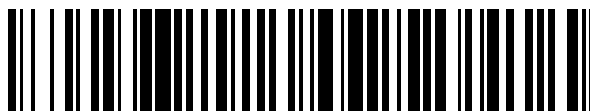


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 814**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C11B 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2008 E 08720342 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2123765**

54 Título: **Método para la producción de un producto de fermentación microbiana**

30 Prioridad:

06.03.2007 JP 2007056104

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

28.11.2013

73 Titular/es:

**KAO CORPORATION (100.0%)
14-10, Nihonbashi-Kayabacho, 1-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8210, JP**

72 Inventor/es:

**HAMA, MASAKATSU;
KONISHI, HIROYUKI;
WATANABE, TAKAAKI;
ONOZUKA, KAZUHIRO y
KOYAMA, SHINGO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 431 814 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

Método para la producción de un producto de fermentación microbiana.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la producción de una forma diol que es útil como un intermedio para la producción de 3a,6,6,9a-tetrametildodecahidronafto[2,1-b]furano.

10 **Antecedentes de la invención**

El 3a,6,6,9a-tetrametildodecahidronafto[2,1-b]furano (de aquí en adelante, se describirá como “compuesto A”) es un componente de aroma contenido en el ámbar gris, que es una secreción patológica producida en el cuerpo del semen de ballena, y es un compuesto importante que es indispensable como un perfume sintético basado en ámbar. El compuesto A se produce principalmente mediante un método de síntesis química usando esclareol, que se extrae del amaro (*Salvia sclarea* L.), como material de partida. Como intermedios del compuesto A se conocen, 3a,6,6,9a-tetrametildodecahidronafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona (de aquí en adelante, indicado como “esclareolido”) y 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildodecahidronaftalen-2-ol (de aquí en adelante, indicado como “forma diol”).

Sin embargo, tal método convencional tiene un problema de modo que su carga medioambiental es pesada, y no se puede alcanzar suficiente pureza o rendimiento. Mientras tanto, se han descrito métodos para producir el compuesto A obteniendo un intermedio del compuesto A a partir de esclareol mediante conversión microbiana y ciclación de este intermedio (por ejemplo, documentos de patente 1 y 2).

[Documento de patente 1] JP-A-03-224478
[Documento de patente 2] JP-A-62-74281.

El documento US-A-4 798 799 divulga un proceso para la producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildodecahidronaftalen-2-ol que comprende un paso de cultivo y uno de purificación. La purificación se realiza mediante cristalización con hexano/cloroformo. El documento US-A-4 798 799 también enumera técnicas convencionales tales como filtración, centrifugación, extracción con solventes y destilación.

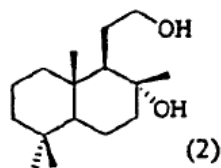
El documento EP-A-419 026 enseña un proceso para la producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildodecahidronaftalen-2-ol que comprende un paso de cultivo y uno de purificación. La purificación se realiza mediante extracción con acetato de etilo, secado, disolución de la torta en hexano y acetato de etilo calientes y evaporación del solvente.

El documento EP-A-204 009 divulga un proceso para la producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildodecahidronaftalen-2-ol que comprende un paso de cultivo y uno de purificación. La purificación se realiza mediante extracción con acetato de etilo, después se secan los extractos (evaporación del solvente) y los residuos se purifican mediante cromatografía en columna en gel de sílice usando hexano/isopropano como solvente.

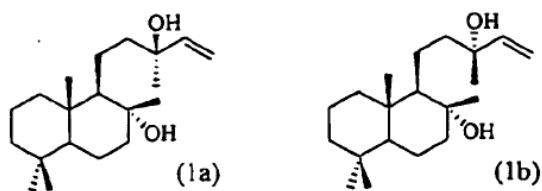
El documento EP-A-1 997 879 divulga un proceso para la producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildodecahidronaftalen-2-ol que comprende un paso de cultivo y uno de purificación. La purificación se realiza mediante técnicas convencionales con el uso de combinaciones de centrifugación, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, filtración en membrana por ósmosis inversa, electrodiálisis, extracción con sales, cristalización. No se dan detalles para los procesos.

