

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 887**

51 Int. Cl.:

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016** **PCT/EP2016/058997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016** **WO16170106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016** **E 16718334 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020** **EP 3286309**

54 Título: **Proceso para aislar y purificar Ambrox**

30 Prioridad:

24.04.2015 GB 201507170

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

28.09.2021

73 Titular/es:

GIVAUDAN SA (100.0%)
Chemin de la Parfumerie 5
1214 Vernier, CH

72 Inventor/es:

EICHHORN, ERIC

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 856 887 T3

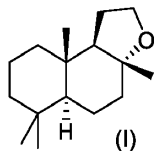
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Proceso para aislar y purificar Ambrox.

La presente invención se refiere a un método para preparar, aislar y purificar el isómero (-)-Ambrox. Más particularmente, la invención se refiere a un método de preparación de (-)-Ambrox por medio de una bioconversión, así como a un método de su recuperación y purificación a partir de una mezcla de reacción por cristalización selectiva.

AMBROFIX™ es el nombre comercial patentado por Givaudan del compuesto enantioméricamente puro (-)-Ambrox, que tiene la fórmula general (I).



AMBROFIX™ es una molécula muy importante en la paleta de ingredientes de los perfumistas. Ofrece una nota ambarina altamente potente, altamente sustantiva y altamente estable para su uso en todas las aplicaciones de perfumería. AMBROFIX™, disponible en Givaudan, es el material más adecuado para obtener una auténtica nota de olor a ámbar gris.

Actualmente, AMBROFIX™ se produce sintéticamente a partir de materias primas de origen natural. La disponibilidad y calidad de ciertas materias primas dependen de las condiciones climáticas, así como de factores socioeconómicos. Además, puesto que las materias primas pueden extraerse de recursos naturales, con rendimientos modestos, están disponibles a precios que, con toda probabilidad, harán que su uso sea cada vez más antieconómico a escala industrial. Por consiguiente, si los suministros industriales comerciales de AMBROFIX™ van a seguir estando disponibles a un costo razonable, existe la necesidad de un proceso de producción y purificación más rentable, que sea capaz de industrializarse.

Una ruta biotecnológica escalable a nivel industrial para AMBROFIX™ sería atractiva porque es potencialmente menos compleja y menos contaminante que los procedimientos totalmente sintéticos.

Un sustrato potencialmente útil sobre el cual intentar una bioconversión para proporcionar (-)-Ambrox es el homofarnesol. En su artículo seminal, Neumann et al. (*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* Vol. 367 págs. 723-726 (1986)) discutieron la viabilidad de convertir homofarnesol en (-)-Ambrox bajo catálisis enzimática, empleando la enzima escualeno-hopeno ciclasa (SHC). El homofarnesol empleado era una mezcla de los cuatro isómeros geométricos de esta molécula. De los cuatro isómeros, solo el isómero geométrico 7E,3E (usando la nomenclatura convencional) podría ciclarse, y entonces solo con un rendimiento muy bajo del (-)-Ambrox deseado.

El documento JP 2009-60799 (Kao) desvela una síntesis mediante la cual SHC actúa sobre un sustrato de homofarnesol para producir (-)-Ambrox. El sustrato es una mezcla de los cuatro isómeros geométricos (3Z,7Z; 3E,7Z; 3Z,7E; y 3E,7E). El documento solo desvela la preparación de (-)-Ambrox a partir de extractos de homofarnesol que contienen SHC. La mezcla de homofarnesol se convierte en (-)-Ambrox y su estereoisómero 9-epi, y la purificación se puede llevar a cabo por destilación o por cromatografía en columna. Kao no describe un proceso mediante el cual el homofarnesol se convierte en (-)-Ambrox usando microorganismos intactos que producen SHC y, además, no proporciona ninguna enseñanza técnica relacionada con el procesamiento posterior de mezclas de reacción complejas obtenidas por dichos procesos que pueden producir (-)-Ambrox en forma olfativamente pura.

Según el conocimiento del solicitante, la técnica anterior no describe ningún proceso viable, escalable a nivel industrial, que implique la bioconversión catalizada por SHC de homofarnesol, para proporcionar (-)-Ambrox en forma olfativamente pura.

Además, si la bioconversión del homofarnesol se va a realizar a escala industrial, deberían estar disponibles fuentes rentables de 3E,7E-homofarnesol altamente puro. Sin embargo, aunque en la bibliografía se han descrito rutas sintéticas para el homofarnesol (véase por ejemplo, el documento US 2013/0273619), según el conocimiento del solicitante, actualmente no existen fuentes rentables a escala industrial de 7E,3E-homofarnesol puro disponibles.

Sigue existiendo una necesidad de proporcionar una ruta económicamente viable y escalable a nivel industrial para el valioso ingrediente de fragancia (-)-Ambrox.

