



Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar fenilalanina a partir de la reacción catalizada con fenilalanina/amoniaco/liasa (PAL), de ácido t-cinámico y amoniaco. Concretamente, esta invención se relaciona con dicho procedimiento de obtención de fenilalanina en donde se mantiene un elevado grado de la actividad del catalizador PAL pudiéndose volver a utilizar el catalizador.

La L-fenilalanina es un aminoácido esencial importante en nutrición y en otras áreas alimentarias y farmacológicas. Ha sido aislada comercialmente de diversas proteínas, incluyendo ovalbúmina y lactalbúmina. Un procedimiento a escala de laboratorio para preparar L-fenilalanina bien conocido en la técnica emplea el enzima fenilalanina-amoniaco-liasa (a continuación, PAL) para catalizar la reacción reversible:

L-fenilalanina  $\rightarrow$  ácido trans-cinámico + amoniaco

El equilibrio de esta reacción es normalmente de 80:20 en favor del ácido t-cinámico y se han probado diversos medios para conseguir un elevado nivel de conversión a L-fenilalanina. Se ha descrito que puede conseguirse un rendimiento próximo al 20 % teórico de L-fenilalanina empleando una gran masa de células conteniendo al catalizador PAL y un exceso de iones amonio. De acuerdo con este proceso conocido, la fuente de iones amonio es preferiblemente cloruro amónico y la reacción se efectúa con preferencia a un pH entre 8,5 y 9,7.

Yamada, S., et al., Appl. Environ. Microbiol. 42:773-78 (1981), han descrito que el rendimiento de conversión podría aumentarse a más del 70 % ajustando el pH de la solución del sustrato a 10 con ácido clorhídrico. Sin embargo, estas

condiciones son tan severas que se reduce grandemente la actividad PAL de las células recuperadas, de forma tan enorme que es impracticable la reutilización del enzima. Además, Yamada et al. establecieron que la inmovilización del enzima celular  
5 no proporciona ventaja alguna con respecto al empleo de células intactas. De este modo, y aunque inicialmente es posible una elevada concentración de L-fenilalanina por este método, la incapacidad de poder utilizar de nuevo el enzima catalítico hace de este método antieconómico para su aplicación a gran  
10 escala.

Por tanto existe todavía la necesidad de conseguir un procedimiento de obtención de L-fenilalanina a partir de ácido t-cinámico y amoníaco, en donde se consiga un elevado rendimiento de L-fenilalanina y el PAL retenga todavía activi-  
15 dad catalítica suficiente para que pueda ser reutilizado.

Por tanto, un objeto de esta invención es proporcionar un método para preparar L-fenilalanina a partir de ácido t-cinámico, con lo que el producto se obtiene a elevadas concentraciones y el enzima PAL se puede utilizar repetidamen-  
20 te.

Igualmente, es un objeto de la invención proporcionar dicho medio para la producción de L-fenilalanina en donde la reacción puede efectuarse bien en un sistema discontinuo de células libres o bien en un sistema celular o enzimático inmo-  
25 bilizado.

Un objeto más de la invención es proporcionar un medio económico para utilizar PAL en la producción de L-fenilalani-

na.

El procedimiento de obtención de L-fenilalanina por reacción de ácido t-cinámico y amoniaco en presencia de fenilalanina-amoniaco-liasa ha sido mejorado de manera que se obtienen altos rendimientos de L-fenilalanina al mismo tiempo que se retiene un elevado grado de la actividad catalítica del PAL. Bajo condiciones de reacción controladas, se aumenta la estabilidad del PAL de manera que puede utilizarse repetidamente para producir L-fenilalanina a elevadas concentraciones.

Para conseguir este resultado deseado, se prepara una solución sustrato por reacción de ácido con una fuente de iones amonio. La fuente de iones amonio puede ser cualquier sal amónica no halogenada. El pH de la solución sustrato se ajusta para que esté dentro de la gama de 8 a 10 aproximadamente empleando un ácido no halogenado, tras lo cual se añade la solución a una fuente PAL tal como un sistema celular intacto libre o bien un sistema celular o enzimático inmovilizado que contenga PAL.