Divulgación de la invención

La presente invención proporciona un método para la producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildodecahidronaftalen-2-ol representado por la fórmula (2):



que incluye cultivar un microorganismo usando un medio que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula (1a) y/o fórmula (1b) como sustrato:



filtrar el líquido de cultivo a través de un filtro que tiene un tamaño de apertura de 10 a 100 μm ;

- 5 lavar el residuo en el filtro con agua o un solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$, obteniéndose de esta manera una torta; posteriormente

disolver la torta obtenida en un solvente que tiene un valor SP de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$, obteniéndose de esta manera una solución;

- 10 filtrar o centrifugar la solución; y

secar el filtrado o sobrenadante resultante.

15 Breve descripción de la figura

La figura 1 es un diagrama que muestra las composiciones del líquido de cultivo 3, el líquido después de la filtración, el líquido después de lavar (ejemplo 12), y un extracto obtenido según un método de extracción con acetato de etilo (ejemplo comparativo 9).

20 Descripción detallada de la invención

Con respecto a los documentos de patente 1 y 2, la separación y purificación de la forma diol obtenida por conversión microbiana se lleva a cabo disolviendo un extracto que se obtiene mediante extracción con solvente en un líquido de cultivo con acetato de etilo y después secando, en hexano/acetato de etilo o hexano/cloroformo caliente, y cristalizando la forma diol a partir de la solución. Sin embargo, el líquido de cultivo contiene esclareol o esclareolido sin reaccionar, componentes del medio y similares como una mezcla, además de la forma diol, por tanto, en los métodos de extracción con solvente convencionales que usan acetato de etilo y similares, también se recuperan al mismo tiempo componentes diferentes de la forma diol. Como tal, la separación y purificación de la forma diol sola resultó ser muy difícil. Mientras tanto, cuando el extracto se lava con una solución ácida o alcalina con referencia al método para la purificación de esclareolido (patente en EE UU No. 5.945.546), aunque se puede obtener un efecto de mejora del color, resultó que no se produjo ningún cambio principal en la composición, haciendo por lo tanto imposible obtener una forma diol de alta pureza.

- 35 Por tanto, la presente invención se refiere a un método para la producción de una forma diol, mediante el cual se puede producir una forma diol de alta pureza de forma eficaz.

Los inventores de la presente invención realizaron investigaciones sobre los medios de separar y purificar una forma diol, y como resultado, encontraron que mientras que tanto la forma diol como el esclareolido son insolubles en agua, estos compuestos se pueden separar mediante filtración del líquido de cultivo a través de un filtro que tiene un tamaño de malla específico y después lavando con agua. Los inventores también encontraron que la solubilidad de la forma diol, contra solventes específicos tal como etanol, es alta, y las impurezas se pueden eliminar disolviendo la torta obtenida mediante lavado en agua en estos solventes, de modo que se puede obtener una forma diol de alta pureza en un alto rendimiento.

- 45 Según la presente invención, se puede producir eficazmente una forma diol de alta pureza, que es útil como intermedio para la producción del compuesto A.

En la presente invención, el microorganismo que se puede usar en la conversión microbiana no está particularmente limitado siempre que sea un microorganismo que tenga una capacidad de producir la forma diol, que es un intermedio del compuesto A, usando un compuesto representado por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b) como sustrato, por ejemplo, se pueden mencionar microorganismos que pertenecen a la clase de los ascomicetos, microorganismos que pertenecen al género *Cryptococcus*, microorganismos que pertenecen a la clase de los basidiomicetos, microorganismos que pertenecen al género *Hyphozyma*, y similares. Entre estos, los microorganismos que pertenecen a la clase de los ascomicetos y los microorganismos que pertenecen al género *Hyphozyma* son preferidos, desde el punto de vista de la eficacia de producción de la forma diol, que es un intermedio del compuesto A. Respecto a los microorganismos que pertenecen a la clase de los ascomicetos, por ejemplo, se puede mencionar un microorganismo designado como *Ascomycete* sp. KSM-JL2842 y depositado con el Depositario del Organismo de Patentes Internacional en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial con

el número de acceso FERM P-20759. Con respecto a los microorganismos que pertenecen al género *Hyphozyma*, por ejemplo se puede mencionar la cepa ATCC20624 descrita en la patente japonesa No. 2547713.

