



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UTBM

DOMANDA NUMERO	101994900383008
Data Deposito	28/07/1994
Data Pubblicazione	28/01/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	D		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	K		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA PRODUZIONE DI GAMMA NONALATTONI IN FORMA NARUTALE.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Procedimento per la produzione di gamma nonalattoni
in forma naturale"

di: SAN GIORGIO FLAVORS S.p.A., nazionalità italia-
na, Via della Fossata 114/116/118 - 10147 Torino

Inventori designati: Claudio FUGANTI, Gioia ZUCCHI,
Gianna ALLEGRONE, Massimo BARBENI, Paolo CABELLA,
Mario VILLA

Depositata il: 28 Luglio 1994 TO 94A00062G

* * *

La presente invenzione si riferisce ad un pro-
cedimento per la produzione di gamma lattoni saturi
o insaturi aventi nove atomi di carbonio.

La recente introduzione di una discriminazione
legislativa tra aromatizzanti di derivazione naturale
e di identica struttura chimica, ma ottenuti per sin-
tesi (US Code of Federal Regulations 21:101.22.a.3,
Direttiva CEE 88/388 e D.L. 25 gennaio 1992 n. 107)
ha reso interessante la produzione di quantità so-
stanziali di agenti aromatizzanti non accessibili per
estrazione da fonti naturali per biodegradazione di
prodotti naturali. (D.W. Armstrong in Flavor Chemi-
stry, Trends and Developments R. Teranishi, R.G. But-
tery, F. Shahidi Ed; ACS Symposium Series 383, Ame-
rican Chemical Society; Washington D.C., 1989, pagg.

105-120). Questi prodotti sono preferiti dal consumatore e conferiscono maggior pregio agli alimenti ai quali vengono aggiunti; pertanto, è desiderabile la loro produzione con questi metodi.

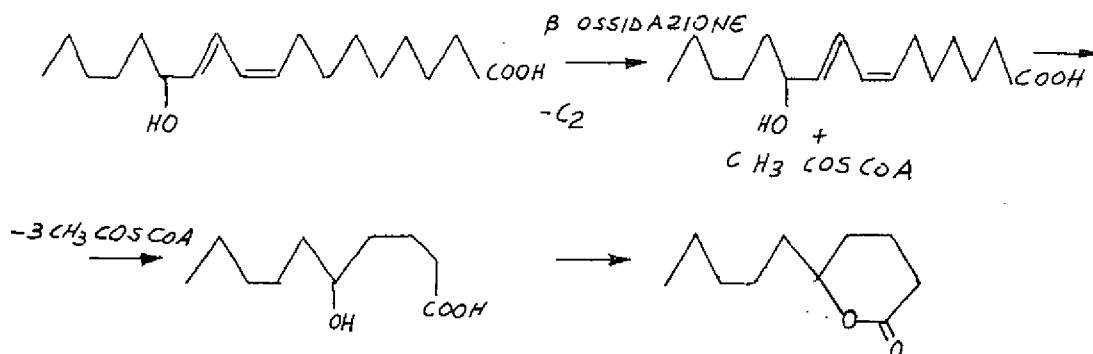
Tra i prodotti aromatizzanti più importanti sono da considerarsi gamma e delta lattoni da C_6 a C_{12} , che possono essere saturi, oppure mono o poli insaturi, con l'insaturazione nell'anello oppure in varie posizioni della catena. Essi sono costituenti chiave di molti aromi di frutta e di derivati del latte. La loro generazione nella frutta avviene in quantità estremamente piccole, generalmente al momento della maturazione. L'estrazione da fonti naturali di lattoni utili come aromi è anti-economica, data la bassa concentrazione alla quale sono presenti e la dipendenza della concentrazione dal grado di maturazione e da molti altri fattori difficilmente controllabili.