De acuerdo con el proceso de la presente invención, se prepara una solución sustrato con ácido t-cinámico y una fuente de iones amonio. La fuente de iones amonio se puede introducir bien directamente añadiendo una sal amónica de un ácido orgánico o de un ácido mineral al ácido t-cinámico, o bien preparándola en la solución sustrato, tal como mezclando hidróxido amónico y un ácido no halogenado.

Se sabe ya que una fuente preferida de iones amonio es una mezcla de cloruro amónico e hidróxido amónico. El procedimiento de Yamada et al. utiliza también cloruro amónico. En contraste con esta técnica anterior, se ha descubierto que resulta ventajoso que la sal amónica no contenga iones halógeno. La presencia de halógenos en las soluciones sustrato ha resultado inhibir la actividad catalítica de PAL. Por tanto, las sales amónicas preferidas incluyen sulfato amónico, nitrato amónico, citrato amónico, acetato amónico y fosfato amónico. Una sal amónica especialmente preferida es sulfato amónico.

Igualmente es deseable que la sal amónica se añada a la solución sustrato en elevadas concentraciones. La concentración de iones amonio es generalmente de 0,1 a 7,5 M, con preferencia de 1 a 5 M aproximadamente. La elevada concentración de sal amónica aumenta la concentración de amoniaco en el sistema y actúa también como tampón de manera que pueda controlarse más fácilmente el ajuste de pH de la reacción.

Cuando la concentración de iones amonio se encuentra dentro de estas gamas indicadas, la concentración de ácido t-cinámico en solución es generalmente de 30 a 200 mM, con preferencia de 60 a 150 mM aproximadamente.

Yamada et al han descrito que la solución de sustrato deberá ajustarse a un pH de 10. Sin embargo, en el proceso de esta invención el pH se puede ajustar dentro de la gama de 8 a 10 aproximadamente, con preferencia 8,5 a 9,5 aproxima-

damente. La referencia de Yamada describe también el ajuste del pH de la solución sustrato con ácido clorhídrico. Esto puede añadir una cantidad importante de cloruro al sustrato. Sin embargo, en el presente proceso, y como ya se ha indicado, resulta ventajoso ajustar el pH de la solución sustrato con un ácido no halogenado. Ácidos preferidos para ajustar el pH son los ácidos sulfúrico, fosfórico y acético, si bien pueden emplearse otros ácidos no halogenados. Un ácido especialmente preferido es el ácido sulfúrico ya que cuando se añade a una solución sustrato conteniendo hidróxido amónico reaccionará para formar sulfato amónico, el cual es un agente estabilizante de enzimas conocido.

La solución sustrato se añade a un caldo de cultivo conteniendo PAL, las células separadas del mismo e el enzima aislado. El PAL se produce de acuerdo con métodos convencionales descritos por la técnica anterior. La reacción catalizada con PAL procede bajo condiciones productoras de L-fenilalanina, las cuales incluyen preferiblemente una temperatura de reacción de 10 a 45°C aproximadamente. Bajo las condiciones del método de esta invención, se aumenta la estabilidad del PAL de modo que se puede emplear repetidamente para producir L-fenilalanina a elevadas concentraciones.

El presente proceso de obtención de L-fenilalanina se puede utilizar en un sistema discontinuo de células libres o en un sistema celular o enzimático inmovilizado. El sistema

discontinuo puede ser un sistema discontinuo simple o un sistema discontinuo de alimentación continua. Si el PAL se inmoviliza en una columna, la columna puede ser operada como un sistema de único paso, de recicló o de recicló con alimentación continua. Ya se conoce un procedimiento preferido para inmovilizar el enzima PAL o células conteniendo el enzima. Cuando los enzimas PAL o células conteniendo PAL se inmovilizan en una columna, la columna se puede mantener a una temperatura de 10 a 40°C, con preferencia 18 a 30°C aproximadamente, a medida que la solución de sustrato se bombea a través de la columna.

La mezcla de reacción se analiza por métodos convencionales para la producción de L-fenilalanina. Cuando se emplea ácido sulfúrico en lugar de ácido clorhídrico en la solución sustrato, la L-fenilalanina obtenida lo hace en una cantidad de 8 a 10 veces aproximadamente la cantidad obtenida cuando se emplea ácido clorhídrico. Una vez inmovilizado el enzima PAL, el mismo muestra una retención del 50 % aproximadamente de actividad después de 41 días de tiempo de reacción. Esto contrasta con una retención del 20 % después de 24 horas, registrada por Yamada et al.

