

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 844**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2010 E 10743529 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2400025**

54 Título: **Procedimiento de producción de un producto de fermentación microbiana**

30 Prioridad:

20.02.2009 JP 2009038133

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

20.02.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAMADA, SAKI;
KOYAMA, SHINGO;
ONOZUKA, KAZUHIRO y
WATANABE, TAKAAKI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 443 844 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 un producto de fermentación microbiana.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol, que es útil como un intermedio para la producción de 3a,6,6,9a-tetrametildodecahidronafto[2,1-b]furano.

Antecedentes de la invención

10 El 3a,6,6,9a-tetrametildodecahidronafto[2,1-b]furano (en adelante, indicado como "compuesto A") es un componente de fragancia que está contenido en el ámbar gris, que es una secreción patológica producida en el cuerpo del cachalote, y es un compuesto importante, indispensable como un perfume basado en ámbar. El compuesto A se produce principalmente mediante un procedimiento de síntesis química usando esclareol, que se extrae del almaro (*Salvia sclarea* L.), como material de partida. Como un intermedio del compuesto A, se conocen 3a,6,6,9a-tetrametildecahidronafto[2,1-b] furan-2(1H)-ona (en adelante, en la presente memoria, indicado como "esclareólido") y 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol (en adelante, en la presente memoria, indicado como "diol").

15 Sin embargo, el procedimiento de síntesis química descrito anteriormente tiene un problema en el sentido de que la carga ambiental del procedimiento es elevada, y el rendimiento o la pureza no pueden obtenerse suficientemente.

Mientras, se ha informado acerca de procedimientos de producción del compuesto A obteniendo un intermedio del compuesto A a partir de esclareol mediante conversión microbiana y ciclización del intermedio (por ejemplo, los documentos de patente 1 y 2). Específicamente, en los documentos de patente 1 y 2, la separación y la purificación del diol obtenido mediante conversión microbiana son llevadas a cabo sometiendo un fluido de cultivo a extracción con disolvente usando acetato de etilo, posteriormente secando el extracto obtenido del mismo, disolviendo el extracto en hexano/acetato de etilo o hexano/cloroformo caliente, y cristalizando el diol a partir de la solución.

20

Además, con respecto a la separación y la purificación del diol obtenido a partir de esclareol mediante conversión microbiana, se ha informado acerca de un procedimiento de filtración de un fluido de cultivo usando un filtro que tiene un tamaño de malla de un intervalo específico para separar las células bacterianas, disolviendo posteriormente las células bacterianas en un disolvente que tiene un valor SP de 8,3 a 20, y filtrando la solución de nuevo (documento de patente 3).

25

Documentos de la técnica anterior**Documentos de patente**

30 Documento de Patente 1: JP-A-3-224478

Documento de Patente 2: JP-A-62-74281

Documento de Patente 3: JP-A-2008-212087

35 El documento EP- A- 0 419 026 se refiere a un procedimiento y a medios de producción de diol y de lactona, tales como 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol. Los medios comprenden un microorganismo seleccionado de entre el grupo que consiste en (i) *Cryptococcus albidus* (Saito [Skinner var. *albidus*], ATCC 20918; (ii) *Bensingtonia ciliata*, ATCC 20919; (iii) *Cryptococcus laurentii*, ATCC 20920; y (iv) *Cryptococcus albidus*, ATCC 20921 o mezclas de dos o más de los mismos.

40 El documento EP-A-2 123 765 se refiere a un procedimiento de producción de 1-(2-hidroxietil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol que comprende un cultivo y una etapa de purificación. El fluido de cultivo obtenido después del cultivo se filtra, el residuo se lava con agua o un disolvente que tiene un valor SP específico, la torta obtenida se disuelve en un disolvente que tiene un valor SP particular y, finalmente, la solución se filtra o centrifuga.

45 El documento WO-A-02/072110 da a conocer un procedimiento de producción de un compuesto de poliol (caloporosido) que comprende un cultivo y una etapa de purificación. Después del cultivo, el cultivo microbiano se liofiliza, a continuación, se extrae con un disolvente orgánico miscible en agua, tal como metanol o propanol, posteriormente se filtra para eliminar los residuos y se separa mediante cromatografía en columna.

El documento JP-A-4 282 319 da a conocer un procedimiento en el que un producto de cultivo a partir de células cultivadas de líquenes se seca mediante congelación y se extrae con un disolvente polar a una temperatura baja.

El documento WO-A-01/09074 se refiere a un procedimiento de recuperación de un ácido orgánico a partir de un caldo

de fermentación que comprende el secado del caldo de fermentación para obtener un producto seco, la adición del producto seco a un alcohol inferior en presencia de un ácido y, a continuación, la eliminación del material insoluble para obtener un ácido orgánico.

Sumario de la invención

5 Problema a resolver por la invención

Sin embargo, se conoce que los productos de cristalización del diol obtenido mediante procedimientos de extracción con disolventes usando acetato de etilo o similares, tal como se ha descrito anteriormente, tienen una alta intensidad de olor anormal. Particularmente, debido a que un olor del cultivo causado por el microorganismo es extraído por el disolvente, incluso si el diol se obtiene mediante cristalización, se necesitan además diversos procedimientos de purificación para reducir el olor del cultivo. De esta manera, se encontró que el procedimiento de producción se complica mucho. Además, el procedimiento de separación de las células bacterianas con un filtro, disolviendo las células bacterianas en un disolvente particular, y filtrando la solución, requiere dos filtraciones, y este procedimiento implica también una etapa de producción complicada.

