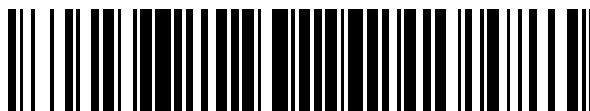


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 233**

51 Int. Cl.:  
**A23L 1/23** (2006.01)  
**C07D 307/32** (2006.01)  
**C12P 17/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05814932 .9**  
96 Fecha de presentación: **02.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1806978**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Preparación estereoselectiva de gamma-lactonas**

30 Prioridad:  
**03.11.2004 FR 0411722**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.04.2012**

73 Titular/es:  
**V. MANE FILS**  
**620, ROUTE DE GRASSE**  
**06620 BAR SUR LOUP, FR**

72 Inventor/es:  
**ZUCCA, Joseph y**  
**MANE, Jean**

74 Agente/Representante:  
**Veiga Serrano, Mikel**

ES 2 379 233 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Preparación estereoselectiva de gamma-lactonas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de síntesis estereoselectiva de gamma-lactonas, en particular de gamma-lactonas naturales.

10 Los productos "naturales" se aceptan cada vez más por el público general, y debido a ello las industrias que ponen en práctica compuestos aromáticos u olorosos dirigen sus esfuerzos a la puesta a punto de sustancias y de preparaciones aromatizantes "naturales". Sólo las sustancias que se han identificado en la naturaleza pueden aspirar a esta denominación; por tanto actualmente se producen o bien a partir de plantas, bien a partir de microorganismos; estos últimos se emplean cada vez más, permitiendo actualmente procedimientos biotecnológicos sintetizar moléculas naturales a costes razonables. Es el caso de las gamma-lactonas.

15 Las gamma-lactonas son moléculas aromáticas que constituyen el aroma y el sabor de numerosos productos naturales. Por ejemplo, la gamma-heptalactona es conocida por su aroma y su sabor a avellana o a caramelo, la gamma-nonolactona tiene un aroma graso, cremoso, o de coco; la gamma-decalactona y la gamma-undecalactona tienen un aroma y un sabor a melocotón o albaricoque.

20 Las gamma-lactonas existen en el estado natural, en dos formas enantioméricas (R) y (S), siendo predominante no obstante el enantiómero (R).

25 **Estado de la técnica**

Las gamma-lactonas pueden producirse por vía sintética, o mediante biosíntesis por medio de microorganismos. Así, el documento EP 371 568 describe un procedimiento de producción de gamma-lactonas por medio de un microorganismo aceptable para preparar productos alimenticios tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces*  
30 *hansenii* o *Candida boidinii*.

El documento US 5.112.803 indica que la gamma-octalactona, y en particular sus isómeros ópticos (R) y (S), son útiles para formar aromas y sabores de mantequilla, y describe un procedimiento para aumentar el aroma o el sabor de materias consumibles mediante adición de cantidades significativas de gamma-octalactonas ópticamente activas y de una mezcla de diferentes compuestos que son subproductos del procedimiento biológico descrito. El procedimiento descrito en el documento US 5.112.803 indica que a partir de ácido caprílico es posible obtener mediante biosíntesis con ayuda de cepas de bacterias del género *Syncephalastratum sp.* o *Mortierella sp.*, los dos isómeros (R) y (S) de la gamma-octalactona; no obstante este procedimiento no es enantioselectivo.

40 El interés de las gamma-lactonas en la industria aromática alimentaria y en la industria de la perfumería es importante, y la obtención de productos que tengan matices organolépticos diferentes representa un auténtico reto industrial.

45 Se sabe que la quiralidad de las moléculas volátiles puede inducir diferencias a nivel de la percepción olfativa, y que los isómeros ópticos de las gamma-lactonas no tienen todos las mismas notas organolépticas: por tanto hay un interés importante en obtener un isómero óptico particular de gamma-lactona, en particular si esta obtención se realiza según un procedimiento al menos tan eficaz como, incluso más eficaz que, en la técnica anterior y a un precio competitivo.

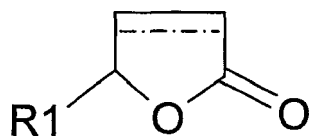
50 Actualmente no existe, según los conocimientos del solicitante, ningún procedimiento estereoselectivo que permita obtener directamente un enantiómero de gamma-lactonas naturales. Los procedimientos conocidos conducen a mezclas de enantiómeros, realizándose la separación del enantiómero deseado generalmente mediante cromatografía en fase gaseosa sobre columna capilar de ciclodextrina sustituida, o tras derivatización.

55 **Objeto de la invención**

Un objeto de la invención es por tanto proponer un procedimiento eficaz, económico y estereoselectivo, de síntesis de gamma-lactonas por vía biológica.