El microorganismo se puede aislar de la tierra evaluando la capacidad para producir la forma diol, que es un intermedio del compuesto A, como un indicador. La capacidad para producir la forma diol, que es un intermedio del compuesto A, se puede evaluar cultivando un microorganismo de prueba en un medio de cultivo que contiene el compuesto representado por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b), y detectando la forma diol, que es un intermedio del compuesto A, contenida en el medio. La detección de la forma diol, que es un intermedio del compuesto A, se puede llevar a cabo usando métodos de análisis convencionalmente conocidos tales como cromatografía de gases (CG), cromatografía gas líquido (CGL), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopia de infrarrojo (IR), y resonancia magnética nuclear (RMN).

Cuando el microorganismo se cultiva, las condiciones de cultivo son están particularmente limitadas, y se puede usar un medio de cualquier composición siempre que el medio contenga el compuesto representado por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b) y permita que el microorganismo crezca en el mismo. Los ejemplos de medios que se pueden usar incluyen medios sólidos y medios líquidos, que respectivamente contienen fuentes de carbono tales como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y sales de ácidos orgánicos; fuentes de nitrógeno tales como sales de amonio inorgánicas y orgánicas, sustancias orgánicas que contienen nitrógeno, y aminoácidos; minerales metálicos tales como cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, y carbonato de calcio; vitaminas; y similares. Además, también se puede añadir un tensioactivo o un agente antiespumante según las condiciones de cultivo.

Ni el intervalo de pH óptimo ni el intervalo de temperatura óptima están particularmente limitados. Por ejemplo, un intervalo de pH óptimo es pH 3 a 8, preferiblemente pH 4 a 8, y más preferiblemente pH 5 a 7, y un intervalo de temperatura óptimo es de 10 a 35°C, preferiblemente de 15 a 30°C, y más preferiblemente de 20 a 30°C. El cultivo se puede llevar a cabo utilizando cultivo con agitación, cultivo anaerobio, cultivo estático o cultivo usando un lecho de fermentación, así como una reacción en célula en reposo y reacción en célula inmovilizada.

La concentración del compuesto representado por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b) que se añade al medio, es preferiblemente del 0,1 al 50% en masa, desde el punto de vista de la eficacia de producción para la forma diol que es un intermedio del compuesto A. El sustrato se puede añadir al medio antes de, o en medio de, el cultivo.

Según la presente invención, primero, el líquido de cultivo obtenido por la conversión microbiana se filtra a través de un filtro que tiene un tamaño de apertura de 10 a 100 μm . Mediante esta filtración, se pueden eliminar impurezas tales como las células bacterianas incluidas en el líquido de cultivo. Si el tamaño de apertura del filtro es menor de 10 μm , se puede producir obstrucción y bloqueo. Por otra parte, si el tamaño de apertura es mayor de 100 μm , el rendimiento de la forma diol se hace malo. El tamaño de apertura del filtro es preferiblemente de 10 a 90 μm , y más preferiblemente de 10 a 75 μm , desde el punto de vista de aumentar la proporción de recuperación y la pureza de la forma diol, y el tamaño de apertura es incluso más preferiblemente de 20 a 40 μm , desde los puntos de vista de proporción de recuperación, pureza y eficacia de la filtración.

Respecto a la técnica de filtración, se puede llevar a cabo cualquier filtración por succión, filtración por presión y filtración centrífuga, pero desde el punto de vista del rendimiento, la filtración por succión es preferida. Respecto al material del filtro, se pueden usar varios materiales, y específicamente, se pueden usar filtros hechos de resinas tales como polipropileno, poliéster o nailon; filtros hechos cerámica; filtros hechos de metales, y similares. La temperatura del líquido en el momento de la filtración es preferiblemente de 0 a 80°C, más preferiblemente de 5 a 60°C, e incluso más preferiblemente de 10 a 35°C, desde los puntos de vista de proporción de recuperación, pureza y eficacia de la filtración.