Por otro lado, a pesar de que la intensidad de olor anormal podría ser disminuida, si la tasa de recuperación del propio diol es demasiado baja, la eficiencia de producción del diol disminuye, y el diol no puede ser producido, de manera eficiente, con alta pureza.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento que es capaz de producir eficientemente el diol con una baja intensidad de olor anormal y alta pureza.

Medios para resolver el problema

Convencionalmente, en el caso en el que sustancias útiles que son escasamente solubles en agua o hidrófobas se producen fuera de las células bacterianas, se añade un disolvente hidrófobo a un fluido de cultivo que contiene las sustancias útiles, y la recuperación de las sustancias útiles se lleva a cabo mediante clasificación o extracción en vista de la eficiencia de la operación. Sin embargo, en la práctica, cuando el diol se produce mediante conversión microbiana, tal como se ha descrito anteriormente, el fluido de cultivo contiene esclareol o esclareolido sin reaccionar, microorganismos, componentes del medio y similares presentes en una mezcla, además del diol. Por lo tanto, los componentes distintos del diol se recuperan también al mismo tiempo durante la clasificación o la extracción, y el diol obtenido de esta manera tiene una alta intensidad de olor anormal o un alto grado de coloración.

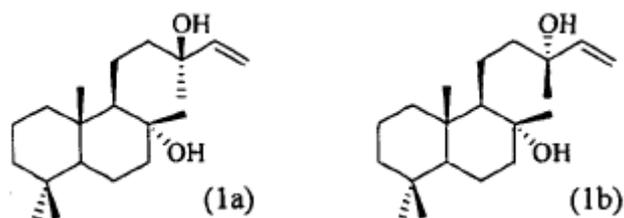
De esta manera, los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación exhaustiva del procedimiento de producción de diol. En consecuencia, los presentes inventores encontraron que cuando un fluido de cultivo que contiene el diol es secado antes de ser puesto en contacto con un disolvente para obtener un producto seco del fluido de cultivo, posteriormente el producto seco se pone en contacto con un disolvente tal que el valor SP del medio obtenible después del contacto del producto seco y el disolvente se regula a un intervalo específico, posteriormente las células bacterianas se retiran, y se lleva a cabo una cristalización; el diol se puede ser obtenido con alto rendimiento. Los presentes inventores han encontrado también que el diol obtenido de esta manera tiene un menor nivel de olor o coloración del cultivo derivado de microbios, de manera que pueden reducirse los procedimientos subsiguientes, tales como la desodorización o repurificación.

Es decir, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de 1-(2-hidroxiethyl)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol representado por la fórmula (2):



45 en el que el procedimiento comprende cultivar un microorganismo usando un medio que contienen un compuesto o unos compuestos representados por la fórmula (1a) y/o (1b)

5



10

como un sustrato, secar el fluido de cultivo que contiene diol, de manera que el contenido de humedad en el producto seco del fluido de cultivo sea del 0,01% al 20%, añadir un disolvente al producto seco del fluido de cultivo, de manera que el valor SP del medio sea ajustado para que esté comprendido entre 9,5 y 16 [(cal/cm³)^{1/2}], obteniendo, de esta manera, una dispersión, y posteriormente retirar el microorganismo de la dispersión y cristalizar el diol.

Efectos de la invención

Según la presente invención, el diol, que es útil como un intermedio para la producción del compuesto A, puede ser producido eficazmente como un producto de alta calidad que tiene un olor y un tono de color excelentes.

Modos de llevar a cabo la invención

15 En la presente invención, el microorganismo que puede ser utilizado en la conversión microbiana no está particularmente limitado, siempre que sea un microorganismo que tenga la capacidad de producir el diol que es un intermedio del compuesto A, usando el compuesto o los compuestos representados por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b) como un sustrato, y se capaz de sacar el diol fuera de las células bacterianas. Por ejemplo, pueden mencionarse los microorganismos que pertenecen a la clase de los Ascomycetes, microorganismos que pertenecen al género *Cryptococcus*, los microorganismos que pertenecen a la clase Basidiomycetes, los microorganismos que pertenecen al género *Hyphozyma* y similares. Entre estos, se prefieren los microorganismos que pertenecen a la clase Ascomycetes y los microorganismos que pertenecen al género *Hyphozyma*, desde el punto de vista de la eficiencia de la producción para el diol, que es un intermedio del compuesto A. Un ejemplo de los microorganismos que pertenecen a la clase Ascomycetes puede incluir un microorganismo designado como Ascomycete sp. KSM-JL2842 y depositado ante el
20 International Patent Organism Depository en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (dirección: Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken) el 12 de Enero de 2006, bajo el N° de acceso FERM BP-10713. Un ejemplo de los microorganismos que pertenecen al género *Hyfozomya* puede incluir la cepa ATCC20624 descrita en la patente japonesa N° 2547713.

30 El microorganismo que puede ser utilizado en la conversión microbiana puede ser aislado del suelo evaluando la capacidad del microorganismo para producir el diol, que es un intermedio del compuesto A, como un indicador. La capacidad de producir el diol, que es un intermedio del compuesto A, puede ser evaluada mediante el cultivo de un microorganismo de ensayo en un medio de cultivo que contiene el compuesto o los compuestos representados por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b), y detectando el diol, que es un intermedio del compuesto A, contenido en el medio. La detección del diol, que es un intermedio del compuesto A, puede realizarse usando procedimientos de análisis conocidos convencionalmente, tales como cromatografía de gases (GC), cromatografía de gas-líquido (GLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectroscopia infrarroja (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN).

40 No hay limitaciones particulares impuestas sobre las condiciones de cultivo tras la conversión microbiana, y puede usarse un medio de cualquier composición siempre y cuando el medio contenga el compuesto o los compuestos representados por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b) y permita el crecimiento del microorganismo. Los ejemplos de medios que pueden ser usados incluyen medios sólidos y líquidos, que contienen, respectivamente, 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 tales como cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de cinc y carbonato de calcio; vitaminas y similares. Además, el medio puede contener también un tensioactivo o un agente antiespumante, según las condiciones de cultivo y similares.

