁₄-C₁₆ del medio final del fermentador por n-hexadecano, con resultados comparables. - Tras recuperar el ácido cítrico libre, las aguas madres residuales son neutralizadas de nuevo con hidróxido sódico, y concentradas bajo vacío, y el ácido cítrico restante es recuperado como sal trisódica.

Ejemplo III

20 Se repite el procedimiento del Ejemplo I, con la excepción de que, en la etapa final en el fermentador, las n-parafinas C₁₄-C₁₆ son reemplazadas por una mezcla de 28,9 g de cada uno de los siguientes hidrocarburos: n-decano, n-nonano, n-undecano, n-tridecano, n-pentadecano, n-hexadecano y n-octadecano. Se obtienen resultados comparables, es decir, una recuperación de ácido cítrico libre mejor del 50%. Las aguas madres finales son ajustadas luego a pH de 8 a 10, y se añade el cloruro cálcico suficiente para convertir todo el ácido cítrico residual en citrato cálcico, que es recuperado por centrifugación.

Ejemplo IV

30 Se prepara un medio nutritivo líquido con 150 g

384 356



de Cerelose, producto de maceración de grano vendido por Corn Products Sales Co., N.Y., N.Y.; 15 g de peptona; 5 g de extracto de levadura; 4 g de cloruro sódico; y 1 litro de agua. Tras esterilización, este medio es inoculado con células de Candida lipolytica ATCC 20.228, y es incubado con agitación a temperatura ambiente, bajo condiciones aerobias de inmersión, durante 24 horas. Al final de este tiempo el pH es aproximadamente 6,5. El contenido de células de Candida en el medio (centrifugación) se determina centrifugando una muestra de 15 ml del medio a 2000 g durante 15 min. Cuando se alcanza una densidad de 0,5 ml de células por 15 ml de medio de crecimiento, la suspensión de células es usada para inocular el medio de fermentación apropiado.

Se añaden varios mililitros de esta inoculación, de 24 horas de edad, a un medio nutritivo esterilizado acuoso que contiene, por litro, los siguientes ingredientes: 4,7 g de urea, 0,01 g de clorhidrato de tiamina, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 180 g de n-parafinas $C_{14}C_{16}$ (Continental Oil company) y 0,75 g de KH_2PO_4 (esterilizado separadamente).

El medio de fermentación es agitado durante 5 días a 1725 rpm, con aireación de 30 litros normales de aire por hora por litro, y a una temperatura de 25°C. El pH disminuye, dentro de los 2 días primeros, desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 2,5, y se estabiliza por sí mismo a 2,0-2,5. Los sólidos y micelios son separados por filtración tras el periodo de 5 días. El caldo filtrado es concentrado bajo vacío a 45°C, hasta 40°Baumé. Tras sembrar con cristales de ácido cítrico y dejar reposar durante la noche, el ácido cítrico libre se separa por

384356



5 cristalización, y los cristales son separados por centri-
fugación. Se recuperan una segunda y tercera recoleccio-
nes de ácido cítrico concentra_{do} más las aguas madres,
hasta 45°Baumé, a 75°C. Las aguas residuales son neutra-
lizadas parcialmente, por último, con hidróxido sódico,
y son concentradas bajo vacío, y el ácido cítrico restan-
te es recuperado como sal monosódica.

Ejemplo V

10 Se repite el método del Ejemplo IV, reemplazan-
do las n-parafinas C₁₄C₁₆ por una mezcla hidrocarbonada,
NP-200, compuesta por n-parafinas que tienen de 9 a 19
átomos de carbono, y vendida por Unión Carbide Company,
N.Y., N.Y. Tras 138 horas de fermentación, se recupera
15 por el mismo método el ácido cítrico libre, con rendi-
miento mejor que el 50%. Se añade en este momento hidró-
xido potásico a las aguas madres residuales, y la solu-
ción es concentrada bajo vacío para recuperar el ácido
cítrico restante en forma de sal monopotásica.

20 Esta solicitud, que corresponde a la presenta-
da en Estados Unidos de América, el 23 de Octubre de 1969
bajo el N° 868.897, se acoge a los beneficios del artícu-
lo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25
- REIVINDICACIONES -

30 Los puntos de invención propia y nueva, que se

384356

20



presentan para que sean objeto de esta solicitud, de Patente de Invención en España por VEINTE años son los siguientes:

5 1.- Un procedimiento de producir ácido cítrico por fermentación de una levadura que pertenece al género Cándida, capaz de acumular ácido cítrico y de asimilar hidrocarburos, en un medio nutriente acuoso que contiene al menos una parafina normal que tiene de aproximadamente 9 a 19 átomos de carbono en calidad de manantial principal de carbono asimilable, caracterizado por el hecho de que, en combinación, se emplea como inóculo de fermentación un cultivo en crecimiento activo de Cándida lipolytica ATCC nº 20.228, y conducir la mayor parte de la fermentación a un pH sustancialmente por debajo de 4.

15 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho pH se encuentra entre aproximadamente 2 y 3.

20 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la fermentación se conduce durante aproximadamente 4 a 7 días.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el producto de ácido cítrico es recuperado en forma de ácido libre directamente desde el caldo de fermentación filtrado.

25 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicho inóculo es preparado primero haciendo crecer Cándida lipolytica ATCC Nº 20.228 en un medio nutriente acuoso a un pH entre aproximadamente 4 y 8 durante entre aproximadamente 1 y 2 días.

30

384356

20 NOV 1978



6.- Un procedimiento de producir ácido cítrico.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y, con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid,

20 NOV. 1978

P.A.

10

Alberio de Cárdenas
Por Poderes *Alberio*

[Handwritten signature]
18-11-70 CS.

384356