En las solicitudes de patente en tramitación con la presente PCT/EP2014/072891 (publicada como WO2015/059293) y PCT2014/EP/072882 (publicada como WO2015/059290), el solicitante describe un método eficaz para preparar una mezcla de 7E,3E/Z-homofarnesol que está enriquecida en el isómero geométrico 7E,3E. La mezcla de 7E,3E/Z-homofarnesol se prepara a partir de beta-farneseno y se conserva la información isomérica contenida en esta materia prima, de modo que el doble enlace de homofarnesol en la posición 7 se fija en la configuración E. Sin embargo, incluso esta elegante química todavía da como resultado una mezcla de isómeros 3E/Z. El 7E,3E-homofarnesol puro sigue siendo un desafío sintético y solo podría lograrse por medio de la purificación económicamente desventajosa de

mezclas isoméricas.

Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que las mezclas de 7E,3E/Z-homofarnesol se pueden someter a un proceso de bioconversión, mediante el cual la mezcla de homofarnesol se cicla enzimáticamente en presencia de un microorganismo recombinante que expresa una enzima, en particular un biocatalizador de escualeno-hopeno ciclasa (SHC) capaz de bioconvertir homofarnesol en (-)-Ambrox, para producir una mezcla de reacción a partir de la cual se puede aislar (-)-Ambrox en forma olfativamente pura con un procesamiento posterior sorprendentemente fácil.

La presente divulgación proporciona la ciclación catalizada por enzima de homofarnesol para proporcionar una mezcla de reacción que comprende (-)-Ambrox, en donde el homofarnesol comprende una mezcla de isómeros geométricos 7E,3E/Z de homofarnesol, y en donde la reacción se lleva a cabo en presencia de un microorganismo recombinante que produce la enzima, más particularmente un microorganismo recombinante intacto que produce la enzima.

En una realización, la reacción de ciclación se lleva a cabo en presencia de un biocatalizador de SHC capaz de bioconvertir homofarnesol en (-)-Ambrox.

El biocatalizador de SHC es una enzima de tipo silvestre o variante o es un microorganismo que expresa un gen que codifica la enzima SHC, preferiblemente un microorganismo recombinante de *E. coli*. El biocatalizador de SHC se puede usar en cualquier forma tal como por ejemplo, entre otros, una enzima SHC purificada, un extracto bruto que contiene una enzima SHC o una enzima SHC inmovilizada (por ejemplo, en un portador), o el biocatalizador puede ser un microorganismo que ha producido o produce la enzima SHC, tal como una célula completa recombinante intacta y/o una célula fragmentada o una fracción de membrana que contiene la enzima SHC.

En una realización particular, la mezcla de homofarnesol está enriquecida en el isómero geométrico 7E,3E.

En una realización más particular, la mezcla de homofarnesol es al menos 55/45 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una realización más particular, la mezcla de homofarnesol es al menos 70/30 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una realización aún más particular, la mezcla de homofarnesol es al menos 80/20 en peso 7E,3E/7E,3Z.

En una realización aún más particular, la mezcla de homofarnesol es al menos 90/10 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una realización aún más particular, la mezcla de homofarnesol es al menos 95/5 en peso de 7E,3E/7E,3Z.

En una realización particular, la mezcla de homofarnesol consiste en isómeros geométricos 7E,3E/Z y ningún otro isómero geométrico de homofarnesol.

El experto entiende que el término 7E, 7Z, 3E o 3Z usado en relación con el homofarnesol se refiere respectivamente a la orientación del doble enlace en la posición 7 y la posición 3 del homofarnesol. El compuesto 7E,3E-homofarnesol tiene el N.º CAS 459-89-2, mientras que el compuesto 7E,3Z-homofarnesol tiene el N.º CAS 138152-06-4. El uso del término 7E,3E/Z-homofarnesol se refiere a una mezcla de los compuestos.

Los métodos para obtener mezclas de homofarnesol útiles como sustrato en la reacción de ciclación de acuerdo con el método de la presente invención se exponen en las solicitudes en tramitación con la presente PCT/EP2014/072891 (publicada como WO2015/059293) y PCT2014/EP/072882 (publicada como WO2015/059290) mencionadas anteriormente. En términos generales, describen una síntesis de mezclas de homofarnesol que procede convirtiendo farneseno, más particularmente alfa-farneseno y/o beta-farneseno, en su correspondiente derivado de farneseno ciclopropanado, usando una solución orgánica de una N-alquil-N-nitrosourea. A continuación, el derivado ciclopropanado experimenta reacciones de apertura de anillo y transposición en presencia de un ácido de Bronsted para producir la mezcla de homofarnesol, que es selectiva para el isómero geométrico 7E,3E. Particularmente, se prefiere el uso de farneseno como materia prima porque asegura que la configuración E del doble enlace en la posición 7 del homofarnesol sea fija.