50 No hay limitaciones particulares acerca del intervalo óptimo de pH y el intervalo óptimo de temperatura en términos de las condiciones de cultivo. El intervalo de pH óptimo es preferentemente un pH de 3 a 8, más preferentemente un pH de 4 a 8 y, aún más preferentemente, un pH de 5 a 7, y la temperatura óptima como la temperatura del fluido es de 10°C a 35°C, más preferentemente de 15°C a 30°C y, aún más preferentemente de 20°C a 30°C. La duración del cultivo no está particularmente limitada y, preferentemente, es de 1 a 10 días desde la adición del sustrato. El cultivo puede realizarse usando cultivo en agitación, cultivo aeróbico, cultivo agitado, cultivo anaeróbico, cultivo estático y

cultivo usando un lecho de fermentación, así como una reacción de célula en reposo y una reacción celular inmovilizada.

La concentración del compuesto o los compuestos representados por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b), que se añaden al medio como un sustrato, se establece preferentemente a entre el 0,1% y el 50% en masa (en adelante, en la presente memoria, descrito simplemente como "%") en el medio, desde el punto de vista de la eficiencia de la producción para el diol, que es un intermedio del compuesto A. El sustrato puede ser añadido al medio antes del cultivo o puede ser añadido en el medio del cultivo.

Según la presente invención, en primer lugar, se obtiene un fluido de cultivo que contiene el diol representado por la fórmula (2), que ha sido producido extracelularmente usando el compuesto o los compuestos representados por la fórmula (1a) y/o la fórmula (1b) como un sustrato y usando el microorganismo. Además, el fluido de cultivo obtenido mediante conversión microbiana se seca, y se obtiene un producto seco del fluido de cultivo. Después de eso, se añade un disolvente al producto seco del fluido de cultivo obtenido de esta manera, y el valor SP del medio obtenible después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente se ajusta al intervalo de 9,5 a 16 $[(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}]$ (en adelante, en la presente memoria, la unidad no se describirá). Cuando el valor SP del medio obtenible después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente se ajusta a preferentemente a entre 9,5 y 14,5, más preferentemente entre 11 y 14, y aún más preferentemente entre 12 y 13,5, es ventajoso desde los puntos de vista de mejorar la solubilidad del diol, la relación de recuperación (rendimiento) del diol, y el olor o color del diol producido. Aquí, el medio contiene el disolvente que se usa y la humedad contenida en el producto seco del fluido de cultivo. Además, el valor SP representa el parámetro de solubilidad, y los valores de SP se describen, por ejemplo, en "Fundamentals and Applications of SP Values and Calculation Methods" (Johokiko Co., Ltd., 2005), Polymer Handbook Tercera Edición (A Wiley-Interscience Publication, 1989), y similares. Además, para los disolventes cuyos valores específicos del valor SP no se describen en el documento anterior, los valores SP pueden ser determinados usando el procedimiento Fedors descrito, por ejemplo, en "Fundamentals and Applications of SP Values and Calculation Methods", Polymer Engineering and Science, Vol. 14, No. 2, 147-154 (1974), y similares. En el caso de usar disolventes plurales en combinación, el valor SP se determina calculando un valor promedio en volumen de los valores de los disolventes respectivos. Además, debido a que el medio obtenible después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente contiene el disolvente usado y la humedad procedente del producto seco del fluido de cultivo, el valor SP del medio puede ser determinado, de manera similar, calculando un valor medio en volumen a partir del disolvente cuyos valores SP son conocidos y la cantidad de humedad en el producto seco del fluido de cultivo.

No hay limitaciones particulares sobre los medios para secar el fluido de cultivo obtenible mediante conversión microbiana, siempre y cuando los medios de secado sean capaces de reducir el contenido de humedad en el fluido de cultivo, y los ejemplos de los medios de secado incluyen secado mediante pulverización, secado por aire caliente, secado a temperatura ambiente (de 10°C a 40°C), secado por conducción de calor, secado fluidizado, secado en tambor rotatorio, secado por congelación, secado instantáneo, secado bajo presión reducida y similares. Entre éstos, el secado mediante pulverización, el secado con aire caliente o a temperatura ambiente y el secado en tambor giratorio son preferentes desde los puntos de vista de reducir el olor y la coloración del cultivo derivados de los microbios, y el secado mediante pulverización, el secado por aire caliente y el secado en tambor giratorio son más preferentes y el secado mediante pulverización es aún más preferente desde el punto de vista de acortar el tiempo de secado.

Preferentemente, la temperatura de secado en el momento del calentamiento es de 40°C a 150°C, desde los puntos de vista de acortar el tiempo de secado y prevenir el empeoramiento del olor. En el caso de secado mediante pulverización, la temperatura de secado es, más preferentemente, de 50°C a 140°C y, aún más preferentemente, de 60°C a 130°C, desde los puntos de vista de acortar el tiempo de secado y prevenir el empeoramiento del olor. En el caso de medios de secado distintos del secado mediante pulverización, más preferentemente, la temperatura de secado es de 40°C a 120°C, incluso más preferentemente, de 50°C a 100°C y, aún más preferentemente, de 60°C a 80°C.

