

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19	ES	11	44 9555	10	A2
		21			
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			3-7-1976		

CERTIFICADO DE ADICION

P.- 63.432
01516 ES 75-1
DE/2731/6

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
593.983	8-7-75	E.U.A.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	61 PATENTE A LA CUAL SE ADICIONA
	C12 F; C12 D	429.773
64 TITULO DE LA INVENCIÓN		
MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 429.773, presentada el 5 de Septiembre de 1974, por: "Procedimiento continuo o discontinuo para el tratamiento de residuos de destilación de vinos blancos".		
71 SOLICITANTE (S)		
E. REMY-MARTIN & CO.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
B.P. 37, 16012 Cognac, Francia		
72 INVENTOR (ES)		
Jean Magny, Charles Montant, Pierre Raynaud, Charles Gontier y Jacques Dardenne		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

1 La presente invención está relacionada con la
Solicitud de Patente española Nº 429.773 del 5 de Septiem-
bre de 1974 en la que se describe un procedimiento para el
tratamiento de residuos de destilación de vinos blancos,
5 que consiste en separar por centrifugación residuos proce-
dentes del alambique, los sedimentos que contienen las le-
vaduras de la vinificación de la pulpa de la uva, sembrar
después de enfriar el medio desprovisto de levadura por me-
dio de un precultivo efectuado sobre el mismo medio, por
10 una suspensión que contiene la cepa seleccionada, escogida
entre los microorganismos del tipo penicillium, dejar desa-
rrollarse el microorganismo y separar y recoger la biomasa
producida del medio de cultivo y tratar el medio líquido
recogido después de la separación de la biomasa con vistas
15 a una purificación más avanzada y a la recuperación de las
moléculas biosintetizadas que contiene.

La Solicitante ha descubierto ya de modo sor-
prendente, que los residuos de destilación de vinos blan-
cos constituyen un medio naturalmente equilibrado para el
20 crecimiento de microorganismos particulares que producen
proteínas.

En este sentido ha efectuado investigaciones
con vistas a seleccionar cepas de microorganismos capaces
de desarrollarse convenientemente sobre los residuos de des-
25 tilación del vino blanco entre los actinomicetos y los hongos.

Por consiguiente ha retenido cepas de Penici-
llium a causa de sus características, basándose en los cri-
terios siguientes:

30 - buena adaptación al medio de cultivo forma-

1 do por los residuos de destilación de vinos blancos,

- desarrollo importante a un pH bajo,
- mejor consumo del medio.

La Solicitante ha seleccionado ya tres cepas
5 de Penicillium. Estas tres cepas de Penicillium, obtenidas
por separación de su suelo según las técnicas comunes, en
la región de Cognac (Francia), han sido aisladas, cultiva-
das sobre medios sintéticos estériles así como sobre el pro-
pio substrato (vinazas) y después han sido comparadas con
10 cepas conocidas que tienen la misma morfología, desde el
punto de vista de las características fisiológicas, y han
sido escogidas en razón a su rendimiento superior.

Las características de estos Penicillium son
las siguientes:

15 Penicillium Commune Thom (ATCC 20464)

Características taxonómicas:

- Clase: Fungi Imperfecti
- Sub-clase: Hifomicetos
- Orden: Mucedíneas
- 20 - Familia: Mucedináceas
- Sub-familia: Aspergíleas
- Género: PENICILLIUM

Características del cultivo:

- Las colonias lanudas sobre medio Czapek
25 gelosado alcanzan al cabo de 10 a 12 días de cultivo, un
diámetro de 3 a 4 cm a la temperatura de 25°C.

- Borde blanco y después gris de 2 cm de
ancho.

30 - Exudados incoloros incluidos en la masa
micelar

- 1
- Fuerte olor a moho
 - Reverso incoloro

Características microscópicas:

- 5
- Conidióforos: Largo = 500 μ , ancho = 5 μ
 - pared finamente ornamentada en cultivos jóvenes, que se hace más rugosa al envejecer.
- 10
- Pinceles: L = 40 a 50 μ Asimétricos
 - Ramificaciones y métulas llevadas a diferentes niveles.
 - Ramificaciones: L = 15 a 20 μ
 - Métulas: L = 15 a 20 μ
a = 3 a 3,5 μ
 - Esterigmas: L = 10 a 12 μ
a = 3 μ
 - Conidios en cadenas, elípticos, lisos (4 x 5 μ).