La L-fenilalanina se puede aislar de la mezcla de reacción por métodos convencionales.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar y además definir el proceso de la invención, pero no han de ser

considerados como limitativos.

EJEMPLO 1

Se prepara un medio de cultivo por el siguiente procedimiento general:

5                   A 1 litro de agua desionizada se añaden 10 gramos de peptona, 10 gramos de extracto de levadura, 0,5 g de D,L-fenilalanina, 5 g de cloruro sódico y 5 g de L-isoleucina. Se ajusta el pH a 6 empleando ácido sulfúrico y se autoclavea a 120°C durante 10 minutos a 1,05 kg/cm<sup>2</sup>. Este es el medio de  
10 inducido convencional para tubos de cultivo y matraces agitados.

EJEMPLO 2

Se sigue el procedimiento general del ejemplo 1 excepto que se añaden al medio 100 mM de yoduro potásico.  
15 Este es un medio de selección de alta inducción.

EJEMPLO 3

Se sigue el procedimiento general del ejemplo 1 excepto que al medio se añaden 200 mM de yoduro potásico. Este es también un medio de selección de alta inducción.

20                   EJEMPLO 4

Se sigue el procedimiento general del ejemplo 1 excepto que se emplean 15 g de extracto de levadura y se separa peptona. Se añaden también 200 mM de yoduro potásico. Esto constituye un medio de producción en matrás agitado de alta  
25 inducción.

EJEMPLO 5

Se prepara un medio de fermentación por el procedimiento general del ejemplo 4, excepto que se omiten cloruro sódico y L-isoleucina. Esto constituye un medio de producción de fermentación de alta inducción.

EJEMPLO 6

Se preparan tres medios de cultivo como en los ejemplos 1, 2 y 3. Se emplea una cepa productora de PAL de Rhodotorula rubra (ATCC =4056) que había sido mantenida sobre agar nutriente inclinado, para inocular 4,5 ml de cada cultivo de tubo de ensayo. Los tubos se colocan entonces en un sacudidor a 30°C y 250 rpm. Se efectúan siete transferencias (0,2 cm<sup>3</sup>) de cada tubo a las 24 ó 48 horas a 4,5 ml de medio de cultivo fresco. Los tubos de cultivo se emplean para inocular 200 ml de medio en matraces sacudidos de 1.000 ml. Un matríz de cada medio se recoge a las 30 horas y a las 54 horas. El rendimiento celular a las 30 horas es en promedio de 14 g de pasta/litro y a las 54 horas es en promedio de 29 g de pasta/litro. La actividad PAL de 100 mM de yoduro potásico es 31 % mayor que la del control. La actividad PAL de 200 mM de yoduro potásico es 39 % mayor que la del control.

EJEMPLO 7

Se sigue el procedimiento general del ejemplo 6 para el crecimiento de células de R. rubra en medio de alta inducción de 200 mM de yoduro potásico, con la excepción de que se efectúan 25 transferencias de selección del cultivo de 200 mM de yo-

duro potásico. Igualmente, 24 horas después de inocular el  
matraz sacudido, se emplea 2,5 % del medio para inocular 15 ma-  
traces nuevos sacudidos (matraz final) y después de 24 horas  
de tiempo de cultivo, se recogen estos matraces. Los rendi-  
5 mientos celulares y la actividad PAL se registran en unos  
cuantos matraces y en el producto de pasta celular recogida  
final. La actividad PAL más elevada a 28,7 gramos de pasta/li-  
tro es de 18,4 U/gramo de pasta (528 U PAL/litro). (Una unidad  
= 1 mol de L-fenilalanina convertida a ácido t-cinámico y amo-  
10 niaco/minuto a 30°C). La actividad se determina mediante una  
modificación del método descrito por Kalghatgi y Subba Rao,  
Biochem. J. 149: 65-72, 1975. El producto celular recogido fi-  
nal tiene 15 unidades PAL/gramo de pasta a 27 gramos de pasta/  
litro como rendimiento celular medio (405 U PAL/litro).

15 EJEMPLO 8

Por el siguiente procedimiento general se prepara una  
solución sustrato de cinamato amónico. Se añade ácido cinámico  
a hidróxido amónico (28 %) hasta disolverse. Se añaden entonces  
agua y ácido para ajustar el volumen y pH del sustrato respec-  
20 tivamente. La concentración de ácido cinámico, concentración de  
amoníaco y pH (cantidad añadida de ácido) variarán en los si-  
guientes ejemplos; por ejemplo, variarán también las cantida-  
des producidas de sal amónica.