Preferentemente, el contenido de humedad en el producto seco del fluido de cultivo es del 0,01% al 20%, y desde el punto de vista de la solubilidad del diol y los puntos de vista de la tasa de recuperación (rendimiento) del diol y la reducción del olor y la coloración del cultivo derivados de los microbios, es ventajoso ajustar el contenido de humedad a, más preferentemente, entre el 0,05% y el 10%, incluso más preferentemente, entre el 0,1% y el 5% y, aún más preferentemente, entre el 0,15% y el 3%. El contenido de humedad puede ser ajustado secando el fluido de cultivo, pero también es aceptable ajustar adicionalmente el contenido de humedad del producto seco añadiendo una cantidad apropiada de agua después del secado.

Posteriormente, el producto seco del fluido de cultivo se pone en contacto con el disolvente mediante mezclado o similar para ser suspendido en el disolvente, y el diol se disuelve en el disolvente. En cuanto al fluido de cultivo o el producto seco de fluido de cultivo, desde el punto de vista de la supresión de la incorporación de impurezas que están presentes dentro de las células bacterianas al disolvente, y mejorando, de esta manera, el olor y el tono de color del diol producido de esta manera, es preferente que el microorganismo no sea sometido a un tratamiento físico, tal como

trituration o molienda, un tratamiento químico, tal como un tratamiento con agente tensioactivo, un tratamiento bioquímico, tal como una enzima lítica, o similares, antes de que el fluido de cultivo o el producto seco del fluido de cultivo sea puesto en contacto con el disolvente.

5 Los ejemplos del disolvente que es puesto en contacto con el producto seco del fluido de cultivo 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); dietilenglicol (valor SP 14,6); acetona (valor SP 9,9) y similares.

10 Preferentemente, estos disolventes se usan individualmente o en una combinación de dos o más tipos, con las cantidades ajustadas de manera apropiada, de manera que el valor SP del medio obtenible después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente esté comprendido en el intervalo descrito anteriormente.

15 Entre éstos, desde el punto de vista de la tasa de recuperación (rendimiento) del diol, o desde los puntos de vista de mejorar la pureza y mejorar el olor o el tono de color, es preferente usar un disolvente que tenga un valor SP de 9,5 a 16, más preferentemente, un disolvente que tenga un valor SP de 11 a 14 e, incluso más preferentemente, un disolvente que tenga un valor SP de 12 a 13 y, más preferentemente, es ventajoso el uso de 2-propanol, etanol o soluciones acuosas respectivas de estos alcoholes y, aún más preferentemente, etanol o una solución acuosa de etanol. Preferentemente, la concentración de etanol en la solución acuosa de etanol es del 70% o superior desde el punto de vista de la solubilidad del diol y, más preferentemente, la concentración de etanol es del 85% al 99,5%, incluso más preferentemente, del 90% al 99,5%, incluso más preferentemente, del 95% al 99,5% y, aún más preferentemente, del 99% al 99,5%.

20 Preferentemente, el medio dentro del sistema después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente es tal que no se produce una separación de fases del agua, desde el punto de vista de que no se necesita un procedimiento para separar una fase de disolvente y una fase acuosa. En el caso de usar un disolvente no soluble en agua que no tiene compatibilidad con el agua, es preferente prevenir la separación de fases del disolvente y el agua usando otro disolvente en combinación.

25 Según la presente invención, es preferente establecer apropiadamente la cantidad de uso del disolvente según el valor SP del disolvente usado, de manera que el valor SP del medio obtenible después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente esté comprendido en el intervalo descrito anteriormente. Sin embargo, desde los puntos de vista de la solubilidad del diol, la mejora del olor y el tono de color del diol producido, y la tasa de recuperación (rendimiento) del diol, la cantidad de uso del disolvente en base a 100 g del producto seco del fluido de cultivo es preferentemente de 60 a 6.000 ml y más preferentemente de 180 a 600 ml. Además, la cantidad de uso del disolvente en base a 1 g del diol presente en el producto de secado del fluido de cultivo es preferentemente de 1 a 100 ml, más preferentemente de 2 a 50 ml, aún más preferentemente de 2 a 25 ml y, aún más preferentemente, de 3 a 10 ml.

35 La temperatura del medio obtenible después del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente es preferentemente de 0°C a 80°C y, más preferentemente, de 20°C a 60°C. En este momento, el tiempo de contacto es preferentemente de 1 a 60 minutos y más preferentemente de 1 a 45 minutos, y desde el punto de vista de la solubilidad del diol y desde el punto de vista de la mejora del olor y el tono de color del diol producido, el tiempo de contacto es, aún más preferentemente, de 5 a 30 minutos.

40 Posteriormente, el microorganismo se elimina de la dispersión resultante del contacto del producto seco del fluido de cultivo con el disolvente. Los ejemplos de los medios para eliminar el microorganismo incluyen filtración, centrifugación o similares.

45 La centrifugación se realiza usando una centrífuga general, tal como una centrífuga de tipo placa de separación, una centrífuga de tipo cilindro o una centrífuga de tipo decantador, y es preferente realizar el fraccionamiento del sobrenadante después del tratamiento. Para las condiciones de centrifugación, la temperatura es preferentemente de 5°C a 60°C, y más preferentemente de 20°C a 30°C y, por ejemplo, en el caso de una centrífuga tipo de cilindro, la velocidad de rotación es preferentemente de 2.000 a 12.000 r/min, más preferentemente de 3.000 a 12.000 r/min, e incluso más preferentemente de 5.000 a 12.000 r/min. En este momento, el tiempo es preferentemente de 1 a 30 minutos, más preferentemente de 2 a 10 minutos, y aún más preferentemente de 5 a 10 minutos.

