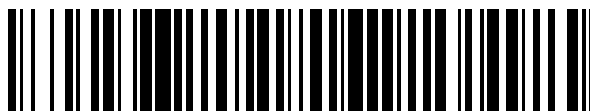


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 178**

51 Int. Cl.:

C12P 7/26	(2006.01)
A61K 8/35	(2006.01)
A61Q 13/00	(2006.01)
A23L 27/24	(2006.01)
A23L 27/29	(2006.01)
C11B 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2009 PCT/FR2009/000646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2009 E 09757695 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2297328**

54 Título: **Procedimiento de producción de 9-decen-2-ona natural por bioconversión de ácido undecilénico con ayuda de un moho**

30 Prioridad:

03.06.2008 FR 0853672

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.08.2017

73 Titular/es:

**V. MANE FILS (100.0%)
620, route de Grasse
06620 Bar sur Loup, FR**

72 Inventor/es:

**MANE, JEAN y
ZUCCA, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 628 178 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

Procedimiento de producción de 9-decen-2-ona natural por bioconversión de ácido undecilénico con ayuda de un moho

5 La presente invención se refiere a la bioconversión, con ayuda de un moho, de ácido undecilénico en 9-decen-2-ona, pudiendo utilizarse esta última en aplicaciones de perfumería y de aromático alimentario.

La empresa solicitante ha probado que la 9-decen-2-ona (o decenona-2 o metil octenil cetona, RN CAS 35194-30-0) es una metil-cetona que presenta propiedades olfativas y gustativas tales que se puede utilizar en cualquier aplicación de la industria aromática (aromas y fragancias). En efecto, presenta una nota verde y grasa, así como notas frutales, en particular de pera, manzana, piña, fruta de la pasión y fruta exótica en general.

10 Esta cetona, al igual que las otras metil-cetonas, se forma por una vía metabólica que toma prestadas las primeras etapas de la β -oxidación después de la oxidación del ácido graso. Esta vía metabólica para la formación de las metil-cetonas es utilizada por los micetos durante la detoxificación de los ácidos grasos.

15 Como puede observarse por la representación de la vía metabólica (Figura 1), el sustrato utilizado durante el transcurso de la bioconversión es ácido undecilénico que se obtiene por craqueo (operación física que transforma el producto grueso en compuestos más finos) del ácido ricinoleico obtenido a partir del aceite de ricino y después se purifica por destilación en seco. Finalmente, como resultado de una etapa de descarboxilación, la metil-cetona obtenida en última instancia posee un carbono menos que el ácido graso de origen.

20 Según el conocimiento de la empresa solicitante, no existe ningún proceso biotecnológico hoy en día que describa y/o permita la síntesis de la 9-decen-2-ona. En efecto, esta molécula no puede obtenerse actualmente más que por síntesis química y así y todo con rendimientos mediocres. Por otro lado, los aromas de síntesis presentan el inconveniente de ser menos apreciados por los consumidores que los aromas naturales. En consecuencia, la presente invención tiene como meta proporcionar un proceso alternativo de obtención de moléculas aromáticas naturales, en particular aquellas obtenidas por medio de la 9-decen-2-ona, por procesos biológicos, en particular de bioconversión, que usan microorganismos tales como mohos.

25 En el sentido de la presente invención, se entiende por "bioconversión" la transformación biológica de un sustrato, preferiblemente procedente de una fuente natural, para obtener sustancias aromatizantes naturales que pueden formularse en aromas o fragancias calificables como naturales.

30 De manera sorprendente e inesperada, la empresa solicitante ha encontrado que era posible satisfacer este objetivo gracias a un proceso de producción de la 9-decen-2-ona, caracterizado por la bioconversión de ácido undecilénico con ayuda de un moho, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- a) el cultivo de dicho moho;
- b) la adición de ácido undecilénico como sustrato de bioconversión, en presencia de aceite;
- c) la bioconversión del sustrato en 9-decen-2-ona,
- d) la extracción y la purificación de la 9-decen-2-ona.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un proceso de producción de 9-decen-2-ona, caracterizado por la bioconversión de ácido undecilénico con ayuda de un moho perteneciente a la familia Mortierellaceae o a la familia Mucoraceae, preferiblemente al género *Mortierella*, al género *Mucor* o al género *Rhizopus*, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:

- a) el cultivo de dicho moho;
- 40 b) la adición del sustrato ácido undecilénico con un caudal de 0,1 a 0,9 g/l/h en presencia de aceite;
- c) la bioconversión del sustrato en 9-decen-2-ona,
- d) la extracción y la purificación de la 9-decen-2-ona.

45 En el sentido de la presente invención, el término "moho" corresponde a hongos microscópicos filamentosos uni- o multicelulares. Entre los mohos, se distinguen los Ficomicetos y los Septomicetos. Dentro de los Ficomicetos, se encuentra el phylum de los Oomicotinados y el phylum de los Zigomicotinados. Dentro de los Septomicetos, se encuentra el phylum de los Ascomicotinados, el phylum de los Basidiomicotinados y el phylum de los Deuteromicotinados.