25 EJEMPLO 9

Se investiga el efecto de las elevadas concentraciones  
de halógeno sobre PAL empleando varios ácidos para rebajar el pH

de las soluciones sustrato. Se preparan dos sustratos obtenidos por el procedimiento del ejemplo 8 (60 mM CA; 7,5 M NH<sub>3</sub>; pH 10,0). Se ajusta el pH de la solución A empleando ácido clorhídrico y el de la solución B empleando ácido sulfúrico.

5 Se colocan células de R. rubra desarrolladas como en el ejemplo 4 en vasos de precipitados, encamisados con agua, agitados, a 30°C. Se toman muestras a intervalos y se analizan con respecto a L-fenilalanina utilizando cromatografía de capa fina y un análisis enzimático de oxidasa de L-aminoácido. Se encuentra

10 tra que la solución sustrato A (conteniendo cloruro amónico) inhibe al enzima PAL. Las células de la solución sustrato B producen 10 veces más L-fenilalanina (después de 24 horas de tiempo de reacción) que las células de la solución sustrato A.

#### EJEMPLO 10

15 Se sigue el procedimiento general del ejemplo 9 comparando ácido fosfórico con ácido sulfúrico. Las células de R. rubra en el sustrato de pH ajustado con ácido fosfórico producen 90 % de L-fenilalanina más que el sustrato de pH ajustado con ácido sulfúrico.

#### EJEMPLO 11

20 Se sigue el procedimiento general del ejemplo 9 comparando ácido acético con ácido sulfúrico. La cantidad de L-fenilalanina producida en los reactores es la misma.

#### EJEMPLO 12

25 Se preparan células producidas por el procedimiento

general del ejemplo 6. Estas células se emplean para estudiar la capacidad de reutilización (estabilidad) de las células enteras. Se preparan tres sustratos, 60 mM de ácido t-cinámico, amoniaco 7,5 M, pH rebajado a 10, 9 y 8 respectivamente con ácido sulfúrico. Se colocan células (4,5 g de pasta celular) en cada sustrato (45 ml) durante 16 horas a 30°C. La concentración de L-fenilalanina se determina por el análisis de oxidasa de L-aminoácido y por cromatografía de capa fina. Las células se centrifugan, se lavan y se colocan en sustrato nuevo durante 16 horas. Los resultados se ofrecen a continuación:

pH	Exp. I mg/ml L-PHE	Exp. II mg/ml L-PHE	% retención actividad
8	0,22	0,12	55
9	0,95	0,78	82
10	2,02	0,43	21

Los resultados demuestran que incluso aunque el pH 10 tiene dos veces la actividad inicial del pH 9, después de una experimentación las células de pH 9 tienen una actividad 163 % mayor que a pH 10.

### EJEMPLO 13

Se lleva a cabo un estudio de estabilidad de dos semanas como en el ejemplo 12. Sin embargo, los valores pH del reactor fueron de 8,75, 9 y 9,25 y la concentración de amoniaco de 5,5 M. El ensayo de 14 días fue realizado con 6 análisis discontinuos consecutivos de células R. rubra libres.

Los resultados se ofrecen en la siguiente tabla.

		mg de L-fenilalanina producida/hora/gramo de peso en seco de células (% retenido de actividad inicial)		
5	Días al pH indicado	pH de reacción		
		8,75	9,00	9,25
	1	5,9	5,7	5,7
	7	3,6 (61)	3,8 (67)	4,2 (74)
10	14	3,5 (59)	3,5 (61)	4,0 (70)

Los resultados demuestran que las condiciones adecuadas pueden permitir la reutilización de PAL para producir L-fenilalanina y que los niveles de retención de actividad son elevados para las células libres.

EJEMPLO 14

Se inmoviliza la pasta celular del ejemplo 7 por un procedimiento conocido. El sustrato (80 mM; 4,8 M NH<sub>3</sub>; pH 9,23) se bombea a través de una columna rellena con flujo ascendente de células inmovilizadas de R. rubra. Las velocidades de flujo varían en 0,10, 0,25 y 0,50 SV<sup>h-1</sup> a 22°C y en 0,25 y 0,50

SV<sup>h-1</sup> a 28°C. El efluente fue analizado con respecto a L-fenilalanina. Los resultados se ofrecen en la siguiente tabla.