50 La filtración se realiza mediante un procedimiento general tal como filtración por succión, filtración a presión, filtración centrífuga o filtración natural y el filtrado obtenido después del tratamiento puede ser fraccionado. Entre estos procedimientos, es preferente la filtración por succión. El tamaño de malla del filtro usado en la filtración es preferentemente de 0,1 a 10 µm, y más preferentemente de 0,2 a 1 µm, desde los puntos de vista de la tasa de recuperación del diol y mejora de la pureza. El material del filtro no está particularmente limitado, y los ejemplos específicos incluyen filtros realizados con resinas, tales como polipropileno, poliéster y nylon; filtros realizados en cerámica, filtros realizados en metal, filtros de celulosa y similares.

55

Según la presente invención, puede obtenerse un diol que tiene alta pureza y olor y tono de color satisfactorios con alto rendimiento, realizando la cristalización a partir del filtrado o el sobrenadante obtenido tal como se ha descrito anteriormente.

No hay limitaciones particulares para el procedimiento de cristalización.

- 5 Por ejemplo, es preferente un procedimiento en el que se somete el filtrado o sobrenadante obtenido, tal como se ha descrito anteriormente, a una operación de eliminación de impurezas, tal como filtración de carbón activado o filtración de precisión según sea necesario y, a continuación, se precipitan los cristales de diol mediante enfriamiento, concentración, adición de un disolvente pobre o similar. También hay disponible un procedimiento de secado del filtrado o sobrenadante obtenido, tal como se ha descrito anteriormente, disolviendo posteriormente el producto seco en un disolvente orgánico, y precipitando cristales del diol mediante enfriamiento, concentración, adición de un disolvente pobre, o similares. Los cristales obtenidos de esta manera pueden purificarse mediante recristalización.

- 10 Específicamente, los cristales se obtienen preferentemente de manera que la temperatura del filtrado o sobrenadante obtenido tal como se ha descrito anteriormente o del disolvente orgánico en el que se disuelven los cristales precipitados del diol se eleva a preferentemente entre 20°C y 80°C, y más preferentemente entre 40°C y 70°C, el líquido resultante se concentra (el disolvente se separa por destilación) según sea necesario y, a continuación, preferentemente, los cristales se precipitan permitiendo que el resultado se enfríe a temperatura ambiente o añadiendo un disolvente pobre, tal como agua. Además, no es necesario elevar la temperatura y enfriar a una velocidad constante, y una vez que los cristales comienzan a precipitarse, es preferente mantener la temperatura durante un tiempo.

- 15 También, con el fin de separar los cristales del disolvente orgánico, es preferente realizar la filtración, centrifugación o similar mediante los mismos medios que los procedimientos que se usan para eliminar el microorganismo, obtener una torta de filtro y lavar apropiadamente la torta con un disolvente orgánico. Al secar la torta obtenida de esta manera, puede obtenerse un diol que tiene un olor anormal reducido.

- 20 Los ejemplos del disolvente orgánico usado en la cristalización incluyen alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, tales como metanol, etanol e isopropanol; y disolventes orgánicos tales como acetona, tetrahidrofurano, acetato de etilo y acetonitrilo. Entre éstos, son preferentes los alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, y el metanol, etanol e isopropanol son más preferentes, siendo el etanol aún más preferente.

Estos disolventes orgánicos pueden usarse solos, o pueden usarse dos o más tipos en una mezcla.

En el caso de añadir un disolvente pobre, es preferente usar agua.

- 25 Preferentemente, la cantidad de uso de agua es de 0,5 a 10 partes en volumen y, más preferentemente, de 1 a 5 partes en volumen, con relación a 1 parte en volumen del disolvente orgánico que se usa para disolver el diol. La concentración del diol en el disolvente orgánico en este momento es, preferentemente, de 10 a 1000 g/l y, más preferentemente, de 20 a 500 g/l, y la temperatura del líquido en el momento de la precipitación es preferentemente de 0°C a 60°C y, más preferentemente, de 0°C a 30°C.

- 30 Con respecto al disolvente orgánico para lavar la torta de filtro, es preferente usar un disolvente que tenga un valor SP de 9 o inferior, desde los puntos de vista de mejorar el olor y el tono de color del diol producido y la tasa de recuperación. Preferentemente, la cantidad de disolvente se ajusta a entre 50 y 300 ml con relación a 100 g de la torta, desde el punto de vista de mejora de la pureza del diol. Además, la temperatura del disolvente usado en el lavado se establece, preferentemente, a 10°C o menos.

- 35 Cuando el producto de cristalización se seca, se pueden usar los mismos medios de secado que los de los procedimientos que se usan para obtener el producto seco del fluido de cultivo, y la temperatura de secado en el momento del calentamiento está comprendida, preferentemente, entre la temperatura ambiente y 90°C.

- 40 Según la presente invención, es ventajoso desde el punto de vista de la eficacia de producción que la tasa de recuperación (rendimiento) del diol obtenido después de la cristalización del filtrado o sobrenadante obtenido tal como se ha descrito sea, preferentemente, del 60% o mayor, más preferentemente, del 65% o mayor e, incluso más preferentemente, del 70% o mayor.

- 45 El procedimiento para producir el diol de la presente invención puede mejorar la eficiencia de producción del diol ya que las etapas de purificación para la reducción del olor anormal o para la reducción de la coloración pueden simplificarse debido a que el diol obtenido mediante el procedimiento de la presente invención es de alta calidad con baja intensidad de olor anormal o un bajo grado de coloración y, al mismo tiempo, debido a que la tasa de recuperación de dicho diol de alta calidad es también alta. Además, el procedimiento de producción de diol de la presente invención es preferente en términos de eficacia de producción ya que un tratamiento previo antes de la extracción puede ser omitido debido a que el fluido de cultivo obtenible en el procedimiento de producción se seca, y debido a que el tiempo de

extracción puede ser acortado, mientras que la cantidad del disolvente usado para la extracción puede ser reducida.