Posteriormente, el residuo en el filtro se lava con agua o un solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$. Mediante esta operación de lavado, se pueden eliminar esclareol, esclareolido e impurezas contenidas en el líquido de cultivo, tales como componentes del medio. Si se usa un solvente que tiene un valor SP en el intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ como el líquido de lavado, el solvente disuelve no solo el esclareol o esclareolido, sino también la forma diol. La solubilidad de la forma diol en el solvente usado en el presente documento es preferiblemente del 0,2% o menor, y más preferiblemente del 0,1% o menor. Aquí, el valor SP representa el parámetro de solubilidad, y se describe en, por ejemplo, bibliografía de referencia "Fundamentals and Applications of SP Values and Calculation Methods" (Johokiko Co., Ltd., 2005). Los ejemplos del solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ incluyen hexano (valor SP 7,2), ciclohexano (valor SP 8,2), agua (valor SP 23,4), una solución acuosa de etanol al 30% o menos. Estos se pueden usar individualmente o en combinación de dos o más especies. También se puede usar un solvente mixto preparado mezclando apropiadamente solventes tales como agua, etanol, metanol, acetona y acetato de etilo, y ajustando el valor SP para que esté fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$. Además, el valor SP es un valor a 20°C, y en el caso de un solvente mixto, es un valor SP obtenido después de la mezcla. Aquí, respecto al valor SP del solvente mixto, se usa un valor obtenido como promedio de los respectivos valores SP de los solventes basado en la relación de volumen. El líquido de lavado es preferiblemente agua o un solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$, y más preferiblemente agua o un solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 7,5 a 20

(cal/cm^3)^{1/2}, desde el punto de vista de aumentar la proporción de recuperación y la pureza de la forma diol, y el agua es incluso más preferida. La temperatura en el líquido de lavado es preferiblemente de 0 a 80°C, más preferiblemente de 5 a 60°C, e incluso más preferiblemente de 10 a 35°C, desde los puntos de vista de proporción de recuperación, pureza y eficacia de la filtración.

La frecuencia de la operación de lavado es preferiblemente de 1 a 6 veces, y más preferiblemente de 2 a 3 veces, desde el punto de vista de eliminación de esclareol o esclareolido, mientras que permite que la forma diol se quede atrás. La cantidad del líquido de lavado usado en una operación de lavado preferiblemente se ajusta a 100 ml por 100 ml de líquido de cultivo. La temperatura del líquido de lavado es preferiblemente de 5 a 90°C.

Posteriormente, la torta obtenida mediante la separación y el fraccionamiento se disuelve en un solvente que tiene un valor SP de 8,3 a 20 (cal/cm^3)^{1/2}. Un solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 (cal/cm^3)^{1/2} tiene baja solubilidad para la forma diol, y da un rendimiento malo.

Los ejemplos del solvente que tiene un valor SP de 8,3 a 20 (cal/cm^3)^{1/2} incluyen alcoholes inferiores tales como metanol (valor SP 14,5), etanol (valor SP 13,0), 1-propanol (valor SP 12,0), 2-propanol (valor SP 11,5) y 1-pentanol (valor SP 10,6); acetato de etilo (valor SP 9,1), ácido acético (valor SP 10,5), etilenglicol (valor SP 16,1), dietilenglicol (valor SP 14,6), glicerina (valor SP 16,5), tolueno (valor SP 8,9), acetona (valor SP 9,9). Estos se pueden usar individualmente o en combinación de dos o más especies. También se puede usar un solvente mixto preparado mezclando apropiadamente solventes tales como agua, etanol, metanol, acetona y acetato de etilo, y ajustando el valor SP para que esté en el intervalo de 8,3 a 20 (cal/cm^3)^{1/2}. Entre estos, desde el punto de vista de aumentar la proporción de recuperación y la pureza de la forma diol, un solvente que tiene un valor SP de 8,9 a 18,1 (cal/cm^3)^{1/2} es preferido, un solvente que tiene un valor SP de 10,5 a 17 (cal/cm^3)^{1/2} es más preferido, y etanol o una solución acuosa de etanol es incluso más preferido. La concentración de etanol en la solución acuosa de etanol es preferiblemente una concentración del 60 al 99,5%, en vista de la solubilidad de la forma diol.