50 En un modo de realización de la descripción, el moho según la descripción pertenece al phylum de los Deuteromicotinados, Clase Hifomicetos, Orden Tuberculariales, Familia Aspergillaceae. Más preferiblemente, dicho moho pertenece al género *Aspergillus* o *Penicillium*. En un primer modo de realización preferido, dicho moho

pertenece a la especie *Aspergillus oryzae* o a la especie *Aspergillus niger*. En un segundo modo de realización preferido, dicho moho pertenece a la especie *Penicillium roquefortii* o a la especie *Penicillium camembertii*.

5 Entre los mohos *Aspergillus oryzae*, pueden citarse las siguientes cepas de colección: *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.

Entre los mohos *Aspergillus niger*, pueden citarse las siguientes cepas de colección: *Aspergillus niger* DSMZ 823, *Aspergillus niger* DSMZ 2466.

Entre los mohos *Penicillium roquefortii*, pueden citarse las siguientes cepas de colección: *Penicillium roquefortii* CBS 221-30, *Penicillium roquefortii* PRB 18, *Penicillium roquefortii* DSMZ 1079, *Penicillium roquefortii* DSMZ 1080.

10 Entre los mohos *Penicillium camembertii*, puede citarse la cepa *Penicillium camembertii* DSMZ 1233.

El moho según la invención pertenece al phylum de los Zigomicotizados, Clase Zigomicetos, Orden Mucorales, Familia Mortierellaceae o Familia Mucoraceae.

15 Más preferiblemente, dicho moho pertenece al género *Mortierella* o al género *Mucor* o al género *Rhizopus*, e incluso más preferiblemente, dicho moho pertenece a la especie *Mortierella isabellina* o *Mortierella ramanniana* o a la especie *Mucor racemosus* o *Mucor miehei* o a la especie *Rhizopus arrhizus* o *Rhizopus oryzae*.

20 Entre los mohos pertenecientes al género *Mortierella*, pueden citarse las siguientes cepas de colección: *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, *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.

Entre los mohos pertenecientes al género *Mucor*, pueden citarse las siguientes cepas de colección: *Mucor javanicus* DSMZ 1222, *Mucor racemosus* DSMZ 62760, *Mucor rouxii* DSMZ 1191.

25 Entre los mohos pertenecientes al género *Rhizopus*, pueden citarse las siguientes cepas de colección: *Rhizopus arrhizus oryzae* DSMZ 905, *Rhizopus oryzae* DSMZ 2199, *Rhizopus delemar* DSMZ 853, *Rhizopus niveus* DSMZ 2194, *Rhizomucor miehei* DSMZ 1330.

30 El cultivo pretendido en la etapa a) del proceso según la invención, comprende la realización de un cultivo, preferiblemente semi-concentrado, por ejemplo por amplificación celular, en un medio de cultivo apropiado. Este cultivo va precedido de un pre-cultivo de la cepa en un primer medio de cultivo más adaptado a las primeras etapas de multiplicación.

35 En un modo de realización preferido de la invención, el tiempo de cultivo de dicho moho varía entre 20 y 30 horas y depende, de hecho, del estado de crecimiento del micelio, pudiendo observarse este último al microscopio. Se prefiere, en efecto, que la biomasa mínima del moho esté comprendida entre 7 y 15 g/l y, más preferiblemente, entre 9 y 12 g/l, antes de proceder a la bioconversión según la invención.

40 La etapa b) del proceso consiste en añadir el sustrato al cultivo celular. Según la invención, la síntesis por vía biológica de la 9-decen-2-ona hace intervenir al sustrato más apropiado, que es el ácido undecilénico. Según una alternativa (no según la invención), el sustrato es uno de los ésteres del ácido undecilénico, el éster metílico o el éster etílico del ácido undecilénico. Evidentemente, el sustrato puede ser una mezcla de diferentes sustratos apropiados, en particular una mezcla de ácido undecilénico y de uno o varios de sus ésteres.

Según la invención, dicho ácido undecilénico se añade al medio de fermentación con un caudal de 0,1 a 0,9 g/l/h, preferiblemente de 0,2 a 0,7 g/l/h y muy preferentemente de 0,3 a 0,55 g/l/h.

La etapa c) del proceso consiste en la bioconversión de ácido undecilénico en 9-decen-2-ona. La duración de esta fase de bioconversión es generalmente de 36 a 96 horas.

45 Debido a la gran toxicidad del ácido undecilénico para los micetos, puede ser necesario un periodo de adaptación para preparar el moho para convertir el sustrato. Por lo tanto, según un modo de realización preferido, la etapa de bioconversión del proceso según la invención comprende una primera fase de adaptación del moho, en la que dicho ácido undecilénico se añade a un caudal de 0,1 a 0,5 g/l/h, y a continuación una segunda fase en la que ácido undecilénico se añade a un caudal de 0,25 a 0,9 g/l/h. De manera ventajosa, la duración de dicha fase de adaptación es inferior a 20 horas, preferiblemente inferior a 12 horas y más preferentemente inferior a 6 horas.