Las condiciones de reacción específicas, que forman realizaciones particulares, se establecen en las solicitudes en tramitación con la presente, así como en los ejemplos de a continuación, y no requieren más elaboración en la presente.

La ciclación del homofarnesol para proporcionar una mezcla de reacción que contiene (-)-Ambrox puede ser catalizada por escualeno-hopeno ciclasa (SHC). SHC puede ser una enzima de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID N.º 1), o una variante de la misma (por ejemplo, SEQ ID N.º 2, o SEQ ID N.º 4). SHC se puede obtener de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*), *Zymomonas mobilis* o *Bradyrhizobium japonicum* (como se expone en el Ejemplo 3b del documento US20120135477A1).

Sin embargo, la enzima también se puede producir por medios recombinantes, usando técnicas que son generalmente conocidas en la técnica.

El término "recombinante", como se usa con respecto a la producción de enzimas, se referirá a enzimas producidas mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas por una construcción de ADN exógena que codifica la enzima deseada. Por lo tanto, el término "ADN recombinante" incluye un ADN recombinante

incorporado en un vector en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota (o el genoma de una célula homóloga, en una posición distinta a la localización cromosómica natural).

La(s) molécula(s) de ácido nucleico está(n) unida(s) operativamente a secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas y/o eucariotas. Como se usa en el presente documento, "unida operativamente" significa incorporada en una construcción genética de modo que las secuencias de control de la expresión controlen eficazmente la expresión de una secuencia codificante de interés. Los elementos reguladores transcripcionales/traduccionales mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, promotores, potenciadores, operadores, silenciadores, represores inducibles y no inducibles, constitutivos, regulados por el ciclo celular, regulados metabólicamente, y otros elementos que son conocidos por los expertos en la técnica y que impulsan o regulan de otro modo la expresión génica. Dichos elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a, elementos reguladores que dirigen la expresión constitutiva o que permiten la expresión inducible como, por ejemplo, el promotor CUP-1, el represor de tet como se emplea, por ejemplo, en los sistemas tet-on o tet-off, el sistema de lac, los elementos reguladores del sistema de trp. A modo de ejemplo, el β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) es un inductor eficaz de la expresión de proteínas en el intervalo de concentración de 100 μ M a 1,0 mM. Este compuesto es un imitador molecular de la alolactosa, un metabolito de lactosa que desencadena la transcripción del operón *lac*, y por lo tanto se usa para inducir la expresión de proteínas donde el gen está bajo el control del operador de *lac*.

De manera similar, la(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) formar parte de un gen híbrido que codifica secuencias polipeptídicas adicionales, por ejemplo, una secuencia que funciona como marcador o indicador. Ejemplos de genes marcadores e indicadores que incluyen beta-lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina desaminasa (ADA), aminoglucósido fosfotransferasa dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina quinasa (TK), lacZ (que codifica beta-galactosidasa) y xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Como ocurre con muchos de los procedimientos estándar asociados con la práctica de la divulgación, los expertos en la técnica conocerán reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden cumplir la función de un marcador o indicador.

Los polinucleótidos recombinantes pueden codificar enzimas SHC tales como la SHC de tipo silvestre o una variante de la misma, que se pueden insertar en un vector para expresión y purificación opcional. Un tipo de vector es un plásmido que representa un bucle circular de ADN bicatenario en el que se ligan segmentos de ADN adicionales. Ciertos vectores pueden controlar la expresión de genes a los que están funcionalmente unidos. Estos vectores se denominan "vectores de expresión". Normalmente, los vectores de expresión adecuados para técnicas de recombinación de ADN son del tipo plásmido. Típicamente, un vector de expresión comprende un gen tal como el SHC de tipo silvestre o una variante del mismo. En la presente descripción, los términos "plásmido" y "vector" se usan indistintamente puesto que el plásmido es el tipo de vector que se usa con más frecuencia.

Dichos vectores pueden incluir secuencias de ADN que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ADN que no están presentes de forma natural en la célula hospedadora, secuencias de ADN que normalmente no se transcriben en ARN o traducen a una proteína ("expresadas") y otros genes o secuencias de ADN que se desea introducir en el hospedador no recombinante. Se apreciará que típicamente el genoma de un hospedador recombinante se aumenta mediante la introducción estable de uno o más genes recombinantes. Sin embargo, también se pueden usar plásmidos o vectores autónomos o replicativos dentro del alcance de esta divulgación. Además, la presente divulgación se puede poner en práctica usando un número de copias bajo, por ejemplo, una sola copia, o un plásmido o vector con un número de copias alto.