Pertanto, in anni recenti, per sopperire alla richiesta di lattoni in forma naturale sono state sviluppate molte procedure microbiologiche nelle quali precursori naturali dei lattoni, costituiti da derivati ossidrilati di acidi grassi naturali, vengono degradati a gamma e delta lattoni, dipendentemente dalla posizione dell'ossidrile rispetto al carbossile nel precursore usato.

In questo modo si produce gamma decanolide da acido ricinoleico (brevetto US 4 560 656 e brevetto europeo EP-B-0 258 993). Altri lattoni con numero pari di atomi di carbonio si ottengono per biodegradazione microbica dei prodotti di fotossidazione/riduzione degli acidi oleico, linoleico e linolenico come descritto in EP 90402217.5.

In tutti questi casi, i lattoni ottenuti contengono un numero pari di atomi di carbonio. Ciò è dovuto a ragioni biosintetiche. I precursori naturali ossidrilati, derivanti dagli acidi insaturi C₁₈ o C₁₆ hanno numero pari di atomi di carbonio e, procedendo la degradazione per beta ossidazione con rimozione di due atomi di carbonio come acetilSCoA, si ottengono lattoni a numero pari di atomi di carbonio.

Lo schema degradativo proposto è il seguente:



Tuttavia, esistono in natura gamma e delta lattoni a numero dispari di atomi di carbonio. Di questi, particolarmente importanti sono il gamma no-

traverso procedure enzimatiche.

Costituisce così oggetto della presente invenzione un procedimento per la produzione di gamma nonalattoni saturi o insaturi e loro miscele, caratterizzato dal fatto che comprende:

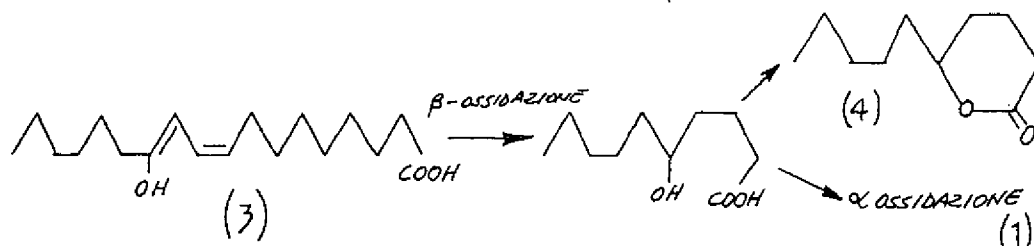
A) coltivare un microrganismo scelto dal gruppo che consiste di Pichia ohmeri e Pichia stipitis o entrambi in un substrato comprendente un idrossiacido insaturo C₁₈ con ossidrile in C₁₃ o un gliceride che lo contenga, per ottenere una miscela comprendente gamma nonanolide;

o alternativamente:

B) sottoporre a lipossigenazione un substrato comprendente un acido scelto dal gruppo che consiste di acido linoleico, acido linolenico e loro miscele e distillare in corrente di vapore il prodotto di lipossigenazione per ottenere un gamma lattone insaturo scelto tra gamma non-2-enolide e non-2, 6-dienolide o loro miscele.

Con riferimento alla variante di processo (A) sopra citato è particolarmente preferito l'impiego di acido (R) coriolico. In particolare, è stato scoperto che la degradazione microbiologica di acido coriolico (3) porta, con l'impiego di microrganismi quali Pichia stipitis e Pichia ohmeri, ad una miscela di

gamma nonanolide (1) e delta decanolide (4), presumibilmente secondo il cammino di reazione che segue.



In modo assolutamente inatteso, è stato scoperto che la quantità di gamma nonanolide (1) accumulato rispetto al delta decanolide (4) è molto maggiore quando si utilizza la forma enantiomerica (R) dell'acido coriolic (3). L'analisi GLC chirale multidimensionale indica che il gamma nonanolide (1) così prodotto è prevalentemente costituito dall'enantiomero (R), così come il delta decanolide (4) che lo accompagna. L'acido (R) coriolic utile come substrato può essere ottenuto facilmente da semi oleaginosi di piante, quali quelle del genere Coriaria.