El diol obtenido de esta manera se convierte al compuesto A mediante desodorización y ciclización en diversos disolventes, usando un catalizador ácido, por ejemplo, ácido p-toluenosulfónico, cloruro de ácido p-toluenosulfónico, una cantidad catalítica de ácido sulfúrico, o un intercambiador de iones ácidos.

5 Ejemplo

En adelante, en la presente memoria, la presente invención se describirá en detalle por medio de Ejemplos, pero la presente invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

[Conversión microbiana 1]

10 Un asa de platino de la cepa *Hypozyma roseoniger* ATCC20624 (en adelante, en la presente memoria, denominado también "ATCC") se inoculó en 2,1% de caldo YM, y se sometió a cultivo en agitación a 25°C durante tres días. El resultado se usó como inóculo. Posteriormente, el 0,3% de inóculo se inoculó en un medio que contenía 2,1% de caldo YM y 0,1% de sulfato de magnesio, y el cultivo agitado aireado se realizó en un fermentador de 30 l a una temperatura del líquido de 24°C, una cantidad de aireación de 0,5 vvm, y una velocidad de agitación de 200 r/min durante tres días. 15 A continuación, se añadió un sustrato que incluía 10% de Tween 80 (marca comercial) y 20% de esclareol al cultivo, para obtener una concentración final de esclareol en el fluido de cultivo del 2%. Durante 4 días desde la adición del sustrato, se realizó un cultivo agitado aireado mientras el pH se reguló a 6,0 usando NaOH 1N y HCl 1 N. El fluido de cultivo resultante se indicó como fluido de cultivo 1. Este fluido de cultivo 1 contenía 1,9% del diol, 0,1% de esclareol, 97,4% de agua y 0,6% de otros sólidos (células bacterianas y similares).

[Conversión microbiana 2]

20 Se realizó la misma operación que la realizada en la conversión microbiana 1, excepto que el microorganismo utilizado fue Ascomicete sp. cepa KSM-JL2842 (FERM BP-10713) (en adelante, en la presente memoria, conocida también como "KSM") y, de esta manera, se obtuvo un fluido de cultivo 2. El fluido de cultivo 2 contenía 1,5% del diol, 0,3% de esclareol, 97,2% de agua y 1,0% de otros sólidos (células bacterianas y similares).

[Procedimientos de análisis]

25 Se extrajeron esclareol, esclareólido y el diol del fluido de cultivo o un producto seco del mismo, usando acetato de etilo, y se diluyeron apropiadamente. Se realizó un análisis mediante cromatografía de gases (GC) para medir los contenidos. El análisis de GC se realizó con un sistema 6890N GC (Agilent Technologies, Inc.), y las condiciones de análisis fueron las siguientes. Se usó un FID (Flame Ionization Detector, detector de ionización de llama) (Agilent Technologies, Inc.) como un detector, la temperatura de entrada de inyección se estableció a 250°C, y el procedimiento 30 de inyección se estableció en el modo de división (proporción de división de 100:1). El flujo total era de 200 ml/min, la tasa de flujo de la columna era de 0,4 ml/min, la columna era DB-WAX (Φ0,1 mm x 10 m) (J&W Technology, Ltd.), y la temperatura del horno era de 250°C.

35 La cantidad de agua en el fluido de cultivo se calculó a partir de la cantidad de reducción de la masa después de que el fluido de cultivo se secó durante 2 horas usando una secadora eléctrica a 120°C. Además, el contenido de humedad en el producto seco se midió usando un medidor de contenido de humedad Hiranuma, AQ-7 (Hiranuma Sangyo Corp.).

[Procedimiento para la evaluación de olor]

La evaluación del olor de los cristales del diol fue realizada por ocho panelistas según los criterios mostrados a continuación, y el valor promedio fue designado como el valor de evaluación del olor.

5: Permanece un fuerte olor del fluido de cultivo microbiano.

40 4: Permanece un olor ligeramente fuerte del fluido de cultivo microbiano.

3: El olor del fluido de cultivo microbiano es débil.

2: El olor del fluido de cultivo microbiano es insignificante.

1: No hay olor del fluido de cultivo microbiano.

[Procedimiento de evaluación del color del líquido de extracto]

45 La evaluación del color del líquido de extracto de diol se realizó de manera que el diol se disolvió en un disolvente, el microorganismo se eliminó mediante centrifugación, la absorbancia del sobrenadante obtenido de esta manera se midió a una longitud de onda de 420 nm, y el valor de color se calculó dividiendo la absorbancia por la concentración

(g/l) del diol. Un valor más pequeño resultó en un tono de color más satisfactorio.

[Procedimiento de evaluación del color de los cristales]

5 El color de los cristales del diol se midió usando un colorímetro de medición de color de tipo ZE-2000 (Nippon Denshoku Industries Co., Ltd.). Debido a que el valor que representa un tinte amarillento (valor b) era más pequeño, el tono de color era más satisfactorio.

Ejemplo 1

10 El fluido de cultivo 1 se secó mediante pulverización a 130°C y, de esta manera, se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 2%. Se añadieron 5 g del producto seco de fluido de cultivo 1 a 15 ml de etanol (99,5%, valor SP 13,0), y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol.

15 Con el fin de precipitar el diol a partir del filtrado, la concentración del diol en el producto seco del fluido de cultivo y la solubilidad del diol en un disolvente se midieron previamente según los procedimientos de análisis descritos anteriormente, y se determinó la cantidad de agua a añadir para precipitar casi la cantidad total del diol (lo mismo se aplica en los ejemplos siguientes).