En una realización preferida, el vector de la presente divulgación comprende plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, cromosomas bacterianos artificiales y de levadura artificiales, construcciones de inactivación ("knock-out") o inserción ("knock-in"), secuencias de ácido nucleico sintético o casetes y los subconjuntos se pueden producir en forma de polinucleótidos lineales, plásmidos, megaplásmidos, cromosomas sintéticos o artificiales, tales como cromosomas artificiales de plantas, bacterias, mamíferos o levaduras.

Se prefiere que las proteínas codificadas por el polinucleótido introducido se produzcan dentro de la célula tras la introducción del vector. Los diversos sustratos génicos se pueden incorporar en plásmidos. Los plásmidos son a menudo vectores de clonación estándar, por ejemplo, plásmidos de múltiples copias bacterianas. Los sustratos se pueden incorporar en el mismo plásmido o en diferentes plásmidos. A menudo, se usan al menos dos tipos diferentes de plásmidos que tienen diferentes tipos de marcadores seleccionables para permitir la selección de células que contienen al menos dos tipos de vectores.

Típicamente, las células bacterianas o de levadura se pueden transformar con una cualquiera o más de las siguientes secuencias de nucleótidos como es bien conocido en la técnica. Para recombinación *in vivo*, el gen que se va a recombinar con el genoma u otros genes se usa para transformar el hospedador usando técnicas de transformación estándar. En una realización adecuada, el ADN que proporciona un origen de replicación se incluye en la construcción. El origen de replicación puede ser seleccionado adecuadamente por el experto. Dependiendo de la naturaleza de los genes, puede que no se requiera un origen de replicación complementario si las secuencias ya están presentes con los genes o el genoma que son operables como orígenes de replicación en sí mismos.

Una célula bacteriana o de levadura se puede transformar mediante ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN se

ha introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede estar integrado o no, es decir, covalentemente unido al genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener en un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada de forma estable es aquella en la que el ADN transfectedo se ha llegado a integrar en un cromosoma de modo que las células hijas lo heredan a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota de establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante.

Generalmente, el ADN introducido no reside originalmente en el hospedador que es el receptor del ADN, pero está dentro del alcance de la divulgación aislar un segmento de ADN de un hospedador dado y posteriormente introducir una o más copias adicionales de ese ADN en el mismo hospedador, por ejemplo, para potenciar la producción del producto de un gen o alterar el patrón de expresión de un gen. En algunos casos, el ADN introducido modificará o incluso reemplazará un gen o secuencia de ADN endógenos mediante, por ejemplo, recombinación homóloga o mutagénesis dirigida al sitio. Los hospedadores recombinantes adecuados incluyen microorganismos, células vegetales y plantas.

La presente divulgación también presenta hospedadores recombinantes. El término "hospedador recombinante", también denominado "célula hospedadora genéticamente modificada" o "célula transgénica", indica una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico heterólogo o cuyo genoma se ha aumentado en al menos una secuencia de ADN incorporada. Una célula hospedadora de la presente divulgación se puede modificar mediante ingeniería genética con el polinucleótido o el vector como se ha descrito anteriormente.

Las células hospedadoras que se pueden usar para los propósitos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, células procariotas tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*), que se pueden transformar, por ejemplo, con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido, cromosoma artificial bacteriano o ADN de cósmido que contienen las moléculas de polinucleótido de la divulgación; células eucariotas simples como la levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*), que se pueden transformar, por ejemplo, con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la molécula de polinucleótido de la divulgación. Dependiendo de la célula hospedadora y del vector respectivo usado para introducir el polinucleótido de la divulgación, el polinucleótido puede integrarse, por ejemplo, en el cromosoma o el ADN mitocondrial o se puede mantener extracromosómicamente como, por ejemplo, episómicamente o solo puede estar comprendido transitoriamente en las celdas.

El término "célula" como se usa en el presente documento en particular con referencia a la ingeniería genética y la introducción de uno o más genes o un grupo ensamblado de genes en una célula, o una célula de producción se entiende que se refiere a cualquier célula procariota o eucariota. Las células hospedadoras procariotas y eucariotas se contemplan ambas para su uso según la divulgación, incluidas las células hospedadoras bacterianas como *E. coli* o *Bacillus sp*, células hospedadoras de levadura, tales como *S. cerevisiae*, células hospedadoras de insectos, tales como *Spodoptera frugiperda* o células hospedadoras humanas, tales como HeLa y Jurkat.

Específicamente, la célula es una célula eucariota, preferiblemente una célula fúngica, de mamífero o vegetal, o una célula procariota. Las células eucariotas adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células de mamífero, células de levadura o células de insecto (incluida la Sf9), células de anfibios (incluidas las células de melanóforo) o células de gusanos que incluyen células de *Caenorhabditis* (incluido *Caenorhabditis elegans*). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células COS (incluidas Cos-1 y Cos-7), células CHO, células HEK293, células HEK293T, células HEK293 T-RexTM u otras líneas celulares eucariotas transfectables. Las células bacterianas adecuadas incluyen, sin limitación *E. coli*.