Quando si usa come substrato l'acido (S) coriolic, l'accumulo di gamma nonanolide (1) nella forma (S) è molto minore.

Altri substrati idonei per la preparazione di gamma nonanolide sono miscele di idrossiacidi comprendenti acido coriolic ottenute per fotossidazione/riduzione o per lipossigenazione/riduzione di acido linoleico da solo o in miscela con altri acidi

grassi insaturi, quali l'acido oleico. Tuttavia, il rapporto tra gamma nonanolide e altri lattoni prodotti con la coltivazione dei suddetti microrganismi in questi substrati, tra i quali il più abbondante è il delta decanolide, è relativamente piccolo. Questo fatto rende meno favorevole il processo, in quanto è richiesta una separazione del prodotto desiderato dagli altri lattoni.

Il procedimento di fotossigenazione è di per sé noto e viene generalmente effettuato in solvente in presenza di un fotoattivatore naturale, come ampiamente descritto nella tecnica, ad esempio nel testo "The Lipid Handbook" Chapman & Holl, London, 1986 pag. 453.

Il processo di lipossigenazione, di per sé noto, è effettuato con l'impiego di lipossigenasi naturale, preferibilmente con il sistema enzimatico contenuto nella farina di lino.

Lo stadio di riduzione del prodotto di fotossidazione o lipossigenazione, per la produzione degli idrossiacidi, è preferibilmente effettuato mediante trattamento con un riducente naturale, quale ad esempio solfato ferroso o cisteina o suoi sali, in solvente appropriato, secondo la tecnica descritta da H.D. Belitz & W. Grosch in Food Chemistry, Springer

Verlag, Berlino, 1987 pag. 172 e H.W. Gardner, J. Agr. Food Chem. 1975, 23, 129.

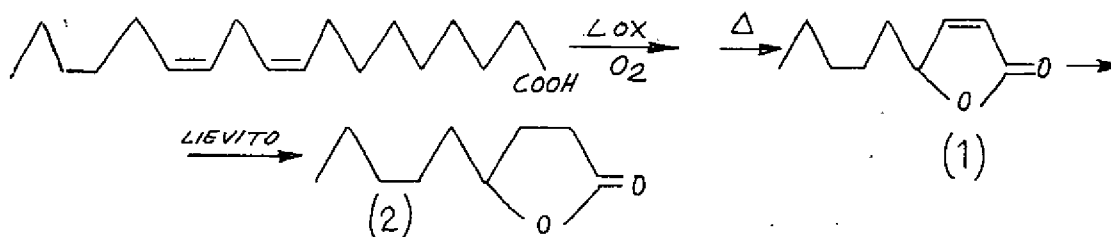
Nelle suddette miscele gli idrossiacidi possono essere nella forma di acidi liberi, esteri o gliceridi.

A parte l'interesse specifico per l'ottenimento di quantità rilevanti di gamma nonanolide, i procedimenti sopra descritti portano comunque a miscele di lattoni naturali, utili come componenti di aromi. La composizione di queste miscele dipende dal microrganismo, dal substrato e dal tempo di incubazione. Tali miscele possono quindi essere utilizzate nell'aromatizzazione o possono essere ulteriormente trattate per la separazione dei composti desiderati, che è effettuata secondo tecniche convenzionali.

Il cammino di processo (B) sopra citato porta all'ottenimento di miscele comprendenti lattoni a nove atomi di carbonio insaturi tra cui è di particolare interesse il gamma non-2-enolide (2). Questo prodotto è ritenuto responsabile del piacevole sapore caratteristico (deep fried) impartito agli alimenti fritti in olio (vedesi H.D. Belitz e W. Grosch, Food Chemistry, Spinger Verlag, 1987, pag. 180). ed è stato trovato in fonti vegetali quali la Fava Tonka.

