

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 271**

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06835082 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 1997879**

54 Título: **Microorganismo y procedimiento para producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando el mismo**

30 Prioridad:

24.02.2006 JP 2006048550

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

22.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IGARASHI, KAZUAKI;
TAKIZAWA, SHUICHI;
HIGAKI, NORIHIKO y
HAGIHARA, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 546 271 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

Microorganismo y procedimiento para producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando el mismo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo novedoso que produce un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando esclareol como sustrato. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando el microorganismo novedoso.

10

Técnica anterior

15

Dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano (ocasionalmente denominado "Ambroxano (marca comercial)") es un aroma químico con propiedades de larga duración de forma satisfactoria que se produce por medio de conversión química principalmente a partir de esclareol extraído de *Salvia sclarea*. La fig. 1 muestra un procedimiento para producir dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano a partir de esclareol. Como se muestra en la fig. 1, decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y esclareólido (dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) son conocidos como intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano. Además, un compuesto de éter cíclico (8a,13-oxido-12,13-deshidro-15,16-dinorlabdano) es conocido como un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano, aunque no se muestra en la fig. 1.

20

25

La conversión de esclareol en un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano por un microorganismo se describe, por ejemplo, en la patente JP N.º 2547713, patente de los EE. UU. N.º 798799, patente JP N.º 2802588, patente JP N.º 3002654 y patente JP N.º 2063550. La patente JP N.º 2547713 y la patente de los EE. UU. N.º 4798799 divulgan la producción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol por *Hyphozyma roseoniger* ATCC20624. La patente JP N.º 2802588 divulga la producción de un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano por *Cryptococcus laurentii* ATCC20920. La patente JP N.º 3002654 divulga la producción de un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano por *Bensingtonia ciliata* ATCC20919. La patente JP N.º 2063550 divulga la producción de un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano por *Cryptococcus albidus* ATCC20918 y *Cryptococcus albidus* ATCC20921.

30

35

Por tanto, sólo los microorganismos de *Basidiomycetes* o *Hyphozyma* eran conocidos como microorganismos que tienen la capacidad de producir intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como un sustrato, como se divulga en la patente JP N.º 2547713, patente JP N.º 2802588, patente JP N.º 3002654, y patente JP N.º 2063550.

40

Divulgación de la invención**Problemas que debe solucionar la invención**

45

Bajo las circunstancias anteriores, la presente invención está destinada a proporcionar a microorganismo novedoso que puede producir eficazmente un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando esclareol como sustrato. Además, la presente invención está destinada a proporcionar un procedimiento para producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando dicho microorganismo.

50

Medios para solucionar los problemas

55

Con el fin de resolver los problemas anteriores, los presentes inventores han realizado estudios concentrados en muestras de suelo como fuentes de microorganismos obtenidos a partir de Haga Gun, Tochigi, Japón y ciudad de Utsunomiya, Tochigi, Japón, con el fin de aislar e identificar microorganismos que tienen propiedades de interés. Como resultado, tuvieron éxito en aislar e identificar tres cepas de microorganismos novedosos que no se clasifican como microorganismos convencionales y que tienen propiedades de interés. La presente invención se ha completado en base a los hallazgos sobre el efecto de que un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) se puede producir usando esclareol como sustrato, estando poseído el mismo por los microorganismos novedosos anteriores.

60

Los microorganismos novedosos de acuerdo con la presente invención pertenecen a *Ascomycetes* y tienen la capacidad de producción de un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando esclareol como sustrato. Los microorganismos de

65

5 *Ascomycetes* que tienen dicha capacidad representan hallazgos novedosos, y dichos microorganismos pueden ser útiles para producir dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano y un intermedio del mismo. En lo que respecta a microorganismos novedosos que se habían aislado e identificado por los presentes inventores, se identificaron las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican 28S ARNr (a continuación en el presente documento denominado "28S ADN^r"). Dichas secuencias de nucleótidos son como se muestran en la SEQ ID NO: 1 a 3. Con respecto a los microorganismos novedosos, se identificaron las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican 18S ARNr (a continuación en el presente documento denominado "18S ADN^r"). Dichas secuencias de nucleótidos son como se muestran en la SEQ ID NO: 4 a 6. Además, se descubrió que los microorganismos novedosos tienen propiedades micológicas mostradas en la tabla 1.

10

Tabla 1

Prueba de asimilabilidad de fuente de carbono	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-glucosa	+	+	+
D-galactosa	+	+	+
L-sorbose	+	+	w
D-ribose	w	w	w
D-xilosa	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+
D-arabinosa	+	w	w
L-ramnosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
α,α -trehalosa	+		+
Me α -D-glucósido	+	+	w
D-celobiosa	+	+	+
Salicina	-	w	w
Melibiosa	+	+	+
Lactosa	+	+	w
D-rafinosa	+	+	+
Melezitosa	+	+	+
Inulina	-	w	-
Almidón soluble	w	+	+
Glicerol	+	+	w
meso-eritritol	+	+	w
Ribitol	w	-	w
D-sorbitol	+	+	w
D-mamitol	+	+	w
D-galactitol	-	-	-
mio-inositol	+	w	w
Glucono-1,5-lactona	w	w	-
Ca ácido 2-ceto-glucónico	-	-	w
Ca ácido 5-ceto-glucónico	-	-	w
DL-lactato	+	+	w
Succinato	+	+	+
Citrato	-	w	w
Metanol	-	-	-
Prueba de fermentabilidad de azúcar	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-glucosa	-	-	-
Prueba de asimilabilidad de fuente de nitrógeno	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
Nitrato de potasio	+	+	+