Preferiblemente, se pueden usar procariotas, tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, o células de mamíferos, como células HeLa o células Jurkat, o células vegetales, como *Arabidopsis*.

Preferiblemente, la celda es una *Aspergillus sp* o una célula fúngica, preferiblemente, se puede seleccionar del grupo que consiste en los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Aspergillus*.

Preferiblemente, la célula hospedadora de *E. coli* es una célula hospedadora de *E. coli* que es reconocida por la industria y las autoridades reguladoras (incluyendo, pero no limitado a, una célula hospedadora de *E. coli* K12 o como se demuestra en los Ejemplos, una célula hospedadora de *E. coli* BL21).

Una célula hospedadora preferida para usarse con la presente divulgación es *E. coli*, que se puede preparar de forma recombinante como se describe en el presente documento. Por tanto, el hospedador recombinante puede ser una célula hospedadora de *E. coli* recombinante. Hay genotecas de mutantes, plásmidos, modelos informáticos detallados del metabolismo y otra información disponible para *E. coli*, lo que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el rendimiento del producto. Métodos similares a los descritos anteriormente para *Saccharomyces* se pueden usar para producir microorganismos de *E. coli* recombinantes.

En una realización, el microorganismo de *E. coli* recombinante comprende secuencias de nucleótidos que codifican los genes de SHC o equivalentes/homologías funcionales de los mismos que incluyen, pero no se limitan a, variantes, mutantes homólogos, derivados o fragmentos de los mismos.

Otra célula hospedadora preferida para usarse con la presente divulgación es *S. cerevisiae* que es un organismo chasis ampliamente usado en biología sintética. Por tanto, el hospedador recombinante puede ser *S. cerevisiae*. Hay genotecas de mutantes, plásmidos, modelos informáticos detallados del metabolismo y otra información disponible para *S. cerevisiae*, lo que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el rendimiento del producto. Se conocen métodos para producir microorganismos de *S. cerevisiae* recombinantes.

El cultivo de células se realiza de forma convencional. El medio de cultivo contiene una fuente de carbono, al menos una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas y se le añaden vitaminas. Los constituyentes de este medio pueden ser los que se usan convencionalmente para el cultivo de las especies de microorganismo en cuestión.

Las fuentes de carbono de uso en el presente método incluyen cualquier molécula que pueda ser metabolizada por la célula hospedadora recombinante para facilitar el crecimiento y/o la producción de (-)-Ambrox. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sacarosa (por ejemplo, como se encuentra en melazas), fructosa, xilosa, glicerol, glucosa, celulosa, almidón, celobiosa u otro polímero que contiene glucosa.

En realizaciones que emplean levadura como hospedador, por ejemplo, son adecuadas las fuentes de carbono tales como sacarosa, fructosa, xilosa, etanol, glicerol y glucosa. La fuente de carbono se puede proporcionar al organismo hospedador durante todo el período de cultivo o, alternativamente, el organismo se puede cultivar durante un período de tiempo en presencia de otra fuente de energía, por ejemplo, proteína, y a continuación se le puede proporcionar una fuente de carbono solo durante la fase de alimentación semicontinua.

La idoneidad de un microorganismo de célula hospedadora recombinante para su uso en los métodos de la presente divulgación se puede determinar mediante procedimientos de ensayo sencillos usando métodos bien conocidos. Por ejemplo, el microorganismo que se va a ensayar se puede propagar en un medio rico (por ejemplo, medio LB, medio de extracto de levadura Bacto-triptona, medio nutritivo y similares) a un pH, temperatura y en condiciones de aireación comúnmente usadas para la propagación del microorganismo. Una vez que se seleccionan los microorganismos recombinantes (es decir, células hospedadoras recombinantes) que producen los productos deseados de bioconversión, los productos se producen típicamente por una línea de células hospedadoras de producción a gran escala mediante sistemas de expresión adecuados y fermentaciones, por ejemplo, por producción microbiana en cultivo celular.

En una realización de la presente divulgación, se usa un medio mínimo definido tal como M9A para el cultivo celular. Los componentes del medio M9A comprenden: 14 g/l de KH_2PO_4 , 16 g/l de K_2HPO_4 , 1 g/l de $\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7,5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g/l de glucosa y 1,25 g/l de extracto de levadura).

En otra realización de la presente divulgación, se usó un medio rico en nutrientes tal como LB (Luria-Bertani). Los componentes de LB comprenden: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl).

Otros ejemplos de medio mineral y medio mineral M9 se divulgan, por ejemplo, en los documentos US 6524831B2 y US 2003/0092143A1.