50 Según un modo de realización preferido, se añade ácido undecilénico en presencia de aceite. Dicho aceite puede seleccionarse del grupo que comprende los aceites clásicos alimentarios tales como los aceites de soja, maíz, girasol, u otro de los triglicéridos que contienen ácidos grasos de cadenas cortas tales como Migliol, o incluso aceites

blancos tales como aceite de parafina o aceites minerales compuestos de hidrocarburos de cadena larga. De manera preferida, dicho aceite es aceite de girasol parcialmente hidrogenado o rico en ácido oleico. De manera preferida, dicho aceite se añade en las siguientes proporciones con respecto al sustrato: Ácido undecilénico/Aceite = 1/4 ácido undecilénico - 3/4 aceite o 1/3 ácido undecilénico - 2/3 aceite o 1/2 ácido undecilénico - 1/2 aceite.

- 5 De manera ventajosa, dicho aceite se añade al medio de fermentación a un caudal de 0,4 a 4,0 g/l/h, preferiblemente de 0,5 a 3 g/l/h y muy preferentemente de 0,75 a 2,5 g/l/h.

10 Como todos los tipos de microorganismos en situación de bioconversión forzada, los micetos necesitan una fuente de carbono que les permita cubrir sus necesidades energéticas, como por ejemplo una fuente de glúcidos, preferiblemente glucosa o maltosa. Se prefiere el aporte de glucosa durante el transcurso de la bioconversión. En consecuencia, según otro modo de realización preferido de la invención, se añade simultáneamente glucosa o maltosa al ácido undecilénico y al aceite. De manera ventajosa, dicha glucosa o dicha maltosa se añade al medio de fermentación a un caudal inferior a 1 g/l/h, preferiblemente inferior a 0,75 g/l/h y muy preferentemente inferior a 0,5 g/l/h.

15 Según otro modo de realización preferido de la invención, la adición de dicho ácido undecilénico, de dicho aceite y opcionalmente de dicha glucosa o maltosa en el medio de fermentación se realiza continuamente durante 5 a 96 horas, preferiblemente durante 24 a 72 horas, y más preferiblemente durante 24 a 48 horas

Según otro modo de realización preferido, la bioconversión según la invención se realiza a una temperatura comprendida entre 25°C y 35°C, preferiblemente entre 27 a 30°C.

20 Según otro modo de realización preferido, el pH del medio de fermentación según la invención es de 5 a 8, preferiblemente de 5,5 a 7,5, y más preferentemente de 6 a 7. En el marco de la invención, el control del pH se realiza con ayuda de sosa (por ejemplo NaOH 5 N estéril, u otra base clásica en fermentación (NH₄OH, KOH, etc.)).

25 Durante el transcurso de la bioconversión, es importante tener una buena agitación así como una buena aireación del medio de fermentación. En el fermentador, se puede crear la agitación gracias a varias palas de agitación. De manera ventajosa y según el tamaño del fermentador, por ejemplo para un fermentador de 6 litros, la agitación adecuada necesaria según la invención es de 200 a 1200 rpm, y preferiblemente de 300 a 900 rpm. La aireación, cuando la hay, se puede conseguir por inyección de aire al nivel de las palas de agitación. De manera ventajosa, la aireación adecuada del medio de fermentación según la invención es inferior o igual a 1 vvm, preferiblemente comprendida entre 0,2 y 0,8 vvm y más preferentemente comprendida entre 0,3 y 0,7 vvm.

30 En otro modo de realización preferido, la bioconversión según la invención se detiene añadiendo un ácido en el medio de cultivo. Dicho ácido puede seleccionarse del grupo que comprende ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido cítrico. Preferiblemente, dicho ácido es ácido fosfórico o ácido cítrico.

35 En la etapa d), la extracción de la 9-decen-2-ona puede realizarse por hidrodestilación o por extracción con ayuda de un disolvente seleccionado del grupo que comprende ciclohexano, metil ciclohexano o acetato de etilo. Preferiblemente, el disolvente utilizado es ciclohexano o un mezcla ciclohexano-acetato de etilo. La purificación de la 9-decen-2-ona puede realizarse entonces por desresinado y después destilación fraccionada. Este proceso de extracción/purificación permite pues obtener una molécula pura en más de 98% con un rendimiento de extracción del orden de 75 a 85%. El rendimiento de bioconversión en 9-decen-2-ona con respecto al sustrato empleado, ácido undecilénico, es de aproximadamente 25 a 35%.

40 La descripción se refiere igualmente a la 9-decen-2-ona obtenida por el proceso tal como se ha descrito anteriormente.

La descripción tiene como objeto la utilización de la 9-decen-2-ona (CAS 35194-30-0) en todas las aplicaciones de perfumería y de aromático alimentario, en particular para la fabricación de perfumes, de materiales olorosos, de composiciones cosméticas o alimentarias, o como aditivo alimentario.

45 En un modo de realización preferido, la descripción tiene como objeto la utilización de la 9-decen-2-ona obtenida por el proceso tal como se ha descrito anteriormente en todas las aplicaciones de perfumería y de aromático alimentario, en particular para la fabricación de perfumes, de materiales olorosos, de composiciones cosméticas o alimentarias, o como aditivo alimentario.