Temp. (°C)	Flujo (SV <sup>h-1</sup> )	L-FE producida	Productividad (g/l/hr)
5	0,10	5,4	0,54
	22	0,25	2,7
		0,50	2,1
10	28	0,25	3,8
		0,50	2,8

A una velocidad de 0,1 SV<sup>h-1</sup> se observa una conversión de sustrato del 40 % produciendo 5,4 g de L-fenilalanina/litro a 22°C.

EJEMPLO 15

15 Se siguen las condiciones de cultivo e inmovilización del ejemplo 14. Se ensaya una columna de células inmovilizadas de R. rubra conteniendo PAL para determinar la vida media de productividad de la columna bajo ciertas condiciones. El sustrato consiste en 75 mM CA; 4,5 M NH<sub>3</sub>; pH 9,25 y se experimenta a 23°C y a una velocidad de flujo de 0,25 SV<sup>h-1</sup> de manera

20

continua. La vida media de productividad resulta ser de 41 días (véase figura 1). Este ensayo demuestra que el PAL inmovilizado se puede utilizar en un largo periodo de tiempo de manera continua para producir L-fenilalanina.

5

#### EJEMPLO 16A

Se prepara un medio de fermentación como en el ejemplo 5 y se utiliza para desarrollar R. rubra en un fermentador de 10 litros. La nucleación del fermentador se prepara como en el ejemplo 3. Las muestras de células se recogen periódicamente del fermentador. Las células son analizadas con respecto a la actividad PAL para determinar el tiempo de recogida óptima. Se encuentra que en el espacio de 6 horas después de presentarse la actividad máxima, permanece menos del 50 % de la actividad máxima. Igualmente, se observa que se había agotado la totalidad de D,L-fenilalanina del medio antes de la actividad máxima.

10

15

#### EJEMPLO 16B

Se repite el ejemplo 16A. Sin embargo, justo después de presentarse la actividad máxima, se alimenta D,L-fenilalanina (5 gramos/10 litros) al fermentador. En la primera hora se presenta una caída en la actividad PAL como en el ejemplo 16A. Sin embargo, la actividad PAL se estabiliza durante las tres siguientes horas antes de recogerse (véase figura 2).

20

#### EJEMPLO 17

Se preparan e inmovilizan células de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 14. Sin embargo, el sustrato usado consiste en 75 mM CA; 4,5 M NH<sub>3</sub>; pH 9,43 a 23°C y una velocidad de flujo de  $SV^{h^{-1}} = 0,50$ . La columna resulta producir

25

1,9 g de L-fenilalanina/litro de soporte de volúmen del lecho/hora. La concentración de L-fenilalanina en el efluente es de 3,8 gramos/litro.

EJEMPLO 18

5 Se preparan e inmovilizan células por el procedimiento general del ejemplo 14. Las células inmovilizadas se introducen en una columna y se reciclan 352 ml de sustrato (75 mM CA; 4,5 M NH<sub>3</sub>; pH 9,4) a través de la columna a una velocidad de 1 SV<sup>h-1</sup>. Se toman muestras del depósito de sustrato a intervalos de tiempo y la concentración de L-fenilalanina se determina por el análisis enzimático de oxidasa de L-aminoácido y por cromatografía de capa fina. Los resultados se ofrecen en la siguiente tabla:

10

15	<u>Tiempo de reciclo (hr.)</u>	<u>L-fenilalanina (gramos/litro)</u>	<u>% conversión</u>
	7	2,8	23
	21,5	4,6	37
	24	5,0	40
	44,5	6,8	55

20 Este ejemplo demuestra que, bajo las condiciones de reacción, se puede preparar L-fenilalanina con elevadas concentraciones y con un elevado grado de conversión utilizando células inmovilizadas conteniendo PAL.