El microorganismo recombinante se puede cultivar en un proceso discontinuo, semicontinuo o continuo o combinaciones de los mismos. Típicamente, el microorganismo recombinante se cultiva en un fermentador a una temperatura definida en presencia de una fuente de nutrientes adecuada, por ejemplo, una fuente de carbono, durante un período de tiempo deseado para bioconvertir homofarnesol en (-)-Ambrox en una cantidad deseada.

Las células hospedadoras recombinantes se pueden cultivar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante cultivo discontinuo o cultivo semicontinuo. Como se usa en el presente documento, el término "cultivo discontinuo" es un método de cultivo en el que el medio de cultivo no se añade ni se retira durante el cultivo. Como se usa en el presente documento, el término "semicontinuo" significa un método de cultivo en el que se añade medio de cultivo durante el cultivo pero no se extrae medio de cultivo.

Una realización de la presente divulgación proporciona un método para producir (-)-Ambrox en un sistema celular que comprende producir SHC de tipo silvestre o variantes de la misma en condiciones adecuadas en un sistema celular, alimentar con homofarnesol al sistema celular, convertir el homofarnesol en (-)-Ambrox usando la SHC o variantes producidas usando el sistema celular, recoger (-)-Ambrox del sistema celular y aislar el (-)-Ambrox del sistema. La expresión de otras secuencias de nucleótidos puede servir para mejorar el método. El método de bioconversión puede incluir la expresión adicional de otras secuencias de nucleótidos en el sistema celular. La expresión de otras secuencias de nucleótidos puede mejorar la ruta de bioconversión para producir (-)-Ambrox.

Una realización adicional de la presente divulgación es un método de bioconversión para producir (-)-Ambrox que comprende cultivar células hospedadoras que comprenden genes de SHC de tipo silvestre o variantes, que producen SHC de tipo silvestre o enzimas variantes en las células hospedadoras, alimentar homofarnesol (por ejemplo, EEH) a las células hospedadoras, incubar las células hospedadoras en condiciones de pH, temperatura y agente solubilizante adecuado para promover la conversión de homofarnesol en Ambrox y recoger (-)-Ambrox. La producción de la SHC de tipo silvestre o enzimas variantes en las células hospedadoras proporciona un método para producir (-)-Ambrox cuando se añade homofarnesol a las células hospedadoras en condiciones de reacción adecuadas. La conversión lograda se puede mejorar añadiendo más biocatalizador y SDS a la mezcla de reacción.

El microorganismo de la célula hospedadora recombinante se puede cultivar de varias formas para proporcionar células en cantidades adecuadas que expresen la SHC de tipo silvestre o enzimas variantes para la etapa de bioconversión posterior. Puesto que los microorganismos aplicables para la etapa de bioconversión varían ampliamente (por ejemplo, levaduras, bacterias y hongos), las condiciones de cultivo se ajustan, por supuesto, a los requisitos específicos de cada especie y estas condiciones son bien conocidas y documentadas. Cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para el cultivo de células de microorganismos celulares hospedadores recombinantes se puede usar para producir las células utilizables en la etapa de bioconversión posterior de la presente divulgación. Típicamente, las células se cultivan a una densidad particular (medible como densidad óptica (DO)) para producir una biomasa suficiente para la reacción de bioconversión. Las condiciones de cultivo elegidas influyen no solo en la cantidad de células obtenidas (la biomasa), sino que la calidad de las condiciones de cultivo también influye en cómo la biomasa se convierte en biocatalizador. El microorganismo de la célula hospedadora recombinante que expresa los genes de SHC de tipo silvestre o variantes y que produce la SHC de tipo silvestre o enzimas variantes se denomina biocatalizador que es adecuado para su uso en una reacción de bioconversión. En algunas realizaciones, el biocatalizador es una célula completa recombinante que produce SHC de tipo silvestre o enzimas variantes o puede estar en suspensión o en un formato inmovilizado.

En una realización, el biocatalizador se produce en cantidades suficientes (para crear una biomasa suficiente), se recoge y se lava (y opcionalmente se almacena (por ejemplo, congelado o liofilizado)) antes de la etapa de bioconversión.

En una realización adicional, las células se producen en cantidades suficientes (para crear un biocatalizador suficiente) y a continuación se ajustan las condiciones de reacción sin necesidad de recoger y lavar el biocatalizador para la reacción de bioconversión. Este método de una sola etapa (o "un solo recipiente") es ventajoso ya que simplifica el proceso al tiempo que reduce los costos. El medio de cultivo usado para cultivar las células también es adecuado para su uso en la reacción de bioconversión siempre que las condiciones de reacción se ajusten para facilitar la reacción de bioconversión.