60 La invención se refiere tanto a la síntesis de (R)-gamma-lactonas como de (S)-gamma-lactonas. (R) y (S) designan, en el sentido de la presente invención, la configuración del carbono asimétrico en la posición n.º 4 de la gamma-lactona.

65 Las gamma-lactonas preferidas para sintetizarse según el procedimiento de la invención son las gamma-lactonas C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> según la invención que responden a la fórmula (I):



(I)

5 en la que el ciclo lactónico puede llevar una insaturación entre el carbono n.º 2 y el carbono n.º 3 y en la que R1 es un grupo alquenilo C<sub>1-16</sub>, alquinilo C<sub>1-16</sub> o alquilo C<sub>1-16</sub>, que tiene eventualmente uno o varios carbonos sustituidos más allá de la posición n.º 5. Por alquenilo o alquinilo o alquilo sustituido se entiende un alquenilo o alquinilo o alquilo del cual al menos un carbono lleva al menos un grupo sustituyente. Por grupo sustituyente se entiende concretamente un grupo hidroxilo, un grupo ceto, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo alquenilo.

### 10 Descripción detallada de la invención

15 La invención se refiere por tanto a un procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactona, caracterizado porque se realiza una biosíntesis por vía microbiana de gamma-lactona, en particular de gamma-lactona de fórmula general (I) anterior, en la que el ciclo lactónico puede llevar una insaturación entre el carbono n.º 2 y el carbono n.º 3, y está preferiblemente saturado, y en la que R1 es un alquenilo C<sub>1-16</sub>, alquinilo C<sub>1-16</sub> o alquilo C<sub>1-16</sub>, eventualmente sustituido, realizándose dicha biosíntesis a partir de al menos un sustrato, preferiblemente un ácido graso, con ayuda de un cultivo microbiano de una cepa elegida de las de género *Aspergillus sp.* o *Mortierella sp.*, permitiendo una hidroxilación estereoselectiva en C4 de dicho sustrato.

20 La invención se refiere a la preparación de gamma-lactonas por vía biológica y en particular la biosíntesis estereoselectiva de cada uno de los isómeros ópticos (R) o (S) de gamma-lactonas, a partir de al menos un sustrato, con ayuda de un cultivo microbiano de una cepa apropiada.

Esta preparación comprende las siguientes etapas:

- 25 a) seleccionar una cepa apropiada,
- b) cultivar dicha cepa en un medio de cultivo apropiado, estando dicho cultivo eventualmente precedido por una etapa de cultivar previamente la cepa,
- 30 c) añadir un sustrato susceptible de transformarse en gamma-lactona,
- d) bioconvertir el sustrato en gamma-lactona,
- 35 e) recuperar la gamma-lactona producida.

40 Las cepas microbianas a las que se dirige la etapa a) para la biosíntesis de la gamma-lactona según la invención son las que permiten una hidroxilación específica del sustrato específico en C4. Por tanto, según la invención, se obtienen gamma-lactonas cuyo carbono C4 es de configuración (R) o de configuración (S). Al pertenecer las cepas del género *Aspergillus sp.* *Mortierella sp.* a la clase 1 de microorganismos, su uso no plantea ningún problema particular tanto para la producción industrial de lactonas como para su uso eventual en alimentación. Según un modo de realización particular de la invención, la cepa usada es del género *Aspergillus sp.*, preferiblemente *Aspergillus oryzae* del cual pueden citarse las cepas de las siguientes colecciones:

45 *Aspergillus oryzae* DSMZ 1861, *Aspergillus oryzae* DSMZ 1864, *Aspergillus oryzae* DSMZ 1147, *Aspergillus oryzae* DSMZ 63303, *Aspergillus oryzae* CBS 570.65, *Aspergillus oryzae* CBS 819.72, *Aspergillus oryzae* CBS 110.27, *Aspergillus oryzae* VMF 88093.

Entre ellas, se prefieren *Aspergillus oryzae* DSMZ 1861 y *Aspergillus oryzae* CBS 110.27.

50 Según otro modo de realización particular, la cepa usada es del género *Mortierella sp.* del cual pueden citarse las especies de las siguientes colecciones:

55 *Mortierella isabellina* DSMZ 1414, *Mortierella isabellina* CBS 100559, *Mortierella isabellina* CBS 221.29, *Mortierella isabellina* CBS 194.28, *Mortierella isabellina* CBS 208.32,

*Mortierella isabellina* CBS 224.35, *Mortierella isabellina* CBS 560.63, *Mortierella isabellina* CBS 167.80, *Mortierella isabellina* CBS 493.83, *Mortierella isabellina* CBS 309.93,

60 *Mortierella isabellina* CBS 250.95, *Mortierella isabellina* CBS 109075, *Mortierella ramanniana* CBS 112.08, *Mortierella ramanniana* CBS 219.47, *Mortierella ramanniana* CBS 243.58, *Mortierella ramanniana* CBS 478.63, *Mortierella ramanniana* CBS 852.72, *Mortierella ramanniana* CBS 366.95, *Mortierella ramanniana* CBS 101226.