Penicillium Expansum Link (ATCC 20466)

Características taxonómicas:

- 25
- Clase: Fungi Imperfecti
 - Sub-clase: Hifomicetos
 - Orden: Mucedíneas
 - Familia: Mucedináceas
 - Sub-familia: Aspergíleas
 - Género: PENICILLIUM

30 Características del cultivo:

1 - Sobre medio Czapek gelosado, las colonias alcanzan un diámetro de 4 a 5 cm al cabo de 8 días de cultivo a temperatura ordinaria (25°C).

5 - Surcos radiales de 0,5 a 2 cm de profundidad.

- Borde blanco de 1 a 2 cm, blanco al comienzo del crecimiento, que se hace amarillo-verdoso al tiempo de la esporulación.

10 - Exudados poco numerosos, en forma de gotitas incoloras, aprisionadas en la masa micelar.

- Olor fuerte a moho, característica de la putrefacción de las manzanas.

- Reverso incoloro

Características microscópicas:

15 - Conidióforos: Agrupados en fascículos

- Pared lisa o finamente ornamentada

L = 150 a 400 μ

a = 3 a 3,5 μ

20 - Pinceles: - Asimétricos L = 75 a 100 μ

- Presencia de 1 ó 2 ramificaciones.

- Ramificaciones: L = 15 a 25 μ , a = 2,5 a 3,5 μ

25 - Métulas dispuestas en verticilos.

L = 10 a 15 μ

a = 2,2 a 3 μ

30 - Esterigmas en grupo de 5 a 9

1

L = 8 a 12 μ a = 2 a 3,5 μ

- Conidios en cadenas, elípticos lisos

5

(3 x 3,5 μ)

Penicillium Spinulosum Thom (ATCC 20465)

Características taxonómicas:

- Clase: Fungi Imperfecti
- Sub-clase: Hifomicetos
- Orden: Mucedíneas
- Familia: Mucedináceas
- Sub-familia: Aspergíleas
- Género: PENICILLIUM.

10

Características del cultivo:

15

- Las colonias aterciopeladas sobre medio Czapek gelosado alcanzan al cabo de 12 a 14 días de cultivo un diámetro de 4,5 a 5,5 cm a temperatura ordinaria (25°C).

- Sin exudados
- Olor muy desabrido
- Reverso casi incoloro

20

Características microscópicas:

- Conidióforos: - resultantes directamente del substrato

L = 100 a 200 μ

25

- resultantes de los hifos aéreos

L = 25 a 50 μ

30

- siempre lisos; poseen una vesícula apical de $\varnothing = 5 \mu$ que soporta el

1 pincel.

- 5
- Pinceles: - Tipo Monoverticilado
 - Esterigmas: 6 a 10 dispuestos en verticilos
 - L = 6 a 9 μ
 - a = 2,2 a 3,3 μ
 - Conidios en cadenas equinuladas, elípticos o subglobulosos (3 x 3,5 μ).

10 La Solicitante ha descubierto ahora nuevas cepas de microorganismos capaces de desarrollarse convenientemente sobre los residuos de destilación de vinos blancos, se trata de:

- 15
- *Penicillium Commune* Thom, cepa 148
 - *Penicillium Expansum* Link, cepa 118
 - *Penicillium Frequentans* Westl, cepa 142

Estas tres nuevas cepas descubiertas tienen las características siguientes:

Penicillium Commune Thom (ATCC 20469)

20 Características taxonómicas:

- 25
- Clase: FUNGI IMPERFECTI
 - Sub-clase: Hifomicetos
 - Orden: Mucedíneas
 - Familia: Mucedináceas
 - Sub-familia: Aspergíleas
 - Género: *Penicillium*.