Los presentes inventores intentaron identificar microorganismos novedosos en base a las secuencias de nucleótidos de 28S ADNr como se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 3, las secuencias de nucleótidos de 18S ADNr como se muestran en las SEQ ID NO: 4 a 6, y las propiedades micológicas mostradas en la tabla 1. Como resultado, pudieron vislumbrar sólo que los microorganismos novedosos pertenecían a *Ascomycetes*. Específicamente, los microorganismos novedosos no se clasificaron en géneros o especies conocidos de *Ascomycetes*. Por tanto, se concluyó que dichos microorganismos novedosos pertenecían a un género novedoso. La clasificación en términos de propiedades micológicas se realizó de acuerdo con Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D., 2000, *Yeasts: Characteristics and identification*, 3ª edición, Cambridge University Press, Cambridge, U.K.; y Kurtzman, C. P. y Fell, J. W., 1998, *The Yeasts, a taxonomic study*, 4ª edición, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

Los microorganismos novedosos se depositaron en el Organismo depositario de patentes internacionales del Instituto Nacional de Tecnología y Ciencia industrial avanzada (IPOD: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japón) el 12 de enero de 2006, con los números de acceso FERM BP-10713 y FERM BP-10712 y el 13 de julio de 2006, con el número de acceso FERM BP-10714.

Específicamente, los microorganismos de la presente invención pertenecen a *Ascomycetes* y tienen la capacidad de producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) durante el procedimiento de síntesis de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como sustrato. Además, los microorganismos de la presente invención comprenden 28S ADNr que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de un 95 % o mayor con la secuencia de nucleótidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 o 18S ADNr que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de un 95 % o mayor con la secuencia de nucleótidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 6. Además, los microorganismos de la presente invención tienen las propiedades micológicas mostradas en la tabla 1. Además, los microorganismos de la presente invención son, preferentemente, de cepas de levaduras de ascomicetos que se identifican por el número de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712 o FERM BP-10714. Los microorganismos de la presente invención pueden pertenecer al género, preferentemente a la especie, y más preferentemente a la cepa a la que pertenecen las cepas de levaduras de ascomicetos.

Los ejemplos de los intermedios de la presente invención incluyen decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona).

La presente invención puede proporcionar un procedimiento para producir un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) usando los microorganismos novedosos de la presente invención. Específicamente, el procedimiento para producir un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) de acuerdo con la presente invención comprende cultivar los microorganismos novedosos en un medio que contiene esclareol y producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) durante el procedimiento de síntesis de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como sustrato.

Efectos de la invención

La presente invención puede proporcionar microorganismos novedosos que pertenecen a *Ascomycetes* y que tienen la capacidad de producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) durante el procedimiento de síntesis de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como sustrato. Dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano, que es un material de partida para un aroma químico o similar, se puede producir a partir de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona). En consecuencia, el uso de los microorganismos novedosos de la presente invención permite la producción de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano a bajo coste.

La presente invención también puede proporcionar un procedimiento para producir un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona), que es un material de partida para dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano como material de partida para un aroma químico o similar. De acuerdo con el procedimiento para producir un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) de la presente invención, se puede producir dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano a bajo coste.

Esta descripción incluye parte o la totalidad del contenido como se divulga en la descripción y/o dibujos, de la solicitud de patente japonesa n.º 2006-048550, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra un procedimiento para producir dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano a partir de esclareol.

Mejores modos de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se describe la presente invención en detalle.

Microorganismos novedosos

Los microorganismos novedosos de la presente invención pertenecen a *Ascomycetes* y producen un intermedio, es decir, decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona), durante el procedimiento de síntesis de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como sustrato. El término "intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano" usado en el presente documento se refiere a decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y esclareólido (dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona).

Los microorganismos novedosos de la presente invención se pueden aislar a partir del suelo usando la capacidad de producción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) como indicador. La capacidad de producción de un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) se puede evaluar cultivando microorganismos de prueba en un medio que contiene esclareol y detectando un decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) en el medio. Se puede detectar decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) en el medio por extracción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona), usando un disolvente orgánico, del medio desde el que se han retirado los microorganismos de prueba, y a continuación realizar, por ejemplo, cromatografía de gases (CG).

Los procedimientos para detectar decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) no se limitan a la CG. Por ejemplo, se pueden emplear procedimientos convencionales de análisis, tales como cromatografía de gas-líquido (GLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectro de infrarrojo (IR) o resonancia magnética nuclear (RMN).

Los presentes inventores han aislado los microorganismos novedosos de *Ascomycetes* a partir de muestras de tierra de Haga Gun, Tochigi, Japón, y ciudad de Utsunomiya, Tochigi, Japón, por medio de dichos medios. Los microorganismos novedosos aislados se cultivan en un medio que contiene esclareol, de modo que dichos microorganismos pueden producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) en el medio. Los inventores de la presente invención designaron estos microorganismos novedosos como *Ascomiceto* sp. KSM-JL2842, *Ascomiceto* sp. KSM-J3571 y *Ascomiceto* sp. KSM-JL4651 y los depositaron en el Organismo depositario de patentes internacionales del Instituto Nacional de Tecnología y Ciencia industrial avanzada (IPOD: Tsukuba central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japón) con los números de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712 y FERM BP-10714.

Los microorganismos novedosos de la presente invención incluyen microorganismos que pertenecen a las cepas de levaduras de *Ascomycetes* identificadas por el número de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712 o FERM BP-10714, microorganismos que se clasifican en el mismo género que el de las cepas de levaduras, preferentemente, en la misma especie, y más preferentemente, en la misma cepa que las cepas de levaduras. Además, dichos microorganismos tienen la capacidad de producción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona).

Las cepas de levaduras de ascomicetos identificadas por los números de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712, y FERM BP-10714 tienen 28S ADNr que comprende las secuencias de nucleótidos como se muestran en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. En consecuencia, los microorganismos novedosos de la presente invención incluyen cepas de levaduras de ascomicetos que tienen 28S ADNr que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de un 95 % o mayor, preferentemente de un 98 % o mayor, y más preferentemente de un 99 % o mayor con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 y que tiene la capacidad de producción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona).