La cantidad del solvente usado en la destilación de la torta es preferiblemente de 100 a 500 ml relativo a 100 g de la torta, en vista de la solubilidad de forma diol. La temperatura del solvente es preferiblemente de 20 a 60°C.

Posteriormente, la solución se filtra o centrifuga para eliminar impurezas tales como restos del microorganismo.

El tamaño del filtro es preferiblemente un tamaño de apertura de 0,1 a 10 μm , y más preferiblemente un tamaño de apertura de 0,2 a 1 μm , desde el punto de vista de aumentar la proporción de recuperación y la pureza de la forma diol. Respecto a la técnica de filtración y el material del filtro, se pueden mencionar las mismas técnicas y materiales descritos anteriormente.

La centrifuga es preferiblemente un aparato común, tal como una centrifuga de tipo placa de separación, una centrifuga de tipo cilindro o una centrifuga de tipo decantador. Las condiciones de centrifugación son tales que la temperatura es preferiblemente de 5 a 60°C, y más preferiblemente de 20 a 30°C, y la velocidad de rotación y el tiempo son, por ejemplo, en el caso del tipo cilindro, preferiblemente de 2000 a 12000 r/min, más preferiblemente de 3000 a 12000 r/min, e incluso más preferiblemente de 10000 a 12000 r/min, durante preferiblemente de 1 a 30 minutos, más preferiblemente de 2 a 10 minutos, e incluso más preferiblemente de 5 a 10 minutos.

Se puede obtener una forma diol de alta pureza a partir del filtrado o sobrenadante resultante con un buen rendimiento, por secado. La temperatura de secado es preferiblemente desde temperatura ambiente hasta 90°C, y también se puede realizar el secado a presión reducida.

La forma diol se convierte al compuesto A mediante deshidrociclación en varios solventes, usando un catalizador ácido, por ejemplo, ácido p-toluenosulfónico, cloruro de ácido p-toluenosulfónico, una cantidad catalítica de ácido sulfúrico y un intercambiador de iones ácidos.

Ejemplos

Conversión microbiana 1

Se inoculó un asa de platino de la cepa ATCC20624 de *Hyphozyma roseoniger* en caldo YM al 2,1% y el sistema se sometió a cultivo con agitación a 25°C durante tres días. Lo resultante se usó como un inóculo. Posteriormente, el inóculo se inoculó en un medio que contenía caldo YM al 2,1% y sulfato de magnesio al 0,1%, y se llevó a cabo un cultivo con agitación ventilado en un fermentador de 1 litro a 25°C, 0,5 vvm y 400 r/min durante dos días. A continuación, se añadió un sustrato formado de Tween 80 al 10% y esclareol al 20% en un momento apropiado de modo que la concentración final alcanzó el 4% de esclareol, y durante 5 días desde la adición de sustrato, se realizó un cultivo con agitación ventilado mientras se controlaba la condición de pH a pH 6,0 usando NaOH 1 N y HCl 1 N. El líquido de cultivo resultante se designó como líquido de cultivo 1.

Conversión microbiana 2

Se inoculó un asa de platino de la cepa *Ascomycete* sp. KSM-JL2842 en caldo YM al 2,1% y el sistema se sometió a cultivo con agitación a 25°C durante tres días. Lo resultante se recogió y se lavó tres veces con solución salina fisiológica, y después se mezcló con medio formado de una solución de tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0), sulfato de magnesio al 0,1%, Tween 80 al 3% y esclareol al 6%. La mezcla de reacción se sometió a reacción de célula en reposo en un fermentador de 1 litro a 25°C, 0,5 vvm y 400 r/min durante 10 días

El líquido de cultivo resultante se designó como líquido de cultivo 2.

Conversión microbiana 3

El cultivo se llevó a cabo mediante el mismo método usado en la conversión microbiana 1, excepto que la cepa bacteriana usada era la cepa *Ascomycete* sp. KSM-JL2842. El líquido de cultivo resultante se designó como líquido de cultivo 3.