En efecto, los inventores han observado que, de manera sorprendente e inesperada, el uso de una cepa del género *Aspergillus sp.* conduce a la producción selectiva de (R)-gamma-lactona, y que el uso de una cepa del género *Mortierella sp.* conduce a la producción selectiva de (S)-gamma-lactona.

Sin desear limitarse por ninguna teoría, puede concebirse que las condiciones de cultivo de las cepas puedan tener una importancia en la estereoselectividad notable, así como en el aspecto cuantitativo de la bioconversión.

El cultivo al que se dirige la etapa b) del procedimiento según la invención comprende la realización de un cultivo, preferiblemente semiconcentrado, de cepas, por ejemplo mediante amplificación celular, en un medio de cultivo apropiado. Este cultivo puede estar precedido por un cultivo previo de las cepas en un primer medio de cultivo más adaptado a las primeras etapas de multiplicación de la cepa.

Las condiciones de cultivo puestas en práctica en el procedimiento estereoselectivo de la invención deben ser tales que conduzcan a la producción de un micelio que presente vesículas llenas de inclusiones (de peroxisomas en particular). Según el modo de realización preferido de la invención, el cultivo celular realizado presenta un micelio "de tipo compota" compuesto por filamentos compartimentados sin conidiosporas y que presenta estructuras hinchadas, llenas de esas inclusiones (en particular peroxisomas). Las condiciones de cultivo deben en efecto estar particularmente adaptadas para evitar la esporulación del micelio. Por otro lado, los inventores han podido constatar que el estado fisiológico del micelio, obtenido concretamente debido a la puesta en práctica de las condiciones de cultivo descritas en la presente solicitud, (micelio compartimentado que comprende vesículas e hinchamientos llenos de inclusiones, concretamente de peroxisomas) podría tener una influencia importante sobre el rendimiento de la reacción y permitir obtener rendimientos superiores a los de la técnica anterior. El estado fisiológico del micelio también podría tener una influencia sobre la estereoselectividad de la reacción.

Por tanto, según un modo de realización preferido de la invención, la etapa b) del procedimiento de la invención es una etapa de cultivo de la cepa en un medio de cultivo apropiado que permite la obtención de un micelio compartimentado que comprende vesículas e hinchamientos llenos de inclusiones, concretamente de peroxisomas. El medio de cultivo usado según la invención no contiene peptona. Preferiblemente, el medio de cultivo usado según la invención comprende malta y/o extracto de levadura. Según un modo de realización preferido, el micelio usado para la etapa c) está concentrado. Preferiblemente, la concentración del micelio usado para la etapa c) está comprendida entre 5 y 15 g/l, preferiblemente de 6 a 12 g/l, muy preferiblemente de 7 a 10 g/l.

Se ha observado particularmente que se favorece particularmente la producción de (S)-gamma-lactona por la cepa *Mortierella*, en cuanto a la estereoselectividad y en cuanto al rendimiento, mediante la puesta en práctica de un micelio con vesículas y lleno de inclusiones tal como se describió anteriormente; en efecto, el uso de un micelio de este tipo permitirá la obtención de un producto de reacción que tiene una rotación óptica superior, en valor absoluto, a los de la técnica anterior; por otro lado, el rendimiento obtenido mediante el procedimiento según la invención, y en particular mediante la puesta en práctica de un micelio con vesículas y lleno de inclusiones tal como se describió anteriormente, permite la obtención de rendimientos superiores a los de la técnica anterior.

La etapa c) del procedimiento consiste en añadir el sustrato al cultivo celular. Según la invención, la síntesis por vía biológica de gamma-lactona hace intervenir cualquier sustrato apropiado.

Por sustrato apropiado en el sentido de la presente invención, se entienden los ácidos grasos lineales, insaturados o no, que comprenden al menos 5 carbonos, y preferiblemente de 5 a 20 carbonos, eventualmente ramificados o sustituidos más allá de la posición n.º 5 y los ésteres de dichos ácidos grasos; se prefieren los ésteres metílicos o etílicos.