Además, las cepas de levaduras de ascomicetos identificadas por los números de acceso FERM BP-10713, FERM

- BP-10712 y FERM BP-10714 tienen 18S ADNr que comprende las secuencias de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente. En consecuencia, los microorganismos novedosos de la presente invención incluyen cepas de levaduras de ascomicetos que tienen 18S ADNr que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de un 95 % o mayor, preferentemente de un 98 % o mayor, y más preferentemente de un 99 % o mayor con una cualquiera de las secuencias de nucleótidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 6 y que tiene la capacidad de producción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona).
- Producción de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) por microorganismos novedosos
- Con el uso de los microorganismos novedosos de la presente invención descritos anteriormente, se pueden producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona). Se pueden usar el decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) producido como materiales de partida para producir dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano, que es un nuevo aroma químico de alto valor con propiedades de larga duración de forma satisfactoria.
- Cuando se produce decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) con el uso de los microorganismos novedosos de la presente invención, los microorganismos novedosos de la presente invención, en primer lugar, se cultivan en un medio que contiene esclareol. Se puede usar un medio de cualquier composición, siempre que los microorganismos de *Ascomycetes* puedan crecer en el mismo. Los ejemplos de medio que se puede usar incluyen medio sólido y medio líquido que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales y vitaminas. Un medio para cultivar los microorganismos novedosos de la presente invención puede contener un tensioactivo o un agente antiespumante, de acuerdo con las condiciones de cultivo o similares.
- Los ejemplos de fuentes de carbono que se van a añadir al medio incluyen monosacárido, disacárido, oligosacárido y polisacárido. Se pueden usar en combinaciones de dos o más. Los ejemplos de fuentes de carbono distintas de sacáridos incluyen sales de ácidos orgánicos, tales como sales de ácido acético. Estas fuentes de carbono se pueden usar de forma independiente o en combinaciones de dos o más según la necesidad.
- Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen sales de amonio inorgánicas y orgánicas, tales como amonio, cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, carbonato de amonio, fosfato de amonio y acetato de amonio, sustancias orgánicas que contienen nitrógeno, tales como urea, peptona, extracto de levadura e hidrolizado de caseína, y aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, alanina y metionina. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar de forma independiente o en combinaciones de dos o más según la necesidad.
- Además, los ejemplos de minerales incluyen cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de cinc y carbonato de calcio. Cada mineral se puede usar de forma independiente o en combinaciones de dos o más según la necesidad.
- Las condiciones para cultivar los microorganismos novedosos de la presente invención no están particularmente limitadas, y se puede llevar a cabo el cultivo al nivel de pH y de temperatura óptimos. Específicamente, un nivel de pH óptimo es de 3 a 8, preferentemente de 4 a 8, y más preferentemente de 5 a 7. La temperatura óptima es de 10 °C a 35 °C, preferentemente de 15 °C a 30 °C, y más preferentemente de 20 °C a 30 °C. El cultivo se puede llevar a cabo por medio de, por ejemplo, cultivo con agitación, cultivo anaeróbico, cultivo estacionario o cultivo en un fermentador. Además, también se puede emplear una reacción de células en reposo y una reacción de células inmovilizadas.
- Una concentración de esclareol que se va a añadir a un medio que tiene dicha composición de no está particularmente limitada, y dicha concentración es preferentemente de un 0,1 % a un 50 %. Se puede añadir esclareol al medio antes del cultivo o durante el cultivo (es decir, alimentar el cultivo). Además, se pueden alimentar simultáneamente componentes distintos de esclareol, tales como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, vitaminas, minerales, tensioactivos o agentes antiespumantes.
- Se puede recuperar decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) de un medio después de cultivar los microorganismos novedosos como se describe anteriormente. Se puede recuperar decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) de un medio de acuerdo con una técnica convencional, sin limitación particular. Por ejemplo, las células se separan y se retiran de un medio, y decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) se aíslan y se purifican con el uso de combinaciones de centrifugación, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, filtración con membrana de osmosis inversa, electrodialisis, desalado, cristalización y otros medios.

Un procedimiento para producir dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando el decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) resultante no está particularmente limitado, y se puede emplear una técnica convencional adecuada. Específicamente, esclareólido se reduce con, por ejemplo, hidruro de litio y aluminio, borohidruro de sodio o una mezcla de borohidruro de potasio/cloruro de litio para dar decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol. Decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol se somete a ciclodeshidratación en varios tipos de disolventes con el uso de catalizadores ácidos, tales como ácido p-toluenosulfónico, cloruro de ácido p-toluenosulfónico, o cantidades catalíticas de ácido sulfúrico e intercambiador de iones ácidos para dar dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe con mayor detalle con referencia a los ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no está limitado a los siguientes ejemplos.

[Ejemplo 1] Aislamiento de microorganismos novedosos

Se aislaron los microorganismos novedosos a partir de muestras de tierra de Haga Gun, Tochigi, Japón, y ciudad de Utsunomiya, Tochigi, Japón, de la siguiente manera.

Al inicio, se aplicaron 100 µl de una suspensión de tierra a un medio agar que contenía extracto de levaduras al 0,2 %, nitrato de amonio al 0,2 %, fosfato de monopotasio al 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,05 %, agar al 2,0 %, esclareol al 1,0 % (esterilizado por separado) y Tween 80 al 0,5 % (esterilizado por separado). Se llevó a cabo el cultivo a 25 °C durante de 7 a 14 días, se inocularon las colonias crecidas en un medio líquido que contenía extracto de levaduras al 0,2 %, nitrato de amonio al 0,2 %, fosfato de monopotasio al 0,1 % y sulfato de magnesio heptahidratado al 0,05 %, y se llevó a cabo el cultivo a 25 °C durante 1 día para proporcionar cepas iniciadoras. Posteriormente, se inocularon las cepas iniciadoras en un medio que contenía extracto de levaduras al 0,2 %, nitrato de amonio al 0,2 %, fosfato de monopotasio al 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,05 %, esclareol al 1,0 % (esterilizado por separado), y Tween 80 al 0,5 % (esterilizado por separado) a una concentración de un 1 %, y se llevó a cabo el cultivo a 25 °C durante 1 semana.