L'interesse per l'ottenimento di questo prodotto

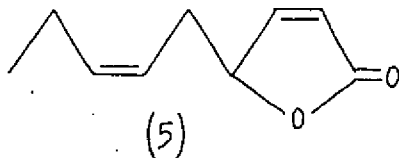
non è tuttavia limitato al fatto in sé. E' noto che il gamma non-2-enolide è facilmente ridotto dal lievito a gamma nonanolide (G. Fronza e coll., Tetrahedron Letters, 1993, 34, 6467). Pertanto, l'accesso a gamma non-2-enolide è un'altra via di accesso a gamma nonanolide naturale, come illustrato nello schema di reazione che segue in cui è utilizzato come substrato di lipossigenazione l'acido linoleico.



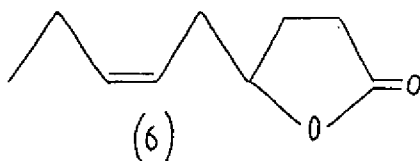
L'interesse di quest'ultima trasformazione sta anche nel fatto che il gamma non-2-enolide (2), generato attraverso questo processo, contiene un eccesso dell'enantiomero (S). Il rapporto enantiomerico si mantiene intatto anche quando il doppio legame viene saturato biologicamente. In questo modo si ha accesso al gamma nonanolide con un eccesso di enantiomero (S), mentre da acido (R) coriolico si ottiene l'enantiomero (R).

La trasformazione sopra indicata consistente nella degradazione di acido polinsaturo C-18 a gamma lattone insaturo C-9, ad opera di lipossigenasi e ossigeno dell'aria, non è limitata all'acido linoleico,

ma si verifica anche con acido linolenico. E' stato riscontrato che sottoponendo all'azione degli agenti sopra indicati una miscela di acido linoleico e acido linolenico, si ottiene nel distillato una miscela di gamma lattoni C₉, dei quali uno è il prodotto (2) e l'altro è il corrispondente prodotto portante un'ulteriore insaturazione in posizione 6 di struttura (5) che segue.



L'interesse di questa scoperta non è limitato all'ottenimento del lattone insaturo (5), ma si estende perché la miscela così ottenuta per trattamento con lievito in fermentazione dà luogo ad una miscela di gamma nonanolide e di gamma non-6-enolide (6).



Questo lattone è un componente dell'essenza di gelsomino, che così diventa accessibile per via biotecnologica a partire dall'acido linolenico.

Esempi I-IV:

Procedura generale di biotrasformazione in Pichia

ohmeri e stipitis.

Si utilizza un provettone di P.ohmeri (CBS 5367) e/o P.stipitis (CBS 5773) cresciuta su MPGA (estratto di malto 20g/L, peptone 5g/L, glucosio 20g/L, agar 15g/L, pH 6.5-7) per tre giorni a 28-30°C.

Questo viene seminato in beuta da 300mL contenente 50 mL di MPGB (estratto di malto 20g/L, peptone 5g/L, glucosio 20 g/L). La beuta viene posta ad agitare (120 oscillazioni/minuto) a 28-30°C per 24 ore. Il preinoculo così ottenuto viene seminato in ragione del 10% in beute da 300mL, contenenti 50mL di terreno MPGB e fatto crescere, nelle stesse condizioni per 24 ore. A questo punto si somministrano i substrati idrossiacidi in concentrazione di 2,5g/L. Si lascia effettuare la biotrasformazione nelle condizioni di temperatura e agitazione sopra indicate per 24 ore e rispettivamente 48 ore. A questi intervalli si filtra il micelio che viene lavato più volte sul filtro con cloruro di metilene. Questo viene poi utilizzato per estrarre il liquido il cui pH è stato portato a 4 per aggiunta di acido citrico in soluzione.

I substrati utilizzati sono stati:

(a) acido (R) coriolic, ottenuto per idrolisi con lipasi dei gliceridi ottenuti dai semi di Coriaria.