Entre los sustratos preferidos, pueden mencionarse: el ácido valérico, que es un ácido C<sub>5</sub> que conduce a una gamma-valerolactona; el ácido caproico, que es un ácido C<sub>6</sub> que conduce a una gamma-hexalactona; el ácido enántico que es un ácido C<sub>7</sub> que conduce a una gamma-heptalactona; el ácido caprílico que es un ácido C<sub>8</sub> que conduce a una gamma-octalactona; el ácido pelargónico que es un ácido C<sub>9</sub> que conduce a una gamma-nonolactona; el ácido decanoico que es un ácido C<sub>10</sub> que conduce a una gamma-decalactona; el ácido undecanoico, que es un ácido C<sub>11</sub> que conduce a una gamma-undecalactona; el ácido undecilénico, que es un ácido C<sub>11</sub> que conduce a una gamma-undecenolactona; el ácido láurico que es un ácido C<sub>12</sub> que conduce a una gamma-dodecalactona; el ácido mirístico, que es un ácido C<sub>14</sub> que conduce a una gamma-tetradecalactona; el ácido palmítico, que es un ácido C<sub>16</sub> que conduce a una gamma-hexadecalactona; el ácido palmitoleico, que es un ácido C<sub>16</sub> insaturado que conduce a una gamma-hexadecenolactona, el ácido esteárico, que es un ácido C<sub>18</sub> que conduce a una gamma-octadecalactona; el ácido oleico, que es un ácido C<sub>18</sub> que conduce a una gamma-octadecenolactona; el ácido linoleico, que es un ácido C<sub>18</sub> que conduce a una gamma-octadecadienolactona; el ácido linolénico, que es un ácido C<sub>18</sub> que conduce a una gamma-octadecatrienolactona; el ácido eicosanoico que es un ácido C<sub>20</sub> que conduce a una gamma-eicosanolactona y sus ésteres, preferiblemente sus ésteres etílicos o metílicos.

Los ácidos grasos C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub> y C<sub>19</sub> y sus ésteres etílicos o metílicos, aunque poco frecuentes, también pueden oxidarse y conducir respectivamente a las gamma-lactonas C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub> y C<sub>19</sub>.

Evidentemente, el sustrato puede ser cualquier sustrato apropiado, o una mezcla de diferentes sustratos apropiados, en particular una mezcla de un ácido determinado y de uno o varios de sus ésteres.

5 Según un modo de realización ventajoso de la invención, el sustrato se añade al micelio según un procedimiento discontinuo o semicontinuo (*fed-batch*). Según un modo de realización preferido, el sustrato se añade en mezcla con un adyuvante, por ejemplo un aceite, concretamente cualquier aceite clásico alimentario tal como soja, maíz, girasol, u otro, o triglicéridos de síntesis de ácidos grasos de cadenas cortas tales como migliol, preferiblemente aceite de girasol hidrogenado o rico en ácido oleico, previamente a su puesta en contacto con el micelio. La presencia del adyuvante permite concretamente disminuir en gran medida el efecto corrosivo o tóxico del sustrato. Según un modo de realización de la invención, la síntesis según la invención usando la cepa *Mortierella isabellina* se realiza en un medio exento de aceite mineral. Ventajosamente, el sustrato se añade en concentraciones de 0,3 a 2,5 g/l/h. Ventajosamente, la cantidad de aceite, preferiblemente de aceite vegetal, mezclada con el sustrato es de 100 a 500 g/l, preferiblemente de 150 a 300 g/l.

15 También se añade una fuente de azúcar, preferiblemente de glucosa, al medio, al mismo tiempo que el sustrato de manera que se garantiza la cobertura de las necesidades energéticas de las células. Ventajosamente, la concentración en glucosa añadida es de 0,3 a 0,4 g/l/h.

20 El pH puede regularse, según las necesidades, durante la adición del sustrato y durante cualquier periodo de la bioconversión que va a seguir, por medio de la adición de cualquier base apropiada. Ventajosamente, el pH está comprendido entre 4,5 y 8,5, preferiblemente entre 5,5 y 8 y preferiblemente entre 6 y 7,5.

25 Preferiblemente se mantiene la temperatura a entre 27 y 30°C, durante la bioconversión. La duración de la bioconversión puede ser de 30 a 120 horas, preferiblemente de 48 a 72 horas.

30 La bioconversión del sustrato en gamma-lactona a la que se dirige la etapa d) del procedimiento de la invención es una etapa de lactonización precedida por una reacción de hidroxilación en C4 del sustrato, realizada por la cepa. Para que pueda realizarse esta hidroxilación, se requiere una fuente de oxígeno. Esta fuente de oxígeno es preferiblemente un gas que contiene oxígeno, muy preferiblemente aire u oxígeno. El gas se disuelve en una cantidad relativamente grande en el medio de reacción.

35 Según un modo de realización preferido, y tal como se conoce en el estado de la técnica, se usan agentes antiespumantes, concretamente aceites siliconados o polímeros de polietilenglicol esterificados mediante ácidos grasos, para controlar la espuma susceptible de formarse durante la bioconversión.

40 Una vez realizada la bioconversión, es decir la hidroxilación específica y estereoselectiva en C4, seguida por la lactonización, la etapa e) del procedimiento consiste en recuperar la gamma-lactona mediante extracción, realizándose la extracción de la gamma-lactona mediante cualquier medio apropiado. Ventajosamente, la extracción de la gamma-lactona se realiza mediante hidrodestilación, eventualmente seguida por una esterificación destinada a la eliminación posterior del sustrato que no ha reaccionado.