Después de la finalización del cultivo, se extrajo una sustancia objetivo a partir de 0,1 ml de una solución de cultivo con 0,6 ml de acetato de etilo, se diluyó de forma adecuada y a continuación se sometió a un análisis con cromatografía de gases (CG). Se llevó a cabo el análisis usando el Agilent technologies 6890N como analizador de CG bajo las siguientes condiciones. Se usó un detector de ionización de llama (FID) como detector, se fijó la temperatura de entrada a 250 °C, se usó un modo de inyección de división con una proporción de división de 100:1, el caudal total fue de 200 ml/min, el caudal de la columna fue de 0,4 ml/min, se usó la columna DB-WAX (φ 0,1 mm x 10 m, J&W) como columna, y la temperatura del horno fue de 250 °C. Bajo dichas condiciones, un compuesto de éter cíclico, es decir, un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano, presentó un máximo a alrededor de 0,8 minutos, esclareólido presentó un máximo a alrededor de 2,4 minutos, esclareol presentó un máximo a alrededor de 2,7 minutos y decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol presentó un máximo a alrededor de 3 minutos.

Bajo dichas condiciones, se evaluaron 6950 cepas iniciadoras en términos de la capacidad de producción de intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano. Como resultado, se aislaron microorganismos novedosos que tienen la capacidad de producción principalmente de decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol. Los microorganismos novedosos aislados se designaron como KSM-JL2842, KSM-J3571 y KSM-JL4651.

[Ejemplo 2] Clasificación de microorganismos novedosos

Se identificaron las propiedades micológicas de KSM-JL2842, KSM-J3571 y KSM-JL4651 aislados en el ejemplo 1 y se analizaron los ADNr de los mismos en un intento de clasificar dichas cepas.

Al inicio, se identificaron las propiedades micológicas de KSM-JL2842 de la siguiente manera. Se observó una colonia húmeda y de color rojo pálido en medio de placa de agar YM (Becton Dickinson) y la forma de la porción periférica de la colonia era relativamente lisa. Se observaron características microscópicas de la misma. Como resultado, se observó la formación de trofocitos de conformación elíptica a ovalada y cilíndrica, y se descubrió que los trofocitos proliferaban debido a la gemación. Como resultado de una prueba de propiedad bioquímica, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 2. En la tabla 2, el símbolo "+" indica un resultado positivo, el símbolo "-" indica un resultado negativo y el símbolo "w" indica un resultado positivo débil. Además, KSM-JL2842 creció a 25 °C pero no creció a 30 °C o mayor.

Se identificaron las propiedades micológicas de KSM-J3571 de la siguiente manera. Se observó una colonia húmeda y de color rojo pálido a amarillento en medio de placa de agar YM (Becton Dickinson) y la forma de la porción periférica de la colonia era lisa. Se observaron características microscópicas de la misma. Como resultado, se observó la formación de trofocitos de conformación elíptica a ovalada y ahusada, y se descubrió que los trofocitos proliferaban

debido a la gemación. Como resultado de una prueba de propiedad bioquímica, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 2. Además, KSM-J3571 creció a 25 °C, creció débilmente a 30 °C, pero no creció a 35 °C o mayor.

- 5 Se identificaron las propiedades micológicas de KSM-JL4651 de la siguiente manera. Se observó una colonia húmeda y de color rojo pálido en medio de placa de agar YM (Becton Dickinson) y la forma de la porción periférica de la colonia era relativamente lisa. Se observaron características microscópicas de la misma. Como resultado, se observó la formación de trofocitos de conformación elíptica a ovalada y cilíndrica, y se descubrió que los trofocitos proliferaban debido a la gemación. Como resultado de una prueba de propiedad bioquímica, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 2. Además, KSM-JL4651 creció a 30 °C pero no creció a 35 °C o mayor.
- 10

Tabla 2

Prueba de asimilabilidad de fuente de carbono	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-glucosa	+	+	+
D-galactosa	+	+	+
L-sorbosa	+	+	w
D-ribosa	w	w	w
D-xilosa	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+
D-arabinosa	+	w	w
L-ramnosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
α,α -trehalosa	+	+	+
Me α -D-glucósido	+	+	w
D-celobiosa	+	+	+
Salicina	-	w	w
Melibiosa	+	+	+
Lactosa	+	+	w
D-rafinosa	+	+	+
Melezitosa	+	+	+
Inulina	-	w	-
Almidón soluble	w	+	+
Glicerol	+	+	w
meso-eritritol	+	+	w
Ribitol	w	-	w
D-sorbitol	+	+	w
D-Manitol	+	+	w
D-galactitol	-	-	-
mio-inositol	+	w	w
Glucono-1,5-lactona	w	w	-
Ca ácido 2-ceto-glucónico	-	-	w
Ca ácido 5-ceto-glucónico	-	-	w
DL-lactato	+	+	w
Succinato	+	+	+
Citrato	-	w	w
Metanol	-	-	-

Prueba de fermentabilidad de azúcar	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-glucosa	-	-	-
Prueba de asimilabilidad de fuente de nitrógeno	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
Nitrato de potasio	+	+	+

Posteriormente, se analizaron los ADNr de KSM-JL2842, KSM-J3571 y KSM-JL4651 de la siguiente manera. Específicamente, se analizaron la región D1/D2 de 28S ADNr y de 18S ADNr de acuerdo con el procedimiento de O'Donnell (O'Donnell, K. 1993, *Fusarium and its near relatives*, en Reynolds, D. R. y Taylor, J. W. (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, CAB International, Wallingford) para deducir sus grupos taxonómicos. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de la región D1/D2 de 28S ARNr, y los resultados se muestran en las SEQ ID NO: de 1 a 3. Además, se determinaron las secuencias de nucleótidos de 18S ADNr y los resultados se muestran en las SEQ ID NO: 4 a 6. Se llevó a cabo la búsqueda de homología por BLAST.