50 En el sentido de la presente descripción, el término perfumería no solo designa la perfumería en el sentido habitual del término, sino igualmente los otros dominios en los que es importante el olor de los productos. Puede tratarse, sin que esto sea limitativo, de composiciones de perfumería en el sentido habitual del término, tales como bases y concentrados perfumantes, aguas de colonia, fragancias, perfumes y productos similares; de composiciones tópicas - en particular cosméticos - tales como cremas para la cara y el cuerpo, polvos de talco, aceites para el cabello, champús, lociones capilares, ungüentos, sales y aceites de baño, geles de ducha y de baño, jabones de tocador, anti-transpirantes y desodorantes corporales, lociones y cremas de afeitado, jabones, cremas, dentífricos, enjuagues bucales, pomadas, y productos similares; y de productos de limpieza, tales como suavizantes, detergentes, 55 detergentes para la lavadora, ambientadores, aerosoles y productos similares.

El término odorante se utiliza para designar un compuesto que exhala un olor.

Por aromático alimentario, se entiende toda utilización de los compuestos de la descripción para la aromatización de cualquier producto alimentario líquido o sólido, humano o animal, en particular bebidas, productos lácteos, helados, caramelos, chicles, etc. pero también para la aromatización de tabaco.

5 La 9-decen-2-ona puede utilizarse asimismo en composiciones perfumantes o en composiciones aromáticas alimentarias para contribuir a dar notas exóticas, florales o afrutadas, en particular de piña, pera, fruta de la pasión, frutas exóticas. Según las aplicaciones, se utilizará esta molécula de 9-decen-2-ona en las proporciones determinadas por el experto en la materia.

10 Preferiblemente, la 9-decen-2-ona se utilizará en cantidades comprendidas entre 0,00025% y 30%, preferiblemente entre 0,0025 y 20%, más preferiblemente entre 0,025 y 10%, en peso con respecto al peso total de la composición en la que está presente. Podrá incluirse en la composición de sólidos o de líquidos y, en particular, en la composición de geles, cremas, pomadas y/o esprays.

La 9-decen-2-ona podrá utilizarse igualmente en una composición odorante por sí misma, o en una composición en la que el agente odorante se utiliza para enmascarar o neutralizar ciertos olores.

15 La Figura 1 describe la bioconversión de ácido undecilénico en 9-decen-2-ona.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Se siembran las cepas *Mortierella isabellina* (A), *Aspergillus oryzae* (B) y *Penicillium roquefortii* (C) [origen = tubo congelado a - 80°C] en agar de malta, y se incuba a 27°C (para A) o 30°C (para B y C) durante 72 horas.

20 Se siembra el precultivo anterior en 3,5 l de medio de malta en un fermentador de 6 l:

Extracto de malta:	50 g/l
Extracto de levadura:	7,5 g/l
pH	6,5

Mortierella isabellina (A)

25 Se incuba durante 24 horas dicha cepa a 27°C, la agitación es de 500 rpm y la aireación es de 0,3 vvm.

Aspergillus oryzae (B)

Se incuba durante 24 horas dicha cepa a 30°C, la agitación es de 600 rpm y la aireación de 0,5 vvm.

Penicillium roquefortii (C)

Se incuba durante 24 horas dicha cepa a 30°C, la agitación es de 600 rpm y la aireación de 0,3 vvm.

30 Le peso seco de micelio al final del cultivo para cada cepa es de aproximadamente 9 a 11 g/l.

El ácido undecilénico se distribuye a continuación con un caudal de 0,15 g/l/h durante 6 h y después a un caudal de 0,33 g/l/h durante 72 h: haciendo un total de 25 g/l. Este ácido undecilénico se distribuye mezclado con el aceite de tornasol hidrogenado (1/3 ácido - 2/3 aceite); este aceite se distribuye a caudales de 0,6 g/l/h y después de 1 g/l/h. Se distribuye paralelamente glucosa continuamente a un caudal de 0,36 g/l/h durante 72 h. Se regula el pH a 6,5 durante toda la duración de la conversión con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 900 rpm y se airea a un caudal de 1 vvm para *Mortierella isabellina* y 0,3 vvm para *Aspergillus oryzae* o *Penicillium roquefortii*. Se continúa la conversión durante 72 horas.

En condiciones no optimizadas, se obtiene una producción comprendida entre 5 y 7 g/l de 9-decen-2-ona.

Ejemplo 2: Conversión con *Aspergillus oryzae* (B)

40 Se siembra *Aspergillus oryzae* [origen = tubo congelado a - 80°C] en agar de malta, y se incuba a 30°C durante 72 horas.

Se siembra el precultivo anterior en 3,5 l de medio de malta (misma concentración que en el ejemplo 1).

Se incuba a 30°C, 600 rpm, 0,5 vvm de aire, pH libre, durante 24 horas. Se obtiene un peso seco de 11 g/l.