45 Alternativamente, la extracción de la gamma-lactona se realiza mediante extracción con disolventes, tras acidificación del medio.

50 Según una variante de la invención, no se realiza la etapa e) del procedimiento, y en su lugar se realiza una etapa e') que consiste en continuar el procedimiento al final de la etapa d) mediante una reducción *in situ* de la gamma-lactona obtenida, antes de la extracción. La etapa e' permite obtener una gamma-lactona más saturada (R) o (S), según la estereoquímica de la gamma-lactona obtenida en la etapa d).

55 Según un primer modo de realización, la reducción puede llevarse hasta la obtención de una lactona saturada. Según un segundo modo de realización, la reducción puede detenerse para obtener una gamma-lactona cuya cadena lateral lleva menos insaturaciones que la procedente de la bioconversión de la etapa d). Según este otro modo de realización, el procedimiento según la invención se continúa al final de la etapa d), deteniendo la regulación del pH del fermentador, y añadiendo una levadura seca activa que puede ser una levadura de panadero, una levadura de vinificación o una levadura de cerveza y una fuente de azúcar, concretamente de glucosa, en el reactor. Cuando el pH alcanza el valor de 5,5, se regula a 5,5 con una base apropiada, por ejemplo sosa NaOH. Se deja incubar, preferiblemente durante un tiempo de 12 a 24 horas, después se extrae la gamma-lactona. Según otra variante, la gamma-lactona procedente de la etapa d) puede reducirse mediante un cultivo nuevo de un microorganismo reductor o al menos colocado en condiciones reductoras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia etchellsii* o *Pichia pastoris* o *Hansenula polymorpha* o *Bacillus subtilis* o *Lactobacillus brevis*.

65 La reducción de la etapa e') da como resultado la producción de gamma-lactonas más saturadas que las procedentes de la etapa d). Estas gamma-lactonas más saturadas, obtenidas según este modo de realización particular, presentan en posición 4 un carbono asimétrico de la misma configuración que el de la gamma-lactona menos saturada de la que se deriva, no modificando la reacción de reducción la estereoisomería de la molécula.

Las gamma-lactonas obtenidas según el procedimiento de la invención tienen propiedades olorosas y gustativas tales que pueden usarse en todas las aplicaciones de perfumería y de aromática alimentaria, en particular para la fabricación de perfumes, de materias olorosas, de composiciones cosméticas o alimentarias, o como aditivo alimentario.

En el sentido de la presente invención, el término perfumería designa no solamente la perfumería en el sentido habitual del término, sino también los otros campos en los que el olor de los productos es importante. Puede tratarse de composiciones de perfumería en el sentido habitual del término, tales como bases y concentrados perfumantes, colonias, aguas de tocador, perfumes y productos similares; de composiciones tópicas (en particular cosméticas) tales como cremas para la cara y el cuerpo, polvos de talco, aceites para el pelo, champús, lociones capilares, sales y aceites de baño, geles de ducha y de baño, jabones de tocador, anti-transpirantes y desodorantes corporales, lociones y cremas de afeitar, jabones, cremas, dentífricos, enjuagues bucales, pomadas, y productos similares; y de productos de limpieza, tales como suavizantes, detergentes, lejías, ambientadores y productos similares.

El término oloroso se usa para designar un compuesto que desprende un olor.

Por aromático alimentario, se entiende cualquier uso de los compuestos de la invención para la aromatización de cualquier producto alimenticio líquido o sólido, para seres humanos o animales especialmente bebidas, productos lácteos, helados.

Las gamma-lactonas, (R) o (S) o una mezcla de (R) y (S), pueden usarse en composiciones perfumantes para contribuir a proporcionar notas exóticas, florales o afrutadas. Según las aplicaciones, se usará el enantiómero (S) o el enantiómero (R) o incluso una mezcla de los 2 enantiómeros en proporciones determinadas por el experto en la técnica.

Preferiblemente, las gamma-lactonas obtenidas mediante el procedimiento de la invención según la invención se usan en cantidades comprendidas entre el 0,0025% y el 10 % en peso con respecto al peso total de la composición en la que están presentes. Pueden entrar en la composición de sólidos y de líquidos y concretamente en la composición de geles, cremas, pomadas y/o pulverizaciones.

Las gamma-lactonas obtenidas mediante el procedimiento de la invención según la invención también pueden usarse en una composición en sí misma olorosa, o en una composición en la que el agente oloroso se usa para enmascarar o neutralizar determinados olores.

Otras características y ventajas de la presente invención se desprenderán claramente tras la lectura de los ejemplos facilitados a continuación que ilustran la invención sin por ello limitarla.