Estructura:

- 30
- Asimétrica,
 - no divaricada,
 - lanada.

1

Especie:

- Común.

Características morfológicas:

5 cm al cabo de 10 a 12 días de cultivo a 25°C sobre un medio de Czapek,

- masa lanuda de micelio (500 a 700 μ)
- borde blanco (2 mm) que se hace gris al término del crecimiento,
- 10 - exudados incoloros, incluidos en la masa micelar,
- reverso incoloro,
- fuerte olor a moho.

Características microscópicas:

- 15 - Conidióforos de pared finamente ornamentada en los cultivos jóvenes y muy ornamentada en los cultivos envejecidos.

L = 400 a 500 μ

a = 5 μ .

20

- Pinceles:

- Asimétricos,
- ramificaciones y métulas llevadas a niveles diferentes,
- métulas

25

L = 15 a 20 μ

a = 3 a 3,5 μ

- Esterigmas

L = 10 a 12 μ

a = 3 a 3,5 μ

30

- conidios en cadenas, lisos, elípticos

(4 a 5 μ).

Penicillium Expansum Link (ATCC 20467)

Características taxonómicas:

- Clase: FUNGI IMPERFECTI
- Sub-clase: Hifomicetos
- Orden: Mucedíneas
- Familia: Mucedináceas
- Sub-familia: Aspergíleas
- Género: Penicillium.

Estructura:

- Asimétrica
- no divaricada
- Fasciculada.

Especie:

- expansum.

Características morfológicas:

Las colonias alcanzan un diámetro de 4 a 5 cm, al cabo de 8 días de cultivo a 25°C sobre un medio de Czapek:

- surcos radiales (0,5 a 2 cm de profundidad)
- borde blanco al comienzo del crecimiento, haciéndose amarillo verdoso en el momento de la esporulación,
- exudados poco numerosos, en forma de gotitas incoloras,
- reverso incoloro,
- olor fuerte a moho, característico de la putrefacción de las manzanas.

Características microscópicas:

1

- conidióforos agrupados en fascículos de paredes lisas o finamente ornamentadas
- L = 150 a 400 μ
- a = 3 a 5 μ .

5

Pinceles:

- Asimétrico con 1 ó 2 ramificaciones
- L = 15 a 25 μ
- a = 2,5 a 3,5 μ

10

- Mótulas situadas en 3 verticilos
- L = 10 a 15 μ
- a = 2,2 a 3 μ

- Esterigmas en grupos de 5 a 9
- L = 8 a 12 μ
- a = 2 a 2,5 μ

15

- Conidios en cadena de 150 a 200 μ de longitud
- lisos
- elípticos (3 a 3,5 μ).

Penicillium Frequentans Westl (ATCC 20468)

20

Características taxonómicas:

- Clase: FUNGI IMPERFECTI
- Sub-clase: Hifomicetos
- Orden: Mucedíneas
- Familia: Mucedináceas
- Sub-familia: Aspergíleas
- Género: Penicillium

25

Estructura:

- Monoverticilida estricta
- sin peritecio
- sin esclerosis

30

1 Especie:

- frequentans.

Características morfológicas:

5 Las colonias alcanzan un diámetro de 5 a 6 cm al cabo de 10 a 12 días de cultivo a 25°C sobre medio de Czapek.

- formación de zonas largas, plegadas,
- exudados poco numerosos, color ámbar,
- olor débil a moho,
- 10 - reverso amarillo-anaranjado a veces de color pardo purpúreo.

Características microscópicas:

- Conidióforos de paredes lisas o finamente ornamentadas, extremidades del conidio alargadas (5 μ),
- 15 L = 100 a 200 μ
- a = 3,0 a 3,5 μ

Pinceles:

- Monoverticilado estricto.
- 20 - Esterigmas: 10 a 12 en verticilos
- L = 8 a 12 μ
- a = 3,0 a 3,5 μ
- Conidios en cadenas (150 μ), globulosos, de paredes lisas de diámetro 3,0 a 3,5 μ .