Método de análisis

Con respecto al método de análisis para esclareol, esclareolido y forma diol, los compuestos se extrajeron con acetato de etilo y se diluyeron apropiadamente, y se realizó análisis por cromatografía de gases (CG). El análisis por CG se realizó con un sistema 6890N CG (Agilent Technologies, Inc.), y las condiciones del análisis fueron como sigue. Se usó un FID (detector de ionización de llama) (Agilent Technologies, Inc.) como detector, la temperatura de la entrada de inyección era 250°C, y el método de inyección se llevó a cabo en modo de separación (relación de separación 100:1). El flujo total fue 200 ml/min, la velocidad de flujo de la columna fue 0,4 ml/min, la columna usada fue DB-WAX (Φ 0,1 mm x 10 m) (J&W Technology, Ltd.), y la temperatura del horno fue 250°C.

Ejemplos 1 a 4

El líquido de cultivo 1 (30 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa ATCC20624, se sometió a filtración por succión con filtros que tienen un tamaño de apertura indicado en la tabla 1, respectivamente. Posteriormente, se repitió el lavado tres veces usando 30 ml de agua destilada (valor SP 23,4). La temperatura en el momento de la filtración y los lavados era temperatura ambiente (20°C). Posteriormente, las tortas resultantes se disolvieron en etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (valor SP 13,0) (30 ml) respectivamente, y cada solución se filtró con un filtro de 0,2 μ m. A continuación, los filtrados se secaron a presión reducida, para obtener cristales de la forma diol, respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Ejemplos comparativos 1 y 2

Se obtuvieron cristales de la forma diol de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que el líquido de cultivo 1 obtenido por conversión microbiana usando la cepa ATCC20624 se sometió a filtración por succión con filtros que tenían un tamaño de apertura de 5 μ m y 150 μ m, respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Ejemplo comparativo 3

El líquido de cultivo 1 (20 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa ATCC20624 se mezcló con acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (60 ml), la mezcla se centrifugó (3000 rpm, durante 5 minutos), y después se recuperó el sobrenadante (54 ml). Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó adicionalmente (3000 rpm, durante 5 minutos) y después se recuperó el sobrenadante y se secó a presión reducida, para obtener de esta manera cristales de la forma diol. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Ejemplo comparativo 4

El líquido de cultivo 1 (20 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa ATCC20624 se centrifugó (3000 rpm, durante 5 minutos), y después se recuperó el precipitado y se mezcló con acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (60 ml). Posteriormente, este líquido mezcla se centrifugó adicionalmente (3000 rpm, durante 5 minutos), y después se recuperó el sobrenadante y se secó a presión reducida, para obtener de esta manera cristales de la forma diol. Los resultados se presentan en la tabla 1.

[Tabla 1]

	Tamaño de apertura del filtro (μ m)	Pureza de la forma diol (%)	Rendimiento de la forma diol (%)
Ejemplo 1	10	78,4	96,2
Ejemplo 2	40-50	76,6	95,2
Ejemplo 3	75	79,3	96,0

	Tamaño de apertura del filtro (μm)	Pureza de la forma diol (%)	Rendimiento de la forma diol (%)
Ejemplo 4	100	78,9	94,9
Ejemplo comparativo 1	5	Bloqueado	Bloqueado
Ejemplo comparativo 2	150	-	22,3
Ejemplo comparativo 3	-	72,7	95,1
Ejemplo comparativo 4	-	74,6	89,5

De los resultados de la tabla 1, se encontró que se obtiene una forma diol de alta pureza con un buen rendimiento mediante filtración por succión del líquido de cultivo usando un filtro que tiene un tamaño de apertura de 10 a 100 μm , mientras que la forma diol no se puede recuperar debido al bloqueo cuando se usa un filtro que tiene un tamaño de apertura de 5 μm , mientras que el rendimiento de la forma diol se hace malo cuando se usa un filtro que tiene un tamaño de apertura de 150 μm . También se encontró que cuando el líquido de cultivo se extrae directamente con acetato de etilo, la forma diol no se puede separar de esclareol o esclareolido en el líquido de cultivo, y la forma diol no se puede obtener con alta pureza. Además, se encontró que cuando el líquido de cultivo se centrifuga, y después el sobrenadante se elimina y se extrae con acetato de etilo, no solo no se puede obtener la forma diol con alta pureza, sino que también el rendimiento se hace malo.