Ejemplos 2 y 3

20 El fluido de cultivo 1 se secó mediante pulverización a 130°C, y se obtuvieron dos productos secos que tenían un contenido de humedad del 2%. Se añadió agua a los productos secos respectivos para ajustar el contenido de humedad a entre el 5% y el 10% y, de esta manera, se produjeron productos secos que tenían contenidos de humedad de entre el 5% y el 10%.

25 Se añadieron 5 g del producto seco, que tenían el contenido de humedad ajustado al 5%, a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos fueron retirados del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol (Ejemplo 2).

30 Los cristales del diol se obtuvieron a partir del producto seco que tenía el contenido de humedad ajustado al 10% (5 g), de la misma manera que se ha descrito anteriormente (Ejemplo 3).

Ejemplo 4

35 El fluido de cultivo 1 era aire caliente secado a 80°C con un secador eléctrico y se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 5%. Se añadieron 5 g del producto seco del fluido de cultivo a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron los cristales del diol.

Ejemplo 5

45 El fluido de cultivo 1 se secó a una temperatura ambiente de 25°C y se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 5%. Se añadieron 5 g del producto seco de fluido de cultivo a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron los cristales del diol.

Ejemplos 6 y 7

50 Los cristales del diol se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que el etanol al que se añadió 5 g de producto seco, se cambió a 2-propanol (IPA) (Ejemplo 6). Además, los cristales del diol se obtuvieron de la misma

manera que en el Ejemplo 1, excepto que el etanol se cambió a metanol (Ejemplo 7).

Ejemplo Comparativo 1

5 El fluido de cultivo 1 se centrifugó (5.000 r/min, 5 min), y el sobrenadante se eliminó para obtener el sedimento. El sedimento no se secó y el contenido de humedad era del 58%. Se añadieron 11,9 g del sedimento del fluido de cultivo (equivalente a 5 g de un producto seco) a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron los cristales del diol.

Ejemplo Comparativo 2

10 Los cristales del diol se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que el etanol al que se añadieron 5 g de producto seco se cambió a una solución acuosa de etanol al 65%.

Ejemplo comparativo 3

15 El fluido de cultivo 1 se secó mediante pulverización a 130°C y se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 2%. Se añadieron 5 g del producto seco de fluido de cultivo a 15 ml de tolueno (valor SP 8,9), y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, el filtrado obtenido de esta manera fue tratado de manera que el disolvente se separó mediante destilación a presión reducida a 40°C. La cantidad total del diol se precipitó mediante evaporación y secado y, de esta
20 manera, se obtuvieron cristales del diol.

Los resultados de los Ejemplos 1 a 7 y los Ejemplos Comparativos 1 a 3 se presentan en la Tabla 1.

[Tabla 1]

		Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo Comparativo 1	Ejemplo Comparativo 2	Ejemplo Comparativo 3
Material crudo	Tipo de bacteria	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
	Procedimiento de tratamiento del fluido de cultivo	Pulverización	Pulverización	Pulverización	Secado con aire caliente	Secado a temperatura ambiente	Pulverización	Pulverización	Centrifugación	Pulverización	Pulverización
Procedimiento	Contenido de humedad después del tratamiento del fluido de cultivo	2%	5%	10%	5%	5%	2%	2%	58%	2%	2%
	Disolvente usado	99,5% EtOH	99,5% EtOH	99,5% EtOH	99,5% EtOH	99,5% EtOH	IPA	Metanol	99,5% EtOH	65% EtOH	Tolueno
	Valor SP del medio después del contacto con el fluido de cultivo	13,1	13,2	13,3	13,2	13,2	11,6	14,6	14,7	16,7	8,9
	Procedimiento de cristalización	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Adición de agua	Secado
Evaluación	Tasa de recuperación de diól	74,6%	72,1%	69,1%	60,3%	79,8%	77,0%	79,8%	66,2%	70,7%	12,5%
	Color de líquido de extracto	0,0008	0,0011	0,0018	0,0022	0,0013	0,0002	0,0037	0,0168	0,0059	0,0007
	Color de los cristales	3,71	5,75	6,09	4,90	5,44	7,31	13,61	14,04	15,06	12,05
	Evaluación del olor	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3

Ejemplo 8

El fluido de cultivo 2 se secó mediante pulverización a 130°C y se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 2%. Se añadieron 5 g del producto seco de fluido de cultivo a 15 ml de etanol (valor SP 13,0), y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol.

Ejemplos 9 y 10

El fluido de cultivo 2 se secó mediante pulverización a 130°C, y se obtuvieron dos productos secos que tenían un contenido de humedad del 2%. Se añadió agua a los productos secos respectivos para ajustar el contenido de humedad al 5% y al 10%, y, de esta manera, se produjeron productos secos que tenían contenidos de humedad del 5% y del 10%.

Se añadieron 5 g del producto seco que tenía el contenido de humedad ajustado al 5% a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol (Ejemplo 9).

Los cristales del diol se obtuvieron a partir del producto seco que tenía el contenido de humedad ajustado al 10% (5 g), de la misma manera que la descrita anteriormente (Ejemplo 10).

Ejemplo 11

El fluido de cultivo 2 era aire caliente secado a 80°C con un secador eléctrico, y se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 4%. Se añadieron 5 g del producto seco de fluido de cultivo a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol.

Ejemplo 12

El fluido de cultivo 2 se secó a una temperatura ambiente de 25°C, y se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 4%. Se añadieron 5 g del producto seco de fluido de cultivo a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. La temperatura del líquido en el momento de la precipitación era de 25°C. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol.