Los métodos de bioconversión de la presente divulgación se llevan a cabo en condiciones de tiempo, temperatura, pH y agente solubilizante para proporcionar la conversión de la materia prima de homofarnesol en (-)-Ambrox. El pH de la mezcla de reacción puede estar en el intervalo de 4 a 8, preferiblemente de 5 a 6,5, más preferiblemente de 4,8 a 6,0 para las enzimas variantes de SHC y en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0 para la enzima SHC de tipo silvestre y se puede mantener mediante la adición de tampones a la mezcla de reacción. Un ejemplo de tampón para este propósito es un tampón de ácido cítrico. La temperatura preferida está entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 45 °C, preferiblemente aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C, aunque puede ser más alta, hasta 55 °C para organismos termófilos, especialmente si se usa la enzima de tipo silvestre de un microorganismo termófilo. La temperatura se puede mantener constante o se puede alterar durante el proceso de bioconversión.

El solicitante ha demostrado que puede ser útil incluir un agente solubilizante (por ejemplo, un tensioactivo, detergente, potenciador de la solubilidad, disolvente orgánico miscible en agua y similares) en la reacción de bioconversión. Los ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, Triton X-100, Tween 80, taurodesoxicolato, taurodesoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS) y/o lauril sulfato de sodio (SLS).

El solicitante ha seleccionado e identificado SDS como agente solubilizante particularmente útil de una larga lista de otros agentes solubilizantes menos útiles. En particular, el solicitante identificó SDS como un agente solubilizante notablemente mejor que por ejemplo Triton X-100 en términos de velocidad de reacción y rendimiento para la reacción de bioconversión de homofarnesol en (-)-Ambrox.

Sin desear estar ligado a teoría alguna, el uso de SDS con células hospedadoras microbianas recombinantes puede ser ventajoso ya que el SDS puede interactuar ventajosamente con la membrana de la célula hospedadora para hacer que la enzima SHC (que es una enzima unida a la membrana) sea más accesible al sustrato de homofarnesol. Además, la inclusión de SDS a un nivel adecuado en la mezcla de reacción puede mejorar las propiedades de la emulsión (homofarnesol en agua) y/o mejorar el acceso del sustrato de homofarnesol a la enzima SHC dentro de la célula hospedadora mientras que al mismo tiempo prevenir la alteración (por ejemplo, desnaturalización/inactivación de la SHC de tipo silvestre o enzima variante).

La concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS) usado en la reacción de bioconversión está influenciada por la cantidad de biomasa y la concentración de sustrato (EEH). Es decir, existe un grado de interdependencia entre la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS), la cantidad de biomasa y la concentración de sustrato (EEH). A modo de ejemplo, a medida que aumenta la concentración de sustrato de homofarnesol, se requieren cantidades suficientes de biocatalizador y agente solubilizante (por ejemplo, SDS) para que tenga lugar una reacción de bioconversión eficaz. Si, por ejemplo, la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS) es demasiado baja, se puede observar una conversión de homofarnesol subóptima. Por otro lado, si, por ejemplo, la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS) es demasiado alta, entonces puede existir el riesgo de que el biocatalizador se vea afectado por la alteración de la célula microbiana intacta y/o una desnaturalización/inactivación de la enzima SHC/HAC.

La selección de una concentración adecuada de SDS en el contexto de la cantidad de biomasa y la concentración de sustrato (EEH) está dentro del conocimiento del experto. A modo de ejemplo, el experto dispone de un modelo

predictivo para determinar las concentraciones adecuadas de SDS, sustrato (EEH) y biomasa.

La temperatura de la reacción de bioconversión para una enzima SHC de tipo silvestre es de aproximadamente 45 a 60 °C, preferiblemente 55 °C.

- 5 El intervalo de pH de la reacción de bioconversión para una enzima SHC de tipo silvestre es de aproximadamente 5,0 a 7,0, más preferiblemente de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,2, incluso más preferiblemente de aproximadamente 6,0.

La temperatura de la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC es de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 50 °C, preferiblemente de aproximadamente 35 °C.

- 10 El pH de la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC es de aproximadamente 4,8 a 6,4, preferiblemente de aproximadamente 5,2 a 6,0.

Preferiblemente, el agente solubilizante usado en la reacción de bioconversión es SDS.

La relación [SDS]/[células] está en el intervalo de aproximadamente 10:1 a 20:1, preferiblemente aproximadamente 15:1 a 18:1, preferiblemente aproximadamente 16:1 cuando la relación de biocatalizador y homofarnesol EEH es de aproximadamente 2:1.

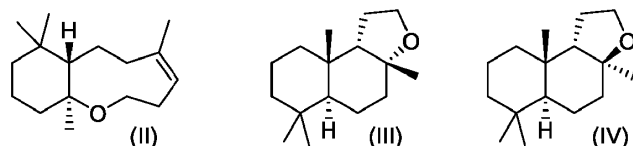
- 15 La concentración de SDS en la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC está en el intervalo de aproximadamente 1 a 2 %, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1,4 a 1,7 %, incluso más preferiblemente aproximadamente 1,5 % cuando la concentración de homofarnesol es de aproximadamente 125 g/l de EEH y la concentración de biocatalizador es de 250 g/l (correspondiente a una DO de aproximadamente 175 (650 nm)).