La secuencia de nucleótidos de la región D1/D2 de 28S ADNr obtenido a partir de KSM-JL2842 presentó una homología de un 94,9 % con la secuencia de nucleótidos de *Pseudourotium zonatum* (AF096198), que es una cepa de *Ascomycetes*, y una homología de un 94,6 % con la secuencia de nucleótidos de *Crinula caliciiformis* (AY544680). Además, la secuencia de nucleótidos de 18S ADNr presentó una homología alta; es decir, una homología de un 98,8 % con la secuencia de nucleótidos de *Bulgaria inquinans* (AJ224362), que es una cepa de *Ascomycetes*, una homología de un 98,9 % para *Ascomycete* sp. BBA71218 (AJ301960), y una homología de un 98,9 % con la secuencia de nucleótidos de *Cryptosporiopsis radicola* (DQ002903). Sin embargo, fue difícil deducir el grupo taxonómico de KSM-JL2842 en una clasificación más pequeña que el nivel de "clase". Por tanto, se llegó a la conclusión de que la cepa de interés era una cepa de levaduras de un género novedoso de *Ascomycetes*, que se clasifica en la clase *Ascomycetes*. Los resultados de este ejemplo permitieron la identificación de la cepa de interés como *Ascomicete* sp. KSM-JL2842.

La secuencia de nucleótidos de la región D1/D2 de 28S ADNr obtenido a partir de KSM-J3571 presentó una homología de un 94,9 % con la secuencia de nucleótidos de *Pseudourotium zonatum* (AF096198), que es una cepa de *Ascomycetes*, una homología de un 94,8 % con la secuencia de nucleótidos de *Leuconeuropa pulcherrima* (AF096193), y una homología de un 94,6 % con la secuencia de nucleótidos de *Crinula caliciiformis* (AY544680). La secuencia de nucleótidos de 18S ADNr presentó una homología de un 99,0 % con la secuencia de nucleótidos de *ascomycete* sp. BBA71218 (AJ301960), que es una cepa de *Ascomycetes*, y una homología de un 98,8 % con la secuencia de nucleótidos de *Bulgaria inquinans* (AJ224362). Sin embargo, fue difícil deducir el grupo taxonómico de KSM-J3571 en una clasificación más pequeña que el nivel de "clase". Por tanto, se llegó a la conclusión de que la cepa de interés era una cepa de levaduras de un género novedoso de *Ascomycetes*, que se clasifica en la clase *Ascomycetes*. Los resultados de este ejemplo permitieron la identificación de la cepa de interés como *Ascomicete* sp. KSM-J3571.

La secuencia de nucleótidos de la región D1/D2 de 28S ADNr obtenido a partir de KSM-JL4651 presentó una homología de un 94,6 % con la secuencia de nucleótidos de *Pseudourotium zonatum* (AF096198), que es una cepa de *Ascomycetes*, y una homología de un 94,4 % con la secuencia de nucleótidos de *Leuconeuropa pulcherrima* (AF096193). La secuencia de nucleótidos de 18S ADNr presentó una homología de un 99,0 % con la secuencia de nucleótidos de *ascomycete* sp. BBA71218 (AJ301960), que es una cepa de *Ascomycetes*, y una homología de un 98,8 % con la secuencia de nucleótidos de *Bulgaria inquinans* (AJ224362). Sin embargo, fue difícil deducir el grupo taxonómico de KSM-JL4651 en una clasificación más pequeña que el nivel de "clase". Por tanto, se llegó a la conclusión de que la cepa de interés era una cepa de levaduras de un género novedoso de *Ascomycetes*, que se clasifica en la clase *Ascomycetes*. Los resultados de este ejemplo permitieron la identificación de la cepa de interés como *Ascomicete* sp. KSM-JL4651.

Ascomiceto sp. KSM-JL2842 y KSM-J3571 se depositaron el 12 de enero de 2006, con los números de acceso FERM BP-10713 y FERM BP-10712 y *Ascomiceto* sp. KSM-JL4651 se depositó el 13 de julio de 2006, con el número de acceso FERM BP-10714 en el Organismo depositario de patentes internacionales del Instituto Nacional de Tecnología y Ciencia industrial avanzada (IPOD: Tsukuba central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japón).

[Ejemplo 3] Examen de la capacidad de producción del intermedio dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano

En este ejemplo, se examinó la capacidad de *Ascomiceto* sp. KSM-JL2842 para producir un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano. Al inicio, se inoculó un asa de platino de *Ascomiceto* sp. KSM-JL2842 en caldo YM al 2,1 % (Becton Dickinson), se llevó a cabo el cultivo con agitación a 25 °C durante 2 días, y se designaron los resultantes como cepas iniciadoras. Posteriormente, se inocularon las cepas iniciadoras en un medio que contenía caldo YM al 2,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,1 %, Tween 80 al 1 %, y esclareol al 2 % a una concentración de un 2 %, y se llevó a cabo el cultivo con agitación a 25 °C. La solución de cultivo se sometió a extracción y análisis CG por medio del procedimiento del ejemplo 1, y se determinaron las cantidades de los

intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano que se van a producir. Los resultados se muestran en la tabla 3. Las unidades para los valores numéricos mostrados en la tabla 3, son "g/l".

Tabla 3

	4 días	7 días	10 días
Esclareólido	0,3	0,4	0,2
Decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol	12,0	15,7	14,5
Éter cíclico	0,5	0,4	0,8

5 Los resultados mostrados en la tabla 3 demuestran que *Ascomiceto* sp. KSM-JL2842 puede producir principalmente decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol, de entre los intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano.