Ejemplos Comparativos 4 a 6

El fluido de cultivo 2 se secó mediante pulverización a 130°C y, se obtuvo un producto seco que tenía un contenido de humedad del 2%. Se añadieron respectivamente porciones de 5 g del producto seco del fluido de cultivo a 15 ml de cada uno de los diversos disolventes, tales como tolueno (valor SP 8,9), 65% de etanol (valor SP 16,7) y hexano (valor SP 7,3), y las mezclas se mezclaron durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron de los líquidos mediante centrifugación (5.000 r/min, 5 minutos), y cada uno de los líquidos se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, a partir de cada uno de los filtrados obtenidos de esta manera, el disolvente se separó mediante destilación a presión reducida a 40°C para precipitar toda la cantidad del diol y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol. En el Ejemplo Comparativo 6, debido a que el rendimiento del diol era muy bajo, no se realizó una evaluación del color de los cristales.

Ejemplo Comparativo 7

El fluido de cultivo 2 se centrifugó (5.000 r/min, 5 min), y el sobrenadante se eliminó para obtener un sedimento. El sedimento no se secó, y el contenido de humedad era del 57%. Se añadieron 11,6 g del sedimento del fluido de cultivo (equivalente a 5 g de un producto seco) a 15 ml de etanol, y la mezcla se mezcló durante 10 minutos (temperatura del líquido de 20°C) para disolver el diol. Los microorganismos se retiraron del líquido mediante centrifugación (5.000 r/min,

5 minutos), y el líquido se filtró a través de un filtro de PTFE de 0,2 µm. Posteriormente, se añadieron 30 ml de agua a 11 ml del filtrado obtenido de esta manera para precipitar el diol, y el líquido se filtró a través de un papel de filtro N° 2. Posteriormente, el precipitado se secó a 80°C y, de esta manera, se obtuvieron cristales del diol.

Los resultados de los Ejemplos 8 a 12 y los Ejemplos Comparativos 4 a 7 se presentan en la Tabla 2

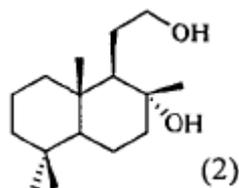
	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo Comparativo 4	Ejemplo Comparativo 5	Ejemplo Comparativo 6	Ejemplo Comparativo 7
Material crudo	KSM	KSM	KSM	KSM	KSM	KSM	KSM	KSM	KSM
Tipo de bacteria	Secado por pulverización	Secado por pulverización	Secado por pulverización	Secado por aire caliente	Secado a temperatura ambiente	Secado por pulverización	Secado por pulverización	Secado por pulverización	Centrifugación
Procedimiento	2%	5%	10%	4%	4%	2%	2%	2%	37%
	99,5% EtOH	Tolueno	65% EtOH	Hexano	99,5% EtOH				
	13,1	13,2	13,3	13,1	13,1	8,9	16,7	7,3	14,7
Evaluación	Adición de agua	Secado a sólido	Secado a sólido	Secado a sólido	Adición de agua				
	93,5%	88,6%	85,9%	81,8%	71,1%	19,3%	56,7%	3,1%	87,3%
	0,0006	0,0007	0,0011	0,0016	0,0013	0,0017	0,0057	0,0043	0,0044
Color de líquido de extracto	4,21	5,82	6,77	5,96	5,52	5,2	21,4	-	9,89
Color de los cristales	1	2	2	2	2	3	5	2	3
Evaluación del olor									

5 A partir de los resultados de la Tabla 1 y la Tabla 2, cuando un producto obtenido mediante el secado de un fluido de cultivo se puso en contacto con un disolvente, el valor SP del medio se ajustó al intervalo comprendido entre 9,5 y 16, y un filtrado obtenido después de la retirada del microorganismo se sometió a un procedimiento de cristalización, pudo obtenerse un diol de alta calidad que tenía un olor y un tono de color satisfactorios, y la tasa de recuperación del diol también era alta. Además, cuando el fluido de cultivo no se secó y se puso directamente en contacto con un disolvente, incluso si el valor SP del medio obtenible después del contacto del fluido de cultivo y el disolvente se ajustó al intervalo comprendido entre 9,5 y 16, no pudo obtenerse un producto de alta calidad.

REIVINDICACIONES

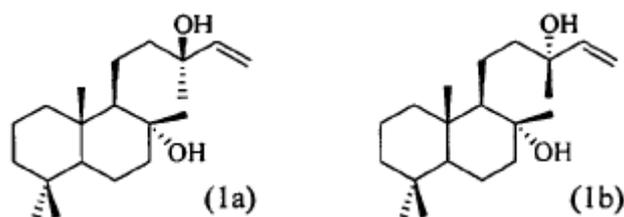
1. Un procedimiento de producción de 1-(2-hidroxiethyl)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol representado por la fórmula (2):

5



en el que el procedimiento comprende cultivar un microorganismo usando un medio que contiene un compuesto o unos compuestos representados por la fórmula (1a) y/o (1b)

10



15

como un sustrato, secar el fluido de cultivo que contiene el diol de manera que el contenido de humedad en el producto seco del fluido de cultivo sea de entre el 0,01% y el 20%, añadir un disolvente al producto seco del fluido de cultivo, de manera que el valor SP del medio sea ajustado para estar comprendido en el intervalo entre 9,5 y 16 $[(\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2}]$, obteniendo, de esta manera, una dispersión, eliminar posteriormente el microorganismo de la disolución y cristalizar el diol.

20

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que después de secar el fluido de cultivo, el disolvente es añadido al producto seco del fluido de cultivo sin tratar el microorganismo mediante un tratamiento físico, un tratamiento químico o un tratamiento bioquímico.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la cantidad de disolvente añadida al producto seco del fluido de cultivo es de 1 a 100 ml con relación a 1 g de 1-(2-hidroxiethyl)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol presente en el producto seco del fluido de cultivo.

25

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tiempo de contacto del producto seco del fluido de cultivo y el disolvente es de 1 a 60 minutos.