25 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para preparar L-fenilalanina, que comprende las etapas de:

- 5 (a) reaccionar ácido trans-cinámico con una fuente de iones amonio para formar una solución de sustrato;
- (b) ajustar el pH de la solución sustrato y
- (c) poner en contacto la solución sustrato con fenilalanina/ amoniaco/liasa bajo condiciones productoras de L-fenilalanina, para formar L-fenilalanina;
- 10 caracterizado porque comprende:
- (i) emplear como fuente de iones amonio una sal amónica sustancialmente libre de halógeno; y
- (ii) ajustar el pH de la solución sustrato por adición de un ácido sustancialmente libre de halógeno.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el pH de la solución sustrato se ajusta a un valor de 8 a 10 aproximadamente.

20 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el pH de la solución sustrato se ajusta a un valor de 8,5 a 9,5 aproximadamente.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuente de iones amonio se elige entre sulfato amónico, fosfato amónico, nitrato amónico, citrato amónico y acetato amónico.

25 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-

terizado porque la fuente de iones amonio es sulfato amónico.

5 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el pH de la solución sustrato se ajusta con un ácido elegido entre ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido acético.

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el pH de la solución sustrato se ajusta con ácido sulfúrico.

10 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de iones amonio es de 0,1 a 7,5 M aproximadamente.

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la concentración de iones amonio es de 1 a 5 M aproximadamente.

15 10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de ácido t-cinámico en la solución oscila de 30 a 200 mM aproximadamente.

20 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la concentración de ácido p-cinámico en la solución oscila de 60 a 150 mM aproximadamente.

12.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se puede volver a utilizar la fenilalanina/amoniaco/liasa.

25 13.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la L-fenilalanina se produce añadiendo células

intactas, conteniendo fenilalanina/amoniaco/liasa, a la solución sustrato en un reactor discontinuo.

5 14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque el sistema discontinuo es un sistema discontinuo simple.

15.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque el sistema discontinuo es un sistema discontinuo de alimentación continua.

10 16.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fenilalanina/amoniaco/liasa se inmoviliza sobre un soporte reutilizable, o bien en este último.

17.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 16, caracterizado porque la fenilalanina/amoniaco/liasa se inmoviliza en una columna.

15 18.- Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque la columna se mantiene a una temperatura de 10 a 40°C aproximadamente a medida que la solución de sustrato se bombea a través de la columna.

20 19.- Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque la columna se mantiene a una temperatura de 18 a 30°C aproximadamente a medida que la solución de sustrato se bombea a través de la columna.

25 20.- Procedimiento para preparar L-fenilalanina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 19 hojas escritas a máquina  
por una sola cara.