45 El ácido undecilénico se distribuye a continuación a un caudal de 0,5 g/l/h durante 6 h y después a un caudal de 0,9 g/l/h durante 48 h: haciendo un total de 46 g/l. Este ácido undecilénico se distribuye mezclado con el aceite de

tornasol hidrogenado (1/4 ácido - 3/4 aceite); este aceite se distribuye a caudales de 1,5 g/l/h y después de 2,7 g/l/h. Se distribuye paralelamente glucosa continuamente a un caudal de 0,36 g/l/h durante 48 h. Se regula el pH a 6 durante toda la duración de la conversión con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 900 rpm y se airea a un caudal de 0,3 vvm. Se continúa la conversión durante 48 horas.

- 5 Se obtiene una producción de 16,5 g/l de 9-decen-2-ona, siendo el rendimiento de bioconversión de 35%.

Ejemplo 3: Conversión con *Mortierella isabellina* (A)

Se siembra *Mortierella isabellina* [origen = tubo congelado a -80°C] en agar de malta, y se incuba a 27°C durante 72 horas.

Se siembra el precultivo anterior en 3,5 l de medio de malta (misma concentración que en el ejemplo 1).

- 10 Se incuba durante 24 horas a 27°C, la agitación es de 600 rpm y la aireación es de 0,5 vvm. Se obtiene un peso seco de 11,3 g/l.

- 15 El ácido undecilénico se distribuye a continuación a un caudal de 0,27 g/l/h durante 6 h y después a un caudal de 0,477 g/l/h durante 48 h: haciendo un total de 46 g/l. Este ácido undecilénico se distribuye mezclado con el aceite de tornasol hidrogenado (1/4 ácido - 3/4 aceite); este aceite se distribuye a caudales de 0,8 g/l/h y después de 1,43 g/l/h. Se distribuye paralelamente glucosa continuamente a un caudal de 0,32 g/l/h durante 48 h. Se regula el pH a 7,5 durante toda la duración de la conversión con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 900 rpm y se airea a un caudal de 1 vvm. Se continúa la conversión durante 48 horas.

Se obtiene una producción de 8 g/l de 9-decen-2-ona, siendo el rendimiento de bioconversión de 33%.

Ejemplo 4: Conversión con *Penicillium roquefortii* (C)

- 20 Se siembra *Penicillium roquefortii* [origen = tubo congelado a -80°C] en agar de malta, y se incuba a 30°C durante 72 horas.

Se siembra el precultivo anterior en 3,5 l de medio de malta (misma concentración que en el ejemplo 1).

Se incuba durante 22 horas a 30°C, la agitación es de 600 rpm y la aireación es de 0,3 vvm. Se obtiene un peso seco de 10 g/l.

- 25 El ácido undecilénico se redistribuye a continuación a un caudal de 0,25 g/l/h durante 6 h y después a un caudal de 0,45 g/l/h durante 48 h y después a un caudal de 0,25 g/l/h durante 24 h: haciendo un total de aproximadamente 30 g/l. Este ácido undecilénico se distribuye mezclado con el aceite de tornasol hidrogenado (1/3 ácido - 2/3 aceite); este aceite se distribuye a caudales de 0,5 g/l/h, después de 0,9 g/l/h y después de 0,5 g/l/h. Se distribuye paralelamente glucosa continuamente a un caudal de 0,36 g/l/h durante 72 h. Se regula el pH a 6,5 durante toda la duración de la conversión con NaOH 5 N. Se aumenta la velocidad a 900 rpm y se airea a un caudal de 0,6 vvm. Se continúa la conversión durante 48 horas.

- 30 Se obtiene una producción de 10,5 g/l de 9-decen-2-ona, siendo el rendimiento de bioconversión de 35%.

Se obtiene una producción de 10,5 g/l de 9-decen-2-ona, siendo el rendimiento de bioconversión de 35%.

Ejemplo 5: extracción - purificación

- 35 Se acidifica a pH de 1,5 a 2 con ácido fosfórico al 85%. Se añade el disolvente de extracción ciclohexano y se agita 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifuga y se recupera la fase orgánica. Se dosifica la metil cetona. Se concentra el disolvente y se obtiene así un "producto en bruto" oleoso. Se destila a vacío. Se obtiene la lactona "desresinada" y un aceite agotado. Se purifica a continuación fraccionando la molécula a vacío. Se obtiene un producto puro en más de 99%

Ejemplo 6: Evaluación de la 9-decen-2-ona en perfumería

- 40 La 9-decen-2-ona pura al 99% se ensaya sobre tiras de papel absorbente y en disolución (al 5% en etanol): la salida es potente, homogénea, presentando notas rosadas, aldehídicas, de acetato de citronelilo, de hoja de cilantro y notas marinas. El fondo presenta notas de pera.

Ejemplo 7: Evaluación en aromático alimentario

- 45 La 9-decen-2-ona pura al 99% se ensaya a 8 ppm en agua mineral: presenta notas frutales: pera, manzana y piña y notas verdes y grasas.