Ejemplos 5 a 9

El líquido de cultivo 2 (30 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa *Ascomycete* sp. KSM-JL2842, se sometió a filtración por succión con filtros que tienen un tamaño de apertura indicado en la tabla 2, respectivamente. Posteriormente, se repitió el lavado tres veces usando 30 ml de agua destilada (valor SP 23,4). La temperatura en el momento de la filtración y los lavados era temperatura ambiente (20°C). Posteriormente, las tortas resultantes se disolvieron en etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (valor SP 13,0) (30 ml) respectivamente, y las soluciones respectivas se filtraron con un filtro de 0,2 μm . A continuación, los filtrados se secaron a presión reducida, para obtener cristales de la forma diol, respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Ejemplo comparativo 5

El líquido de cultivo 2 (20 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa *Ascomycete* sp. KSM-JL2842 se mezcló con acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (60 ml), la mezcla se centrifugó (3000 rpm, durante 5 minutos), y después se recuperó el sobrenadante (54 ml). Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó adicionalmente (3000 rpm, durante 5 minutos) y después se recuperó el sobrenadante y se secó a presión reducida, para obtener de esta manera cristales de la forma diol. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Ejemplo comparativo 6

El líquido de cultivo 2 (20 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa *Ascomycete* sp. KSM-JL2842 se centrifugó (3000 rpm, durante 5 minutos), y después se recuperó el precipitado y se mezcló con acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (60 ml). Posteriormente, este líquido mezcla se centrifugó adicionalmente (3000 rpm, durante 5 minutos), y después se recuperó el sobrenadante y se secó a presión reducida, para obtener de esta manera cristales de la forma diol. Los resultados se presentan en la tabla 2.

[Tabla 2]

	Tamaño de apertura del filtro (μm)	Pureza de la forma diol (%)	Rendimiento de la forma diol (%)
Ejemplo 5	10	95,5	95,1
Ejemplo 6	20	96,2	93,2
Ejemplo 7	40	95,9	93,4
Ejemplo 8	75	96,6	91,9
Ejemplo 9	100	96,2	92,5
Ejemplo comparativo 5	-	92,2	90,9
Ejemplo comparativo 6	-	93,5	79,3

De los resultados dados anteriormente, se encontró que cuando el líquido de cultivo se filtra usando un filtro que tiene un tamaño de apertura de 10 a 100 μm y se lava con agua, y después la torta resultante se disuelve en etanol y después se filtra a través de un filtro, se obtiene una forma diol de alta pureza con un buen rendimiento.

Ejemplo 10

El líquido de cultivo 2 (30 ml) obtenido por conversión microbiana usando la cepa *Ascomycete* sp. KSM-JL2842, se sometió a filtración por succión con un filtro que tiene un tamaño de apertura de 10 µm. Posteriormente, se repitió el lavado tres veces usando 30 ml de una solución acuosa de etanol al 20% (valor SP 21,3). La temperatura en el momento de la filtración y los lavados era temperatura ambiente (20°C). Posteriormente, la torta resultante se disolvió en etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (valor SP 13,0) (30 ml). Esta solución se filtró con un filtro de 0,2 µm, y se secó a presión reducida para obtener de esta manera cristales de la forma diol. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Ejemplo 11

Se obtuvieron cristales de la forma diol de la misma manera que en ejemplo 10, excepto que el lavado se repitió tres veces usando 30 ml de una solución de etanol al 30% (valor SP 20,3), la torta resultante se disolvió en etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (valor SP 13,0) (30 ml), y después la solución se filtró con un filtro de 0,2 µm.

Ejemplos comparativos 7 y 8

Se obtuvieron cristales de la forma diol de la misma manera que en ejemplo 10, excepto que el líquido de cultivo se filtró por succión con filtros que tenían un tamaño de apertura como se indica en el tabla 3, respectivamente, y se lavó usando 30 ml de una solución acuosa de etanol al 40% (valor SP 19,3). Los resultados se presentan en la tabla 3.