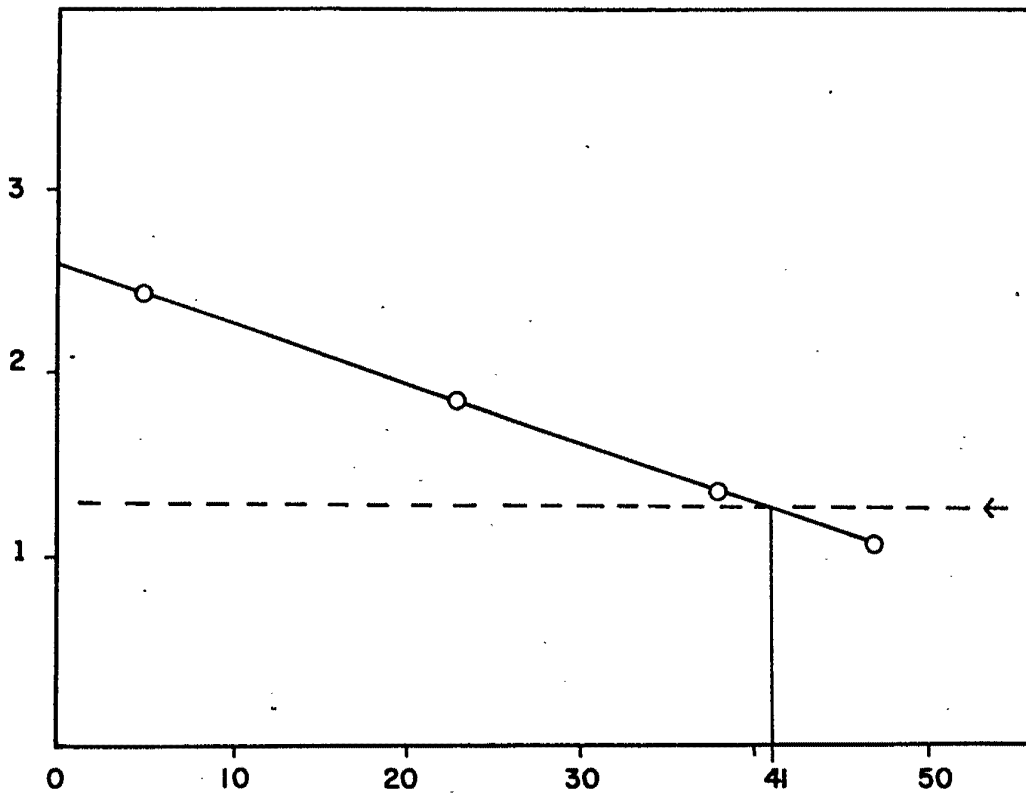
Madrid, 30 SET. 1933

GENEX CORPORATION

J. EL GOMEZ AGEDO Y PARRAS  
P. P. Remate: J. Gomez Agedo



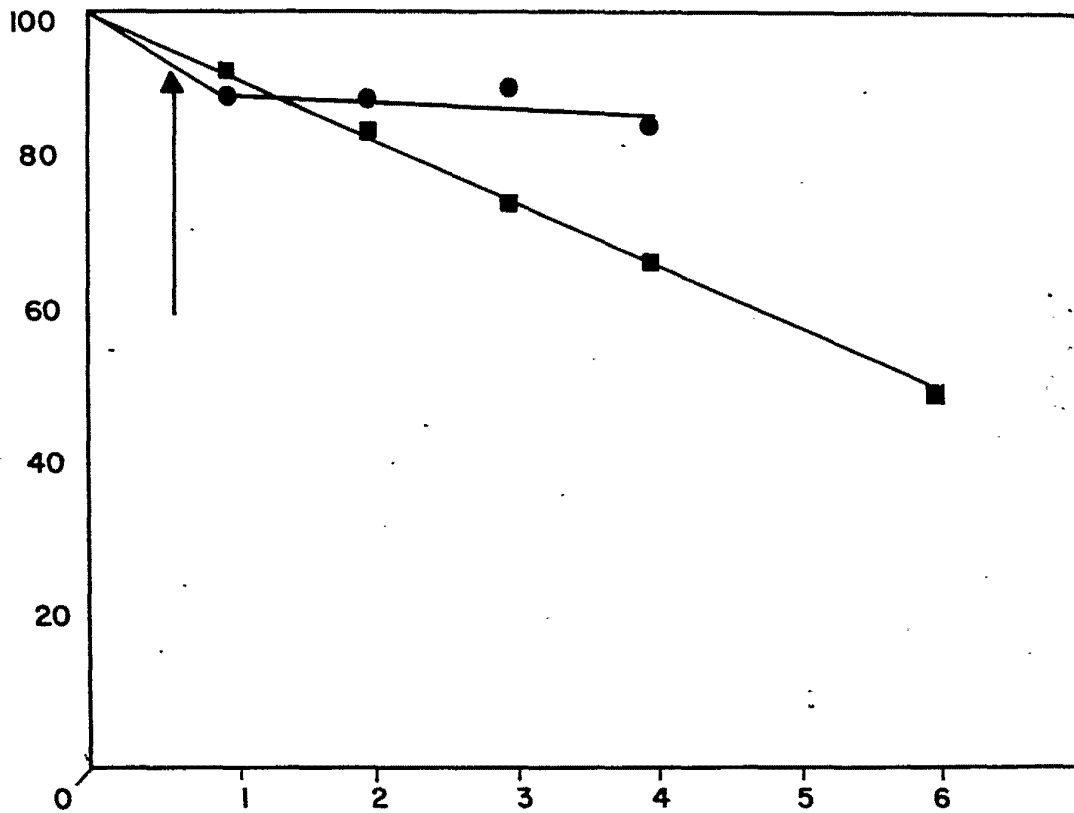
FIG. 1



ESCALA VARIABLE.

~~Madrid, 18 OCT 1988~~  
J. F. BARRERA ANDRÉS Y FERRAZ  
P. A. FERRAZ J. SANCHEZ DIAZ

FIG.2



Madrid 18 OCT. 1993  
J. V. BOMBE ASESOR Y COMERCIAL  
P. P. HERRERA J. SANCHEZ DIAZ

ESCALA VARIABLE.