Ejemplo 1, etapa a: - Selección de las cepas

En primer lugar se siembran todas las cepas de la colección en medio con gelosa MGY y se incuban durante 72 h a 27°C; a continuación, se siembran esas cepas en recipientes Erlenmeyer de 1 litro que contienen 100 ml de medio con malta 1x y se incuban durante 24 h a 27°C. Entonces se añade el sustrato, ácido undecilénico, en el medio de cultivo (5 g/l en 10 dosis) y se mantiene el cultivo durante otras de 48 h a 120 h a 27°C.

Tras olfacción y análisis de la concentración de gamma-undecenolactona en los medios, se conservan las cepas más interesantes; ha sido el caso para las cepas de *Mortierella isabellina* CBS 100559, *Mortierella isabellina* CBS 221.29, *Aspergillus oryzae* DSMZ 1861 y *Aspergillus oryzae* CBS 110.27 que posteriormente se han usado para los ensayos de optimización en fermentadores.

Ejemplo 1, etapa b: - Preparación de los cultivos celulares

Se siembra la cepa *Mortierella isabellina* CBS 100559 o *Mortierella isabellina* CBS 221.29 o *Aspergillus oryzae* DSMZ 1861 o *Aspergillus oryzae* CBS 110.27 (origen = tubo congelado a - 80°C) en gelosa MGY, y se incuba a 27°C durante 30 horas.

Se siembra el cultivo previo anterior en 5 l de medio con malta 1x en un fermentador de 6 l:

Extracto de malta:	165 g
Extracto de levadura:	25 g
H <sub>2</sub> O c.s.p.:	5 l
pH	6,5

*Mortierella isabellina*

Se incuba a 27°C, 500 rpm, 3,5 l/h de aire, pH libre, durante 30 horas

Aspergillus oryzae

5 Se incuba a 20°C, 500 rpm, 0,05 vvm de aire, pH libre, durante 30 h después a 25°C, 500 rpm, 0,05 vvm de aire, pH libre, durante 24 horas. Debe obtenerse en los dos casos un micelio que contiene muchas vesículas grandes y llenas de inclusiones (entre ellos peroxisomas).

Se preparan a continuación 125 l de medio con malta 1,5x en un fermentador de 300 l:

Extracto de malta:	6,188 kg
Extracto de levadura:	0,938 kg
H <sub>2</sub> O c.s.p.:	125 l

10 Se esteriliza el medio durante 40 minutos a 121°C. El fermentador y sus herramientas son estériles y están a presión. La temperatura es estable y se regula a 27°C. Se elimina la presión y se mantiene un caudal de aire de 3,5 l/h, es decir aproximadamente 0,6 m<sup>3</sup>/h. Se conectan de manera estéril la base (NaOH 10 N), el ácido (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85%) y el antiespumante y el fermentador de 6 l que sirve de inóculo. Se ajusta la velocidad de agitación a 325 rpm, se activa el antiespumante, después se siembra el inóculo (5 l), pH libre. Se mantiene la velocidad de agitación a 325 rpm y se aumenta la aireación a 2,2 m<sup>3</sup>/h (0,3 vvm). Se deja crecer durante 24 horas de manera que se tienen aproximadamente 10 g/l de peso seco de micelio: este micelio debe ser "de tipo compota" y estar constituido por filamentos que comprenden numerosos hinchamientos y vesículas, sin esporas.

20 Ejemplo 2, etapas c y d: Conversión del ácido láurico por las cepas de *Mortierella sp.*

Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el sustrato (ácido láurico) en migliol. Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h durante 55 h. Se regula el pH a 7 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 900 rpm y se airea con un caudal de 1 vvm, es decir 12 m<sup>3</sup>/h. Se continúa la conversión durante 55 horas. Se obtiene un rendimiento de 12 g/l de gamma-dodecalactona (S). A título comparativo, se preparan gamma-dodecalactonas según las enseñanzas de la patente US5457036 (Han), usando las cepas *Mortierella* descritas en la patente US5457036.

30 Cuando se usa el procedimiento de Han, los rendimientos obtenidos son del orden de 4 a 6,5 g/l; en comparación, cuando se usa el procedimiento de la invención que pone en práctica un micelio de tipo compota y lleno de inclusiones, el rendimiento es del orden de 12 a 15 g/l.

Ejemplo 3, etapas c y d: Conversión del ácido caprílico por las cepas de *Mortierella sp.*

35 Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el sustrato con un caudal de 0,75 g/l/h durante 6 h. Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h. Se regula el pH a 6,5 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 600 rpm y se airea con un caudal de 3,5 l/min. Se continúa la conversión durante de 48 a 74 horas. Se obtiene un rendimiento de 15 a 25, en general de aproximadamente 19 g/l de gamma-octalactona (S).