I risultati ottenuti con l'impiego di questo

substrato e con l'impiego rispettivamente di Pichia ohmeri e Pichia stipitis sono riportati in tabella I.

Tabella I:

Incorporazione di acido R coriologico

Rapporto in peso gamma nonanolide/delta decanolide

	24 h	48h
P.ohmeri	0.18	0.36
P.stipitis	2.89	2.63

b) acido (S) coriologico, ottenuto per lipossigenazione dell'acido linoleico (90% Fluka) con lipossigenasi da soia (Fluka) a pH 9, utilizzando aria oppure ossigeno. Al termine della reazione si aggiunge una soluzione di cisteinato di sodio. La miscela di reazione viene fatta reagire a temperatura ambiente fino a che risulta negativa al test dei perossidi. Si corregge il pH a 4-5 con acido citrico e si estrae con solventi l'acido S coriologico così ottenuto.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella II

Tabella II:

Incorporazione di acido S coriologico

Rapporto in peso gamma nonanolide/delta decanolide

	24 h	48h
P.ohmeri	0.15	0.13
P.stipitis	0.19	0.53

c) miscela di idrossiacidi ottenuti nel modo che segue: 50 g di semi di lino vengono sminuzzati a farina fine, facendo attenzione che non si abbia eccessivo riscaldamento della massa durante l'operazione. La farina così ottenuta è sospesa in un litro di tampone borato a pH 9 e agitata per un'ora. Si aggiungono 3 ml/L di acido linoleico e si fa passare aria od ossigeno per 6 ore a temperatura di 10-15°C. Si aggiunge cisteinato di sodio e si opera il recupero degli idrossiacidi come sopra indicato.

I risultati ottenuti espressi come rapporto in peso tra gamma nonanolide e lattoni totali sono riportati nella tabella III.

Tabella III:

Incorporazione lipossigenati farina di lino	Rapporto gamma nonanolide / lattoni totali	
	24 h	48h
P.ohmeri	0.06	0.18
P.stipitis	0.05	0.36

d) Miscela di idrossiacidi ottenuti nel modo che segue: 10 mL di acido linoleico in 100 mL di cloruro di metilene in presenza di 1 g di clorofilla sono sottoposti ad ossidazione con aria mentre si sottopone a radiazione solare. Al termine della reazione si estrae la fase organica con tampone borato a pH 9. La

fase acquosa contenente gli idroperossidi è successivamente trattata con cisteinato di sodio e gli idrossiacidi sono recuperati per estrazione con solvente dalla soluzione acidificata con acido citrico.

I risultati ottenuti espressi come rapporti in peso di gamma nonanolide a lattoni totali sono riportati nella tabella IV.

Tabella IV:

Incorporazione fotossidati

Rapporto gamma nonanolide / lattoni totali

	24 h	48h
P.ohmeri	0.17	0.14
P.stipitis	0.66	0.16

Esempi V e VII:

Procedura generale per produrre non-2-enolide (2) e non-2,6-dienolide (5) da acido linoleico e linolenico per azione di lipossigenasi.

Acido linoleico e, rispettivamente, miscela di linoleico e linolenico sono sottoposti a lipossigenazione a temperatura ambiente a pH 9 con lipossigenati da soia (Fluka), in ragione di 2 ml/L e 100 mg di lipossigenasi per 24 ore, utilizzando aria oppure ossigeno. Al termine dell'incubazione si recuperano i prodotti per distillazione in corrente di vapore, raccogliendo circa 500 ml. La fase acquosa così ot-

tenuta è estratta con solvente. Questo è evaporato a dare 0,3-1,1 g di miscela di prodotti avente la composizione indicata nella tabella V per il substrato di partenza costituito da acido linoleico e in tabella VII per la miscela di acido linoleico e linolenico. Nella tabella V sono riportati i risultati di 5 prove significative eseguite secondo la procedura sopra riportata.