25

Los números que figuran detrás de "ATCC" indican los números de aceptación de la American Type Culture Collection Rockville-Maryland (Estados Unidos) donde las cepas han sido depositadas.

30

El Solicitante ha buscado todavía optimizar su procedimiento reduciendo el tiempo de la fermentación. A tal

1 fin ha concentrado sus esfuerzos sobre la forma de llevar a cabo la fermentación y en particular sobre la técnica de siembra.

5 El proceso de fermentación se pone en marcha directamente en el fermentador en que la siembra de microorganismos se realiza a partir de precultivos que contienen las esporas ya germinadas.

10 Estando unido el desarrollo de un hongo al número de esporas capaces de germinar después de desarrollar un micelio, el substrato de elección para la elaboración de las esporas por el hongo es un substrato natural favorable a esta elaboración que permite aumentar grandemente la capacidad de siembra.

15 Los precultivos, después de siembra masiva por medio de esporas, en madurez, obtenidas sobre un substrato natural, se efectúan en pequeños volúmenes, por ejemplo del orden de 200 l para una instalación de 10 m³, de medio de igual naturaleza que el efluente a tratar, en un recipiente situado directamente en el circuito de llenado del fermentador.

20 Con la finalidad de permitir una germinación abundante se deja el precultivo en incubación durante 30 a 50 horas y, de preferencia, de 30 a 35 horas.

25 Después de este periodo de tiempo el precultivo que contiene las esporas germinadas se introduce simultáneamente con el efluente a tratar en el fermentador.

30 La siembra del fermentador tiene lugar masivamente, a razón de aproximadamente 3.000.000 de gérmenes/litro como mínimo, para asegurar una cantidad suficiente de microorganismos vivos y permitir por tanto con las condicio

1 nes de los cultivos escogidos, disminuir la duración de la fermentación.

El ejemplo que figura a continuación se proporciona a título indicativo para ilustrar la presente invención sin limitarla no obstante.

Ejemplo 1:

Se siembran aproximadamente 200 l de un filtrado recogido después de centrifugación de residuos de destilación de vino blanco de la región de Cognac, con esporas obtenidas sobre un substrato natural a partir de una cepa de *Penicillium Spinulosum* ATCC 20465. Se deja en incubación durante 44 horas con el fin de obtener una buena germinación.

Paralelamente se introducen en un fermentador 6 m³ del filtrado obtenido después de centrifugar residuos de destilación de vino blanco y enfriar a 20°C. Este filtrado tiene un valor DCO (demanda química de oxígeno) de 44.000 mg O₂/l y un valor del pH de 3,2. Se enriquece el medio por introducción de una solución de fosfato mono-amónico a razón de 2 g/l de medio total. Se introduce simultáneamente el medio que contiene las esporas germinadas en plena actividad metabólica obtenido por el precultivo efectuado anteriormente, para realizar una siembra masiva que sobrepasa grandemente el mínimo de 3.000.000 de gérmenes/litro. Sin modificación ni regulación del pH, se mantiene la agitación y se regula la aireación según la demanda de oxígeno. No se ha utilizado agente anti-espuma alguno.

Se obtienen los resultados siguientes:

1	Duración de la fermentación (Horas)	Biomasa producida seca (g/l)	DCO del filtrado mg O ₂ /l
	0	0,5	44.000
	25	6,6	24.000
5	29	8,9	12.000
	43	13,4	4.000

De los resultados anteriores se desprende que gracias a la técnica de siembra masiva se alcanza rápidamente una cantidad de biomasa interesante. Esta biomasa presenta además un grado de proteínas del 41%.

Efectuando la siembra de modo masivo se puede, por consiguiente, reducir considerablemente la duración de fermentación que era anteriormente de 120 horas, 86 horas y 60 horas.