40 A título comparativo, se preparan gamma-octalactonas según las enseñanzas de la patente EP 519481 (Farbood), usando las cepas *Mortierella* descritas en la patente EP 519481; la rotación óptica del producto obtenido según el procedimiento de Farbood es de -28°, lo que significa que ese producto es una mezcla (R) y (S) que tiene una pequeña superioridad en (S); la rotación óptica del producto obtenido según el procedimiento de la invención es de -42°, lo que muestra una selectividad de la reacción para la producción de (S) gamma-lactona.

45 Cuando se usa el procedimiento de Farbood, los rendimientos obtenidos son del orden de 7,5 a 10 g/l; en comparación, cuando se usa el procedimiento de la invención que pone en práctica un micelio de tipo compota y lleno de inclusiones, el rendimiento es del orden de 15 a 25 g/l.

50 Ejemplo 4, etapas c y d: Conversión del ácido caproico por las cepas de *Mortierella sp.*

55 Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el sustrato con un caudal de 0,3 g/l/h durante 6 h. Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h. Se regula el pH a 6,5 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 600 rpm y se airea con un caudal de 3,5 l/min. Se continúa la conversión durante de 48 a 74 horas. Se obtiene un rendimiento de 6 g/l de gamma-hexalactona (S).

60 Ejemplo 5, etapas c y d: Conversión del ácido undecilénico por las cepas de *Mortierella sp.*

Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el ácido undecilénico con un caudal de 0,3 g/l/h durante 6 H después con un caudal de 0,53 g/l/h durante 72 h: es decir un total de 40 g/l. Se distribuye este ácido undecilénico en mezcla con aceite de girasol hidrogenado (1/4 de ácido-3/4 de aceite); por tanto este aceite se

distribuye con caudales de 0,9 g/l/h después de 1,53 g/l/h. Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h durante 72 h. Se regula el pH a 7,5 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 505 rpm y se airea con un caudal de 1 vvm, es decir 12 m<sup>3</sup>/h. Se continúa la conversión durante 72 horas.

5

Se obtiene una producción de 6,5 g/l de gamma-undecenolactona cuya estereoisomería es (S).

Ejemplo 6, etapas c y d: Conversión del ácido undecanoico por las cepas de *Mortierella sp.*

10 Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el ácido undecanoico con un caudal de 0,3 g/l/h durante 6 h después con un caudal de 0,53 g/l/h durante 3,5 h, después 0,75 g/l/h durante 3,5 h, después 1 g/l/h durante 48 h. Se distribuye este ácido undecanoico en mezcla con aceite de girasol hidrogenado (1/4 de ácido-3/4 de aceite). Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h durante 24 h. Se regula el pH a 7,5 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 505 rpm y se airea con un caudal de 1 vvm, es decir 12 m<sup>3</sup>/h. Se continúa la conversión durante 48 horas.

15

Se obtiene una producción de 19 g/l de gamma-undecalactona cuya estereoisomería es (S).

Ejemplo 7, etapas c y d: conversión del ácido undecilénico por las cepas de *Aspergillus sp.*

20

Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el ácido undecilénico con un caudal de 0,3 g/l/h durante 6 h después de 0,53 g/l/h durante 72 h: es decir un total de 40 g/l. Se distribuye este ácido undecilénico en mezcla con aceite de girasol hidrogenado (1/4 de ácido-3/4 de aceite). Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h durante 72 h. Se regula el pH a 6,5 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se airea con un caudal de 0,5 vvm, es decir 6 m<sup>3</sup>/h. Se continúa la conversión durante 80 horas. Se obtiene una producción de 0,5 g/l de gamma-undecenolactona cuya estereoisomería es (R).

25

Ejemplo 8, etapas c y d: conversión del ácido caproico por las cepas de *Aspergillus sp.*

30 Una vez alcanzadas la cantidad y la calidad de micelio, se distribuye el ácido caproico con un caudal de 1,64 g/l/h durante 24 h después de 2 g/l/h durante 72 h: es decir un total de 183 g/l. Se distribuye este ácido caproico en mezcla con aceite de girasol hidrogenado (1/2 de ácido-1/2 de aceite). Se distribuye paralelamente glucosa en continuo con un caudal de 0,36 g/l/h. Se regula el pH a 6,5 durante todo el periodo de la fermentación con NaOH 5 N. Se airea con un caudal de 0,5 vvm, es decir 6 m<sup>3</sup>/h. Al cabo de 72 h a 96 h horas, se obtiene una producción de 15 g/l de gamma-hexalactona cuya estereoisomería es (R).