Se consideró interesante para sofisticar las formulaciones de frutas exóticas naturales sobre todo porque no existen muchas moléculas naturales disponibles para alcanzar esta meta. En particular la tonalidad "piña" de la 9-decen-2-ona constituye una alternativa muy atractiva para reemplazar el caproato de alilo, que es la molécula más utilizada actualmente en formulación para obtener una tonalidad de tipo piña.

Ejemplo 8: Utilización en formulación en aromático alimentario y en perfumería.

En un aroma de frutas exóticas, la adición de 9-decen-2-ona permite obtener una tonalidad típicamente de "piña". En la fórmula siguiente, el peso de sustitución por peso del caproato de alilo, habitualmente utilizado en formulación, por la 9-decen-2-ona permite compensar de manera muy ventajosa la tonalidad "piña" conferida por el caproato de alilo.

5	Etil caproato natural	50g,
	Maltol natural	20 g,
	Isoamil acetato natural	35 g,
	Etil isovalerato natural	37 g,
	Mentol codex natural	8 g,
10	Etil metil-2-butirato natural	75 g,
	Etil acetato natural	50g,
	Isoamil butirato natural	12 g,
	Etil butirato natural	35 g,
	Alcanfor refinado	2 g,
15	9-decen-2-ona natural	200 g,
	Alcohol etílico natural	cs 1000 g

El empleo a 50 ppm de esta mezcla en una bebida sin gas con el jugo le confiere notas de "piña" muy características; lo mismo que cuando se utiliza esta mezcla a 200 ppm para tipificar como "piña" un sorbete.

Siempre en la formulación de un aroma alimentario natural, la 9-decen-2-ona permite obtener notas de "pera" interesantes, por ejemplo con la fórmula siguiente:

20	Ácido caproico natural	de 1 a 10 g,
	Alcohol isoamílico natural	de 20 a 60 g,
	Alcohol hexílico natural	de 10 a 50 g,
	Etil caprato natural	de 20 a 80 g,
25	Etil caprilato natural	de 50 a 150 g,
	Isoamil acetato natural	de 50 a 150 g,
	Propil acetato natural	de 50 a 150 g,
	Hexil acetato natural	de 50 a 150 g,
	Butil acetato natural	de 50 a 150 g,
30	Etil acetato natural	de 50 a 150 g,
	9-decen-2-ona natural	de 20 a 50 g,
	Propilenglicol	cs 1000 g

El empleo a 100 ppm de esta mezcla en una bebida débilmente azucarada al 5% y ligeramente acidulada (0,1% de ácido cítrico), le confieren notas de "pera" muy características, incluso aunque la dosis de 9-decen-2-ona sea muy baja (de 2 a 5 ppm).

En formulación en perfumería, la 9-decen-2-ona permite impulsar el lado "floral, verde, violeta" así como la nota "aldehídica afrutada" de un champú, por ejemplo en la fórmula siguiente en la que la 9-decen-2-ona se utiliza al 1%, lo que hace a la nota perfumada del champú más compleja y más redonda:

	Bencil Acetato	70 g,
40	Alcohol Feniletílico	100 g,

ES 2 628 178 T3

	Gamma undecalactona	4 g,	
	Ambrettolide cis-iso	10 g,	
	Aldehído Anísico	25 g,	
	Bacdanol	80 g,	
5	Citronelol	85 g,	
	Etil Vainillina	2 g,	
	Geraniol	40 g,	
	Metil Dihidro Jasmonato	120 g,	
	Oxaciclohexadecen-2-ona	100 g,	
10	Heliotropina	20 g,	
	2-acetil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro-2,3,8,8-tetrametil naftaleno	110 g,	
	Isoeugenol	2 g,	
	4-(1,1-dimetiletil)-metil-bencenopropanal	110 g,	
	Linalool	60 g,	
15	Metil ionona	30 g,	
	Vainillina	10 g,	
	Éster metílico del ácido 2-octinoico	12 g,	
	9-decen-2-ona	10 g,	
	Total	1000 g.	
20	En el caso de una aplicación diferente en perfumería, tal como la de un suavizante, la presencia de 9-decen-2-ona dosificada al 0,5% confiere potencia e impulsa el lado afrutado de "manzana" y "pera" del perfume del suavizante, como se indica en la fórmula siguiente:		
	Bencil Acetato	70 g,	
	Fenoxialil Acetato	30 g,	
25	Alcohol Feniletílico	80 g,	
	Aldehído Hexilcinnámico	40 g,	
	Aldehído C12	2 g,	
	Ambrettolide cis-iso	60 g,	
	Aldehído Anísico	30 g,	
30	2-ciclohexiliden-2-fenilacetoniitrilo	20 g,	
	Bacdanol	50 g,	
	Citronelol	50 g,	
	Cumarina	80 g,	
	Dihidromircenol	100 g,	
35	3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-indenil éster del ácido acético	65 g,	
	2-acetil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro-2,3,8,8-tetrametil naftaleno	106 g,	
	Metil ionantheme	40 g,	