Manteniendo las mismas condiciones experimentales se ha podido obtener con las diferentes cepas seleccionadas, en un periodo de tiempo de 30 a 40 horas, una cantidad de biomasa comprendida entre 9 y 12 g/l con una proporción de materia nitrogenada total de 30 a 50% partiendo de residuos de destilación de vinos blancos que tienen un pH de 2,8 y 3,4 y operando a estos valores del pH aun cuando éste habría podido ser mantenido en un valor más ácido, por ejemplo acidificando el medio de cultivo por medio de ácido fosfórico. No obstante se ha apreciado en el curso de las fermentaciones un ligero aumento de 0,5 unidades de pH que no afecta de modo negativo al desarrollo del microorganismo.

Desde el punto de vista de la contaminación, se alcanzan igualmente resultados muy interesantes porque

1 se obtiene después de la separación del micelio del medio fermentado, una fase líquida que presenta una DCO del orden de 4.000 mg de O₂/litro o menos.

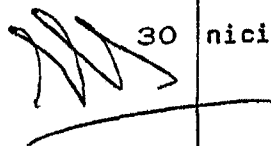
5

= REIVINDICACIONES =

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 que se re-
10 cogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal Nº 429.773, presentada el 5 de septiembre de 1974, por: "Procedimiento continuo o discontinuo para el tratamiento de residuos de destilación de vinos blancos",
15 que consiste en separar por centrifugación, residuos procedentes del alambique, los sedimentos que contienen las levaduras de la vinificación de la pulpa de la uva, enfriar el medio desprovisto de levadura de tal modo que su temperatura sea de 20 a 25°C, sembrarle por medio de un precultivo
20 efectuándole sobre el mismo medio con una suspensión que contiene la cepa seleccionada, escogida entre los microorganismos del tipo penicillium, dejar desarrollarse el microorganismo, separar y recoger la biomasa producida del medio de cultivo y proseguir el tratamiento del líquido re-
25 cogido después de separar la biomasa con vistas a una purificación más avanzada y a la recuperación de las moléculas biosintetizadas que contiene, caracterizadas porque la siembra se efectúa masivamente y porque el microorganismo se escoge entre Penicillium Commune Thom (ATCC 20469), Penicillium Expansum Link (ATCC 20467) y Penicillium Frequen-

30



1 tans Westl (ATCC 20468).

2a.- Mejoras según la reivindicación 1a, caracte-
rizadas porque el precultivo es igualmente sembrado masi-
vamente, por medio de esporas obtenidas sobre un substrato
5 natural.

3a.- Mejoras según cualquiera de las reivindi-
caciones 1a ó 2a, caracterizadas porque el precultivo se
efectúa en pequeños volúmenes de medio de igual naturaleza
que el efluente a tratar, durante 30 a 50 horas y, en par-
10 ticular, 30 a 35 horas.

4a.- Mejoras según cualquiera de las reivindi-
caciones 1a a 3a, caracterizadas por el hecho de que la
siembra por medio del precultivo se efectúa de modo que apo-
te como mínimo 3.000.000 de gérmenes/litro de medio.

5a.- Mejoras según cualquiera de las reivindi-
caciones 1a a 4a, caracterizadas porque se opera al pH de
los residuos de destilación de los vinos blancos, entre 2,8
y 3,4.

6a.- Mejoras según cualquiera de las reivindi-
20 caciones 1a a 4a, caracterizadas porque se acidifica el me-
dio de cultivo mediante ácido fosfórico.

7a.- Mejoras según cualquiera de las reivindi-
caciones 1a a 6a, caracterizadas porque la duración del cul-
tivo es como máximo de 60 horas y, en particular, de 30 a
25 40 horas.

8a.- Mejoras introducidas en el objeto de la
patente principal Nº 429.773 presentada el 5 de Septiembre
de 1974 por: "PROCEDIMIENTO CONTINUO O DISCONTINUO PARA EL
TRATAMIENTO DE RESIDUOS DE DESTILACION DE VINOS BLANCOS".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que an

1 tecede y con los fines que se han especificado.

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

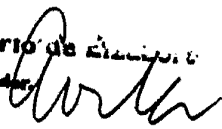
Madrid, 26. JUL. 1976

5

P.A.

Alberio de Caceres

Por Poder



10

15

20

25



FMM.