35

Ejemplo 9, etapa e: extracción - purificación

40 Se acidifica a pH 1,5 con 3 l de ácido fosfórico al 85%. Se calienta a más de 100°C durante 30 minutos para que la lactona esté presente esencialmente en forma ciclada y no en forma abierta de hidroxiácido. Se dosifica la lactona, se añade disolvente de extracción (preferiblemente ciclohexano), se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifuga y se recupera la fase orgánica. Se dosifica la lactona. Se concentra el disolvente y se obtiene así un "producto bruto" aceitoso. Se destila a vacío. Se obtiene la lactona "desresinada" y un aceite agotado. Se purifica a continuación fraccionando la lactona a vacío. Se obtiene un producto puro a >99%, que es o bien gamma-undecenolactona (>99% S) si se usa una cepa de *Mortierella sp.*, o bien gamma-undecenolactona (>99% R) si se ha usado una cepa de *Aspergillus sp.*

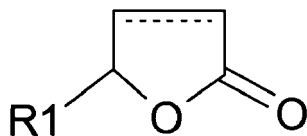
45

50 La gamma-undecenolactona, (R) o (S), o una mezcla de (R) y (S), así como la gamma-undecalactona (R) o (S), o una mezcla de (R) y (S), pueden usarse en composiciones perfumantes para contribuir a proporcionar notas exóticas, florales o afrutadas, lo que ha conducido al solicitante a registrar la marca "Tropicalone<sup>®</sup>" dada a la gamma-undecenolactona. Según las aplicaciones, se usará el enantiómero (S) o el enantiómero (R) o incluso una mezcla de los 2 enantiómeros en proporciones determinadas por el experto en la técnica.



## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, caracterizado porque se realiza una biosíntesis por vía microbiana de gamma-lactonas de fórmula general (I)



(I)

en las que el ciclo lactónico lleva una insaturación entre el carbono n.º 2 y el carbono n.º 3 o está saturado, y en las que R1 es un alquenoilo C<sub>1-16</sub>, alquinoilo C<sub>1-16</sub> o alquilo C<sub>1-16</sub>, eventualmente sustituido, realizándose dicha biosíntesis a partir de un ácido graso, con ayuda de un cultivo microbiano de una cepa del género *Aspergillus sp.* o *Mortierella sp.*, permitiendo una hidroxilación estereoselectiva en C4 de dicho sustrato, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- a) seleccionar una cepa del género *Aspergillus sp.* o *Mortierella sp.*,
  - b) cultivar dicha cepa en un medio de cultivo exento de peptonas, presentando el cultivo celular obtenido un micelio "de tipo compota" compuesto por filamentos compartimentados sin conidiosporas y que presenta estructuras hinchadas, llenas de inclusiones, estando dicho cultivo eventualmente precedido por una etapa de cultivar previamente la cepa,
  - c) añadir un ácido graso susceptible de transformarse en gamma-lactona,
  - d) bioconvertir el ácido graso en gamma-lactona de fórmula (I),
  - e) recuperar la gamma-lactona producida.
2. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas según la reivindicación 1, caracterizado porque el ciclo lactónico de la gamma-lactona está saturado entre el carbono n.º 2 y el carbono n.º 3.
3. Procedimiento de preparación estereoselectiva de (R)-gamma-lactonas según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la cepa microbiana a la que se dirige la etapa a) es la cepa *Aspergillus oryzae*.
4. Procedimiento de preparación estereoselectiva de (S)-gamma-lactonas según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la cepa microbiana a la que se dirige la etapa a) es la cepa *Mortierella isabellina*.
5. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicho ácido graso se elige de los ácidos grasos lineales, insaturados o no, que comprenden al menos 5 carbonos, y preferiblemente de 5 a 20 carbonos, eventualmente sustituidos.
6. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho ácido graso se elige del grupo que comprende ácido valérico, ácido caproico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido undecilénico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosanoico o una mezcla de los mismos.
7. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho ácido graso se añade en la etapa c) en mezcla con al menos un adyuvante de fabricación, preferiblemente elegido de los aceites, los triglicéridos de síntesis de ácidos grasos de cadenas cortas, la glucosa o una mezcla de esos componentes.
8. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según la reivindicación 7, caracterizado porque el adyuvante es un aceite elegido de aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol, y preferiblemente aceite de girasol hidrogenado o rico en ácido oleico.
9. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según la reivindicación 7, caracterizado porque el adyuvante es un triglicérido de síntesis de ácidos grasos de cadenas cortas.

10. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según la reivindicación 9, caracterizado porque el adyuvante es migliol.
- 5 11. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la etapa e) es una extracción mediante hidrodestilación de la gamma-lactona obtenida al final de la etapa d), eventualmente seguida por una esterificación y eliminación del sustrato que no ha reaccionado.
- 10 12. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la etapa e) es una extracción con disolventes de la gamma-lactona obtenida al final de la etapa d).
- 15 13. Procedimiento de preparación estereoselectiva de gamma-lactonas, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la etapa e) se sustituye por una etapa e') de reducción *in situ* de la gamma-lactona obtenida al final de la etapa d).