10 [Ejemplo 4] Examen de la capacidad de producción del intermedio dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano

En este ejemplo, se examinaron las capacidades de *Ascomiceto* sp. KSM-JL2842, KSM-J3571 y KSM-JL4651 para producir intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano. Al inicio, se inoculó un asa de platino de estas cepas en un medio que contenía extracto de levaduras al 0,2 % (Becton Dickinson), nitrato de amonio al 0,2 %, fosfato de monopotasio al 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,05 % y glucosa al 1,0 %, se llevó a cabo el cultivo con agitación a 25 °C durante 2 días, y se designaron las resultantes como cepas iniciadoras. Posteriormente, se inocularon las cepas iniciadoras en un medio que contenía extracto de levaduras al 0,2 % (Becton Dickinson), nitrato de amonio al 0,2 %, fosfato de monopotasio al 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,05 %, glucosa al 1,0 %, Tween 80 al 0,5 %, y esclareol al 1,0 % a una concentración de un 1 %, y se llevó a cabo el cultivo con agitación a 25 °C durante 6 días. La solución de cultivo se sometió a extracción y análisis CG por medio del procedimiento del ejemplo 1, y se determinaron las cantidades de los intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano que se van a producir. Los resultados se muestran en la tabla 4. Las unidades para los valores numéricos mostrados en la tabla 4, son "g/l".

Tabla 4

	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
Esclareólido	0,4	3,1	0,4
Decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol	2,0	0,2	0,7
Éter cíclico	Traza	0,1	Traza

25 Los resultados mostrados en la tabla 4 demuestran que *Ascomiceto* sp. KSM-JL2842, KSM-J3571, y KSM-JL4651 producen intermedios de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano.

Listado de secuencias

<110> KAO CORPORATION

5 <120> Un microorganismo novedoso y un procedimiento para producir un intermedio de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto [2,1-b]furano usando el microorganismo

<130> PH-2933-PCT

10 <150> JP 2006-048550

<151> 2006-02-24

<160> 6

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 611

<212> ADN

20 <213> Ascomycete sp. KSM-JL2842

<400> 1

gcatatcaat aagcggagga aaagaaacca acagggatta cctcagtaac ggcgagtgaa 60

gcggtaacag ctcaaatttg aaatctggcc tcacgggccg agttgtaatt tntagaggat 120

gcttcggggcg tggctccggtc taagttcctt ggaacaggac gtcatagagg gtgagaatcc 180

cgtatgtgac cgggtgccgc tgtccatgtg aagctccttc gacgagtcga gttgtttggg 240

aatgcagctc aaaatgggtg gtaaatttca tctaaagcta aatattggcc agagaccgat 300

agcgcacaag tagagtgatc gaaagatgaa aagcactttg gaaagagagt taaacagtac 360

gtgaaattgt tgaaagggaa gcgcttgcaa ccagacttgc acgcggtcga tcatcctgcc 420

ttctggctgg tgcaactgat cgcgttcagg ccagcatcgg ttttgggtgt tggataaagg 480

ctctgggaat gtagcttctc tcggggagtg ttatagccca gggtgcaatg cagcctaccg 540

ggaccgagga ccgcgcttcg gctaggatgc tggcgtaatg gttgtaagcg acccgtcttg 600

aaacacggac c 611

25

<210> 2

<211> 611

<212> ADN

<213> Ascomycete sp. KSM-J3571

30

<400> 2

ES 2 546 271 T3

gcatatcaat aagcggagga aaagaaacca acagggatta cctcagtaac ggcgagtgaa 60
 gcggtaacag ctcaaatttg aaatctggcc tcacggtcog agttgtaatt tntagaggat 120
 gcttcgggcg tggtcgggtc taagttcctt ggaacaggac gtcatagagg gtgagaatcc 180
 cgtatgtgac cgggtgccgc tgtccatgtg aagctccttc gacgagtcga gttgittggg 240
 aatgcagctc aaaatgggtg gtaaatttca tctaaagcta aatattggcc agagaccgat 300
 aggcacacaag tagagtgatc gaaagatgaa aagcactttg gaaagagagt taacagttac 360
 gtgaaattgt tgaagggaa gcgcttgcaa ccagacttgc acgcggtoga tcatcctgcc 420
 ttctggctgg tgcactcgat cgcgttcagg ccagcatcgg ttttggtggt tggataaagg 480
 ctctgggaat gtagcttctc tgggggagtg ttatagccca gggtgcaatg cagcctaccg 540
 ggaccgagga ccgcgcttcg gctaggatgc tggcgtaatg gttgtaagcg acccgtcttg 600
 aaacacggac c 611

<210> 3

<211> 611

5 <212> ADN

<213> Ascomycete sp. KSM-JL4651

<400> 3

gcatatcaat aagcggagga aaagaaacca acagggatta cctcagtaac ggcgagtgaa 60

gcggtaacag ctcaaatttg aaatctggcc tcacggtcog agttgtaatt tntagaggat 120

10

ES 2 546 271 T3

gcttcgggag tggtecggtc taagttcctt ggaacaggac gtcatagagg gtgagaatcc 180
 cgtatgtgac cgggtgccgc tgtccatgtg aagctcctc gacgagtcga gttgtttggg 240
 aatgcagetc aaaatgggtg gtaaatttca tctaaagcta aatattggcc agagaccgat 300
 aggcacacaag tagagtgata gaaagatgaa aagcactttg gaaagagagt taaacagtac 360
 gtgaaattgt taaaagggaa gcgcttgcaa ccagacttgc acgcggtcga tcaicctgcc 420
 ttctggctgg tgcactcgat cgcgttcagg ccagcatcgg ttttgggtgc tggataaagg 480
 ctctgggaat gtagcttctc tcggggagtg ttatagccca gggtgcaatg cagcctgccg 540
 ggaccgagga ccgcgctteg gctaggatgc tggcgtaatg gttgtaagcg acccgtcttg 600
 aaacacggac c 611