[Tabla 3]

	Tamaño de apertura del filtro (µm)	Concentración de etanol (%) (valor SP)	Pureza de la forma diol (%)	Rendimiento de la forma diol (%)
Ejemplo 10	10	20 (21,3)	97,0	90,6
Ejemplo 11	10	30 (20,3)	97,3	90,7
Ejemplo comparativo 7	20	40 (19,3)	96,7	73,2
Ejemplo comparativo 8	40	40 (19,3)	97,4	62,8

De los resultados de la tabla 3, se encontró que la forma diol solo se puede separar y purificar lavando con un solvente que tiene un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 (cal/cm³)^{1/2}, mientras que si se realiza el lavado usando un solvente que tiene un valor SP en el intervalo de 8,3 a 20 (cal/cm³)^{1/2}, la forma diol también se disuelve junto con esclareol y esclareolido, y no se puede obtener una forma diol con alta pureza con un buen rendimiento.

Ejemplo 12

El líquido de cultivo 3 (200 ml) obtenido por conversión microbiana usando *Ascomycete* sp. KSM-JL2842, se sometió a filtración por succión a través de un filtro de malla 400 (34 µm), y después el lavo se repitió seis veces usando 200 ml de agua destilada (valor SP 23,4). La temperatura en el momento de la filtración y el lavado era temperatura ambiente (20°C). Los resultados se presentan en la tabla 4 y la figura 1.

Ejemplo comparativo 9

El líquido de cultivo 3 (100 ml) obtenido por conversión microbiana usando *Ascomycete* sp. KSM-JL2842, que es la misma cepa que la usada en el ejemplo 12, se mezcló con acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., reactivo de grado especial) (150 ml), y la capa de acetato de etilo (145 ml) se recuperó. Posteriormente, la capa de acetato de etilo se filtró con un filtro de 0,2 µm, y el filtrado se recuperó y se secó a presión reducida, para obtener cristales de la forma diol. La temperatura en el momento de la filtración era temperatura ambiente (20°C). Los resultados se presentan en la tabla 4 y la figura 1.

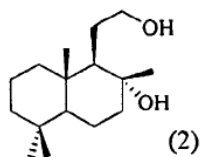
[Tabla 4]

	Forma diol (%)	Esclareolido (%)	Esclareol (%)
Líquido de cultivo 3	87,9	10,1	2,0
Ejemplo 12 (después de la filtración)	89,9	8,7	1,4
Ejemplo 12 (después del lavado con agua)	99,2	0,3	0,5
Ejemplo comparativo 9 (método de extracción con acetato de etilo)	88,9	8,8	2,3

De los resultados de la tabla 4, se encontró que la pureza de la forma diol aumenta cuando la purificación se realiza según el método de la presente invención, comparado con la purificación según un método de extracción con acetato de etilo.

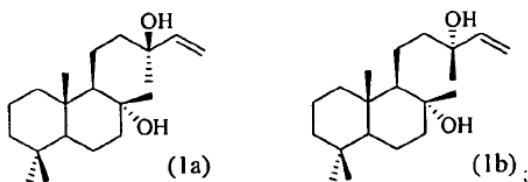
REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol representado por la fórmula (2):



en donde el método comprende

cultivar un microorganismo usando un medio que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula (1a) y/o fórmula (1b) como sustrato:



filtrar el líquido de cultivo a través de un filtro que tiene un tamaño de apertura de 10 a 100 μm ;

lavar el residuo en el filtro con agua o un solvente que tenga un valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$, obteniéndose de esta manera una torta; posteriormente

disolver la torta obtenida en un solvente que tiene un valor SP de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$, obteniéndose de esta manera una solución;

filtrar o centrifugar la solución; y

secar el filtrado o sobrenadante resultante.

2. El método para producción según la reivindicación 1, en donde el solvente que tiene valor SP fuera del intervalo de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ es hexano, ciclohexano, una solución acuosa de etanol al 30% o menor, o agua, y el solvente que tiene un valor SP de 8,3 a 20 $(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}$ es etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, ácido acético, tolueno, acetato de etilo, 1-pentanol, acetona o dietilenglicol.
3. El método para producción según la reivindicación 1 o 2, en donde el líquido de cultivo es un líquido de cultivo que contiene el compuesto representado por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b), 3a,6,6,9a-tetrametildecahidronafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona, y 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol representado por la fórmula (2).

Fig. 1