ES 2 628 178 T3

	Esencia de pachulí	30 g,
	Ciclohexil salicilato	100 g,
	Dimetil 3-ciclohexen-1-carboxaldehído	8 g,
	Ambroxan 5% DPG	6 g,
5	Esencia de Galbanum 10% DPG	10 g,
	Indol 10% DPG	8 g,
	9-decen-1-ol 10% DPG	10 g,
	9-decen-2-ona	5 g,
	Total	1000 g.
10	Finalmente, en el caso de una crema, la 9-decen-2-one confiere a la misma notas florales acentuadas, por ejemplo en la siguiente aplicación:	
	Bencil acetato	49 g
	Hexenil cis-3-acetato	2 g,
	Linalil acetato	85 g,
15	Alcohol feniletílico	65 g,
	Gamma undecalactona	6 g,
	Alil amil glicolato	20 g,
	Metil antranilato	5 g,
	Aldehído anísico	10 g,
20	Metil benzoato	8 g,
	Citronelol	45 g,
	Etil vainillina	11 g,
	Geraniol	35 g,
	Metil hidrojasmonato	130 g,
25	Heliotropina	5 g,
	Hexenol cis 3	2 g,
	Ionona alfa	23 g,
	Ionona beta	4 g,
	2-acetil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro-2,3,8,8-tetrametil naftaleno	75 g,
30	4-(1,1-dimetiletil)-metil-bencenopropanal	70 g,
	Linalol	100 g,
	Esencia de pachulí	11 g,
	Gamma nonalactona	27 g,
	Hexenil cis-3-salicilato	35 g,
35	Hexil salicilato	75 g,
	Terpineol	48 g,
	Dimetil 3-ciclohexeno-1-carboxaldehído	4 g,

ES 2 628 178 T3

	Vainillina	2 g,
	Acetil cedreno	12 g,
	Sandalore	12 g,
	Butirato de dimetil bencil carbinol	1 g,
5	Metil 2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato	13 g,
	9-decen-2-ona	10 g.

En presencia de 9-decen-2-ona, la crema presenta más salida, con notas verdes y frescas mucho más intensas.

Ejemplo 9: Ensayos de toxicidad

10 La molécula se ha ensayado en 3 conejos según el protocolo experimental establecido por "la directriz OECD N° 404 con fecha del 24 de abril de 2002" y el ensayo "método B.4 de la Directiva N° 2004/73/EC): Irritación dérmica aguda". Esto demuestra que la 9-decen-2-ona no es irritante y que no se requiere ningún símbolo o frase de aviso de riesgo para su utilización (según las "Directivas EEC 67/548/59 y 99/45).

15 De la misma manera, la molécula se ha ensayado en 3 conejos según el protocolo experimental establecido por "la directriz OECD N° 405 con fecha del 24 de abril de 2002" y el ensayo "método B.5 de la Directiva N° 2004/73/EC): Irritación ocular aguda". Esto demuestra igualmente que la 9-decen-2-ona no es irritante y que no se requiere ningún símbolo o frase de aviso de riesgo para su utilización (según las "Directivas EEC 67/548/59 y 99/45).

Finalmente, el valor obtenido durante el ensayo LD50 (toxicidad oral aguda (cf.: la misma Directiva), de 2500 mg/kg ha permitido clasificar la molécula como no peligrosa.

20 Debido a su inocuidad, parece que esta molécula puede ser utilizable en formulación y, debido a su presencia probada en el mango y la piña, puede ser empleada en aplicaciones en aromático alimentario y en perfumería, pudiendo reivindicar una etiqueta "natural".

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de la 9-decen-2-ona, caracterizado por la bioconversión de ácido undecilénico con la ayuda de un moho perteneciente a la familia Mortierellaceae o a la familia Mucoraceae, comprendiendo dicho proceso las siguientes etapas:
- 5 a) el cultivo de dicho moho;
- b) la adición de sustrato ácido undecilénico con un caudal de 0,1 a 0,9 g/l/h en presencia de aceite;
- c) la bioconversión del sustrato en 9-decen-2-ona,
- d) la extracción y la purificación de la 9-decen-2-ona.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho moho pertenece al género *Mortierella*, al género *Mucor* o al género *Rhizopus*.
3. Proceso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que la etapa de bioconversión comprende una primera fase de adaptación del moho, en la que se añade dicho ácido undecilénico a un caudal de 0,1 a 0,5 g/l/h, a continuación una segunda fase en la que se añade el ácido undecilénico a un caudal de 0,25 a 0,9 g/l/h.
- 15 4. Proceso según la reivindicación 3, caracterizado por que la duración de dicha fase de adaptación es inferior a 20 horas.
5. Proceso según la reivindicación 3, caracterizado por que la duración de dicha fase de adaptación es inferior a 6 o 12 horas.
6. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicho aceite se selecciona del grupo que comprende los aceites alimentarios clásicos o los triglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena corta, o incluso los aceites blancos.
- 20 7. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicho aceite se añade al medio de fermentación a un caudal comprendido entre 0,4 y 4,0 g/l/h.
8. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que se añade simultáneamente glucosa o maltosa al ácido undecilénico y al aceite.
- 25 9. Proceso según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha glucosa o dicha maltosa se añade al medio de fermentación a un caudal inferior a 1 g/l/h.
10. Proceso según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha glucosa o dicha maltosa se añade al medio de fermentación a un caudal inferior a 0,75 g/l/h.
- 30 11. Proceso según la reivindicación 8, caracterizado por que dicha glucosa o dicha maltosa se añade al medio de fermentación a un caudal inferior a 0,5 g/l/h.
12. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que la adición de dicho ácido undecilénico y de dicho aceite en el medio de fermentación se realiza continuamente durante 5 a 96 horas.
13. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado por que la adición de dicho ácido undecilénico, de dicho aceite y de dicha glucosa o maltosa en el medio de fermentación se realiza continuamente durante 5 a 96 horas.
- 35 14. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que la bioconversión se realiza a una temperatura comprendida entre 25°C y 35°C.
15. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que la bioconversión se realiza a una temperatura comprendida entre 27 y 30°C.
- 40 16. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado por que el pH del medio de fermentación está comprendido entre 5 y 8.
17. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado por que la aireación del medio de fermentación es inferior o igual a 1 vvm.
- 45 18. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado por que la bioconversión se detiene añadiendo en el medio de cultivo un ácido seleccionado del grupo que comprende ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido cítrico.