<210> 4
 <211> 1732
 <212> ADN
 <213> Ascomycete sp. KSM-JL2842

<400> 4

gtagtcatat gcttgtctca aagattaagc catgcatgtc taagtataag caatatatac 60
 cgtgaaactg cgaatggctc attatatcag ttatagttaa tttgatagta ccttactact 120
 tggataaccg tggttaattct agagctaata catgctaaaa acctcgactt cggaaggggt 180
 gtatttatta gataaaaaac caatgccctt cggggctcac tggtgattca tgataactta 240
 acgaatcgca tggccttgtg ccggcgatgg tcattcaaa tttctgcctt atcaacttc 300
 gatggtagga tagtggccta ccatggttcc aacgggtaac ggggaattag ggttctattc 360
 cggagagggg gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcagcg gcgcaaatta 420
 cccaatcccg acacggggag gtagtgacaa taaatactga tacagggtc ttttgggtct 480

10

ES 2 546 271 T3

tgtaattgga atgagtacaa tttaaatccc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg 540
 gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa 600
 aagctcgtag ttgaaccttg ggctggctg gccggtccgc ctaccocgt gcaactggctc 660
 ggccgggcct ttcctctg ggagccgat gcccttcaact ggggtgtctg gggaaccagg 720
 acttttactt tgaaaaaatt agagtgttca aagcaggcct atgctcgaat acattagcat 780
 ggaataatag aataggacgt gtggttctat tttgttggtt tctaggaccg ccgtaatgat 840
 taatagggat agtcgggggc atcagtattc aattgtcaga ggtgaaattc ttgatttat 900
 tgaagactaa ctactgcgaa agcatttgc aaggatgtt tcattaatca gtgaacgaaa 960
 gttaggggat cgaagacgat cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta 1020
 gggatcgggc gatgttatct tttgactcg ctcgcaact tacgagaaat caaagtttt 1080
 gggttctggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaa gaaattgacg gaagggcacc 1140
 accaggagtg gacctcggc ctttaattga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga 1200
 cacaataagg attgacagat tgagagctct ttcttgattt tgtgggtggt ggtgcatggc 1260
 cgttcttagt tgggtggagtg atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc 1320
 tgctaaatag ccaggctagc tttggctggt cgcggcttc ttagaggac tatcgctca 1380
 agccgatgga agtttgaggc aataacaggt ctgtgatgcc cttagatggt ctgggccgca 1440
 cgcgcctac actgacagag ccaacgagtt catcaccttg gccgaaaggt ctgggtaac 1500
 ttgttaaact ctgtcgtgct ggggatagag cattgcaatt attgctctc aacgaggaat 1560
 tctagtaag cgcaagtcac cagcttgcgc tgattaogtc cctgcccttt gtacacaccg 1620
 cccgtceta ctaccgattg aatggctcag tgagcttcc ggactggccc agggaggtcg 1680
 gcaacgacca cccagggccg gaaagttgtt caaacttggc catttagagg aa 1732

<210> 5

<211> 1772

<212> ADN

<213> Ascomycete sp. KSM-J3571

5

<400> 5

gtagtcatat gcttgtctca aagattaagc catgcatgic taagtataag caatatatac 60
 egtgaaactg cgaatggctc attatateag ttatagttta ttgatagta cttactact 120
 tggataaccg tggtaattct agagctaata catgctaaaa acctcgactt cggaaaggggt 180
 gtatttatta gataaaaaac caatgccctt cggggetcac tggtgattca tgataactta 240
 aegaatcgca tggccttgtg ccggcgatgg ttcattcaaa tttctgcctt atcaactttc 300
 gatgtagga tagtggccta ccatggtttc aacgggtaac ggggaattag gtttctatte 360
 cggagagggg gctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatta 420
 cccaatcccg acacggggag gtagtgacaa taaatactga tacagggtc ttttgggtct 480
 tgtaattgga atgagtacaa tttaaatccc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg 540
 gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaa 600
 aagctcgtag ttgaacctg gccctggctg gccggtcgc ctcaccgct gcactggctc 660
 ggccgggect ttccttctgg ggagccgat gcccttact ggggtgtctg gggaaccagg 720
 acttttactt tgaaaaaatt agagtgttca aagcaggcct atgctcgaat acattagcat 780
 ggaataatag aataggacgt gtggttctat tttgttggtt tctaggaccg ccgtaatgat 840
 taatagggat agtcgggggc atcagtattc aattgtcaga ggtgaaatc ttggatttat 900
 tgaagactaa ctactcgaa agcatttgcc aaggatgttt tcattaatca gtgaacgaaa 960
 gttaggggat cgaagacgat cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta 1020
 gggatcgggc gatgttatct tttgactcg ctcggcacct tacgagaaat caaagttttt 1080

ES 2 546 271 T3

gggttctggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa gaaattgacg gaagggcacc 1140
accaggagtg gagcctgcgg ctttaattga ctcaacacgg ggaaactcac caggctccaga 1200
cacaataagg attgacagat tgagagctct ttcttgattt tgtgggtggt ggtgcatggc 1260
cgttcttagt tggtagagt atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc 1320
tgctaaatag ccaggctagc tttggctggt cgccggcttc ttagaggac tatcggctca 1380
agccgatgga agtttgaggc aataacaggt ctgtgatgcc cttagatggt ctgggcccga 1440
cgccgctac actgacagag ccaacagatt catcacctg gccgaaaggt ctgggtaac 1500
ttgttaaact ctgtcgtgct ggggatagag cattgcaatt attgctcttc aacgaggaat 1560
tcctagtaag cgcaagtcat cagcttgcgc tgattacgic cctgcccttt gtacacaccg 1620
cccgtcgcta ctaccgattg aatggctcag tgaggcttcc ggactggccc agggaggctc 1680
gcaacgacca cccagggccg gaaagttggt caaacttggc catttagagg aagtaaaagt 1740
cgtaacaagg tctcctagg tgaacctgcg ga 1772