Tabella V

Percentuali gascromatografiche nell'olio distillato

n° prova	V.1	V.2	V.3	V.4	V.5
non-2-enolide	27.4 (R/S=29/71)	16.5 (R/S=26/74)	24.1 (R/S=19/81)	5.9 (R/S=31/69)	6.6 (R/S=23/77)
nonanolide	0.45	1.30	0.43	0.19	0.82

Tabella VII

	%	R	S
gamma 2-nonenolide	2,58	-	-
gamma-2,6-nonadienolide	3,19	54	46

Esempio VI:

Procedura di riduzione con lievito di gamma lattoni insaturi.

20 g di lievito di panificazione (Distillerie Italiane) in 200 ml di acqua e 5 g di glucosio sono agitati 10 minuti a temperatura ambiente. Si aggiungono le miscele di lattoni aventi le composizioni indicate nelle tabelle V e VII e si lascia agitare per 24 ore. Si recuperano i prodotti per distillazione in corren-

te di vapore, raccogliendo circa 150 ml di distillato. Questo è estratto a dare la miscela la cui composizione è riportata in tabella VI a) per i substrati di partenza V.3 e V.4 di tabella V e in tabella VI b) per la miscela di partenza della tabella VII.

Tabella VI

a)

Substrato	gamma-2-nonenolide		
	%	R	S
V.3	24.13	19	81
V.4	5.83	31	69

b)

Substrato	gamma-nonanolide		
	%	R	S
VI	38.17	35	65

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di gamma lattoni aventi 9 atomi di carbonio, saturi o insaturi e loro miscele, in forma naturale, caratterizzato dal fatto che comprende:

A) coltivare un microrganismo scelto dal gruppo che consiste di Pichia ohmeri e Pichia stipitis o entrambi in un substrato comprendente un idrossiacido insaturo C₁₈ con ossidrile in C₁₃ o un gliceride che lo contenga, per ottenere una miscela comprendente gamma nonanolide;

o alternativamente

B) sottoporre a lipossigenazione un substrato comprendente un acido scelto dal gruppo che consiste di acido linoleico, acido linolenico e loro miscele e

distillare in corrente di vapore il prodotto di lipossigenazione per ottenere una miscela comprendente un gamma lattone insaturo scelto tra gamma non-2 enolide, gamma non-2,6-dienolide o loro miscele.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante A) in cui detto substrato comprende l'acido (R) coriolico e il microrganismo è Pichia stipitis.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante A), in cui detto substrato è il prodotto ottenuto per fotossidazione/riduzione di acido linoleico o di

una miscela di acidi grassi insaturi C_{18} comprendente acido linoleico.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante A), in cui detto substrato è il prodotto ottenuto per lipossigenazione/riduzione di acido linoleico o miscela di acidi grassi insaturi C_{18} comprendente acido linoleico.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4 in cui la lipossigenazione è effettuata con il sistema enzimatico contenuto nella farina di lino.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 3 o 4, in cui la riduzione del prodotto di fotossidazione o lipossigenazione è effettuata con riducente naturale scelto tra solfato ferroso o cisteina e suoi sali.

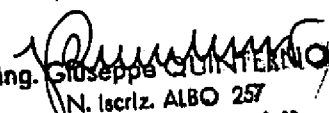
7. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante B) in cui il prodotto di reazione includente detto gamma lattone insaturo è sottoposto a fermentazione in lievito per ottenere gamma nonanolide o gamma non-6-enolide o loro miscele.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante B), in cui il substrato sottoposto a lipossigenazione comprende acido linoleico e il gamma lattone ottenuto consiste di gamma non-2-enolide.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante B), in cui il substrato sottoposto a lipossigena-

zione comprende una miscela di acido linoleico e linolenico, in cui il prodotto ottenuto comprende gamma non-2-enolide e gamma non-2,6-dienolide.