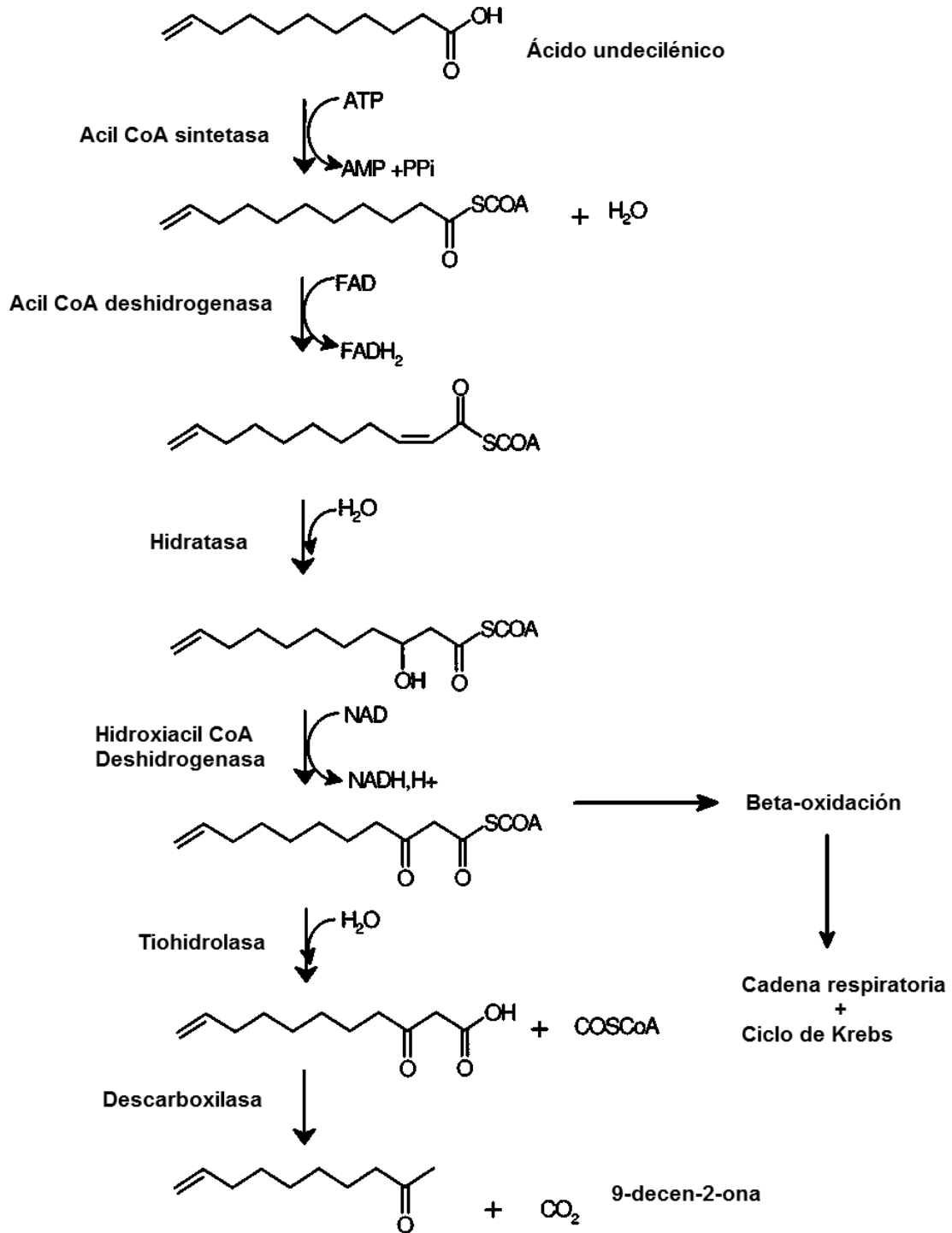


Figura 1