<210> 6
<211> 1770
5 <212> ADN
<213> Ascomycete sp. KSM-JL4651

<400> 6

gtagtcatat gcttgtctca aagattaagc catgcatgic taagtataag caatatatac 60
cgtgaaactg cgaatggctc attatatacag ttatagtta tttgatagta ccttactact 120
tgataaccg tggtaattct agagctaata catgctaaaa acctcgactt cggaaggggt 180
gtatttatta gataaaaaac caatgccctt cggggctcac tggtgattca tgataactta 240
10 acgaatcgca tggccttgtg ccggcgatgg ttattcaaa tttctgcct atcaacttcc 300

ES 2 546 271 T3

gatgtagga tagtggccta ccatggttc aacgggtaac ggggaattag ggttctatc 360
cggagagggg gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcagc gcgcaaatta 420
cccaatcccg acacggggag gtagtgacaa taaatactga tacagggcic ttttgggtct 480
tgtaattgga atgagtacaa tttaaatccc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg 540
gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagegtata ttaaagttgt tgcagttaa 600
aagctcgtag ttgaacctg ggcttggctg gccggtccgc ctcaccgctg gcactggctc 660
ggccgggctt ttcctctcgg ggagccgcat gcccttcaact ggggtgtctg gggaaccagg 720
acttttactt tgaaaaaatt agagtgttca aagcaggcct atgctcgaat acattagcat 780
ggaataatag aataggacgt gtggttctat tttgttggtt tctaggaccg ccgtaatgat 840
taatagggat agtcgggggc atcagtatc aattgtcaga ggtgaaatc ttggatttat 900
tgaagactaa ctactgcgaa agcatttgcc aaggatgttt tcattaatca gtgaacgaaa 960
gttaggggat cgaagacgat cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta 1020
gggatcgggc gatgttatct ttttgactcg ctggcacct tacgagaaat caaagttttt 1080
gggttctggg gggagtatgg tcgcaagget gaaacttaaa gaaattgacg gaagggcacc 1140
accaggagtg gagcctcggc ctttaattga ctcaacacgg ggaaactca caggtccaga 1200
cacaataagg attgacagat tgagagctct ttcttgatt tgtgggtggt ggtgcatggc 1260
cgttcttagt tggtggagtg atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc 1320
tgctaaatag ccaggctagc tttggetggt cgccggettc ttagagggac tatcggetca 1380
agccgatgga agtttgaggc aataacaggt ctgtgatgcc cttagatgtt ctgggcccga 1440
cgcgcgctac actgacagag ccaacaggt catcacctg gccgaaaggt ctgggtaatc 1500
ttgttaaact ctgtcgtgct ggggatagag cattgcaatt attgctctc aacgaggaat 1560

ES 2 546 271 T3

tcctagtaag cgcaagtcac cagcttgccg tgattacgtc cctgcccttt gtacacaccg 1620

cccgtcgcta ctaccgattg aatggctcag tgaggctttc ggactggccc agggaggtcg 1680

gcaacgacca ccagggccg gaaagttggt caaacttggt catttagagg aagtaaaagt 1740

cgtaacaagg tctccgtagg tgaacctgcg 1770

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo que pertenece a *Ascomycetes* y que tiene 28S ADNr que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de un 95 % o mayor con la secuencia de nucleótidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 o 18S ADNr que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de un 95 % o mayor con la secuencia de nucleótidos como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 6, y que tiene la capacidad de producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) como intermedio durante una etapa de síntesis de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como sustrato.
- 10 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene propiedades micológicas mostradas en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Prueba de asimilabilidad de carbono	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-glucosa	+	+	+
D-galactosa	+	+	+
L-sorbosa	+	+	w
D-ribosa	w	w	w
D-xilosa	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+
D-arabinosa	+	w	w
L-ramnosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
α,α -trehalosa	+	+	+
Me α -D-glucósido	+	+	w
D-celobiosa	+	+	+
Salicina	-	w	w
Melibiosa	+	+	+
Lactosa	+	+	w
D-rafinosa	+	+	+
Melezitosa	+	+	+
Inulina	-	w	-
Almidón soluble	w	+	+
Glicerol	+	+	w
meso-eritritol	+	+	w
Ribitol	w	-	w
D-sorbitol	+	+	w
D-Manitol	+	+	w
D-galactitol	-	-	-
mio-inositol	+	w	w
Glucono-1,5-lactona	w	w	-
Ca ácido 2-ceto-glucónico	-	-	w
Ca ácido 5-ceto-glucónico	-	-	w
DL-lactato	+	+	w
Succinato	+	+	+
Citrato	-	w	w
Metanol	-	-	-
Prueba de fermentabilidad de azúcar	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-Glucosa	-	-	-
Prueba de asimilabilidad de nitrógeno	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
Nitrato de potasio	+	+	+

3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es una cepa de levadura de ascomicetos identificada por el número de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712 o FERM BP-10714.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que pertenece al mismo género que la cepa de levadura de ascomicetos identificada por el número de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712 o FERM BP-10714.
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que pertenece a la misma especie que la cepa de levadura de ascomicetos identificada por el número de acceso FERM BP-10713, FERM BP-10712 o FERM BP-10714.
- 10 6. Un procedimiento para producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) que comprende cultivar el microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un medio que contiene esclareol y producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) durante el procedimiento de síntesis de dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furano usando esclareol como sustrato.
- 15
7. El procedimiento para producir decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende recuperar decahidro-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametilnaftalenetanol y/o esclareólido (decahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan-2(1H)-ona) como intermedio.
- 20

Fig. 1