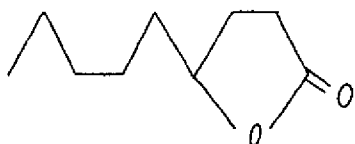
PER INCARICO


Ing. Giuseppe QUINTERNO
N. Iscritz. ALBO 257
(In proprio e per gli altri)

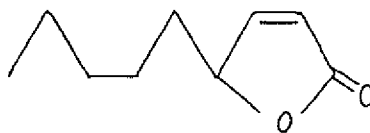


CIGONACCI CASERTA & PERANI
C.A.S.

nanolide (1) e il gamma non-2-enolide (2) aventi la forma di struttura che segue:



(1)



(2)

Questi due prodotti sono costituenti minori della *Dipteryx odorata* (Fava Tonka) (M. Woerner e coll. in *Unters. Forsch.* 1991, 193, 21). Inoltre il gamma-nonalattone è componente noto di albicocca, fragola, mora, pesca e numerosi altri frutti. Nella forma racemica sintetica il gamma nonanolide trova vastissima applicazione nell'industria degli aromi alimentari, ad esempio come componente degli aromi di frutta. Tuttavia, malgrado l'importanza di questi lattoni a numero dispari di atomi di carbonio, non esistono procedure atte a fornire quantità sostanziali di prodotto in forma otticamente attiva con procedura naturale.

La presente invenzione si basa sulla scoperta che lattoni a nove atomi di carbonio saturi e insaturi possono essere ottenuti da precursori naturali at-

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di gamma lattoni aventi 9 atomi di carbonio, saturi o insaturi e loro miscele, in forma naturale, caratterizzato dal fatto che comprende:

A) coltivare un microrganismo scelto dal gruppo che consiste di Pichia ohmeri e Pichia stipitis o entrambi in un substrato comprendente un idrossiacido insaturo C₁₈ con ossidrile in C₁₃ o un gliceride che lo contenga, per ottenere una miscela comprendente gamma nonanolide;

o alternativamente

B) sottoporre a lipossigenazione un substrato comprendente un acido scelto dal gruppo che consiste di acido linoleico, acido linolenico e loro miscele e

distillare in corrente di vapore il prodotto di lipossigenazione per ottenere una miscela comprendente un gamma lattone insaturo scelto tra gamma non-2 enolide, gamma non-2,6-dienolide o loro miscele.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante A) in cui detto substrato comprende l'acido (R) coriolico e il microrganismo è Pichia stipitis.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante A), in cui detto substrato è il prodotto ottenuto per fotossidazione/riduzione di acido linoleico o di

una miscela di acidi grassi insaturi C_{18} comprendente acido linoleico.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante A), in cui detto substrato è il prodotto ottenuto per lipossigenazione/riduzione di acido linoleico o miscela di acidi grassi insaturi C_{18} comprendente acido linoleico.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4 in cui la lipossigenazione è effettuata con il sistema enzimatico contenuto nella farina di lino.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 3 o 4, in cui la riduzione del prodotto di fotossidazione o lipossigenazione è effettuata con riducente naturale scelto tra solfato ferroso o cisteina e suoi sali.

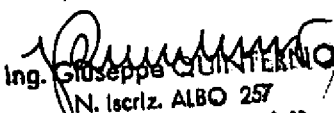
7. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante B) in cui il prodotto di reazione includente detto gamma lattone insaturo è sottoposto a fermentazione in lievito per ottenere gamma nonanolide o gamma non-6-enolide o loro miscele.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante B), in cui il substrato sottoposto a lipossigenazione comprende acido linoleico e il gamma lattone ottenuto consiste di gamma non-2-enolide.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 1, variante B), in cui il substrato sottoposto a lipossigena-

zione comprende una miscela di acido linoleico e linolenico, in cui il prodotto ottenuto comprende gamma non-2-enolide e gamma non-2,6-dienolide.

PER INCARICO


Ing. Giuseppe QUINTERIO
N. Iscritz. ALBO 257
(In proprio e per gli altri)



CIGONACCI CASSETTA & PERANI
S.p.A.