- 20 La relación de biocatalizador y sustrato de homofarnesol EEH está en el intervalo de aproximadamente 0,5:1 a 2:1, en algunas realizaciones 2:1, preferiblemente aproximadamente 1:1 o 0,5:1.

- 25 En algunas realizaciones, (-)-Ambrox se produce usando un biocatalizador al que se añade el sustrato de homofarnesol. Es posible añadir el sustrato mediante la alimentación usando medios conocidos (por ejemplo, bomba peristáltica, jeringa de infusión y similares). El homofarnesol es un compuesto soluble en aceite y se presenta en formato de aceite. Dado que el biocatalizador está presente en una fase acuosa, la reacción de bioconversión se puede considerar como un sistema de dos fases cuando se añade homofarnesol a la mezcla de reacción de bioconversión. Este es el caso incluso cuando está presente un agente solubilizante (por ejemplo, SDS).

Más detalles de un proceso de bioconversión adecuado se divulgan en los ejemplos, que se exponen a continuación en el presente documento.

- 30 El proceso de bioconversión anterior produce una mezcla de reacción que contiene el (-)-Ambrox deseado y también varios subproductos. Más particularmente, la mezcla de reacción contiene, además de (-)-Ambrox, una mezcla compleja de subproductos, que incluye un nuevo isómero constitucional de (-)-Ambrox según la fórmula (II), así como estereoisómeros conocidos de (-)-Ambrox según las fórmulas (III) y (IV)



- 35 El solicitante cree, aunque no pretende ceñirse a ninguna teoría en particular, que el compuesto de fórmula (II) se forma mediante la ciclación del isómero geométrico 7E,3Z del homofarnesol. Se ha descrito como prácticamente inodoro, con un umbral de detección de >500 ng/l.

Como se indicó anteriormente, el solicitante cree que el compuesto de fórmula (II) es una molécula nueva.

Se divulgan además los ingredientes de perfume y las composiciones de perfume que consisten en o comprenden el compuesto (II), así como artículos perfumados que lo contienen.

- 40 Se divulga además el uso del compuesto de fórmula (II) como ingrediente de perfume en aplicaciones de perfumería, tales como perfumes finos o composiciones de perfumes funcionales tales como composiciones de cuidado personal, cuidado del hogar y cuidado de tejidos.

Se divulgan además mezclas de (-)-Ambrox y una cantidad olfativamente aceptable de compuesto (II).

- 45 El término "cantidad olfativa aceptable" como se usa en el presente documento en relación con el compuesto de fórmula (II), o cualquiera de los otros subproductos (III) o (IV), o de hecho, cualquier material que pueda estar presente como impureza en (-)-Ambrox formado de acuerdo con el método divulgado, se entiende que significa que el compuesto o material está presente en una mezcla con (-)-Ambrox en una cantidad por debajo de su umbral de

detección de olor, o en una cantidad en la que no aportará sus características olfativas de forma que afecte al carácter olfativo de (-)-Ambrox. (-)-Ambrox que contiene una cantidad olfativamente aceptable de cualquiera de dicho compuesto o material sería identificable para un perfumista experto ya que posee el carácter de olor de los grados comerciales de (-)-Ambrox, tales como AMBROFIX™ obtenido mediante un procedimiento sintético ex-esclareol y disponible en Givaudan.

En realizaciones preferidas, la mezcla de reacción no contiene, o sustancialmente no contiene, homofarnesol sin reaccionar.

El solicitante descubrió que el homofarnesol era un potente disolvente para (-)-Ambrox así como para los subproductos anteriormente mencionados del proceso de bioconversión. Como tal, en presencia de cantidades apreciables de homofarnesol, (-)-Ambrox y los subproductos permanecen disueltos juntos en una mezcla bruta e intratable, de la cual es difícil, prolongado y costoso separar y finalmente aislar (-)-Ambrox en forma olfativamente pura. Se encontró que la reducción del nivel de homofarnesol sin reaccionar en la mezcla con (-)-Ambrox y los compuestos (II), (III) y (IV) facilita considerablemente el procesamiento posterior y el aislamiento/purificación de (-)-Ambrox.

El procesamiento posterior, como apreciarán los expertos en la técnica, es una operación crítica en la fabricación de compuestos útiles formados por procesos de bioconversión. Como parte de la síntesis de un compuesto, puede afectar a las propiedades físicas del compuesto. En el caso de la preparación de ingredientes de perfume mediante métodos biotecnológicos, es deseable que un compuesto objetivo pueda separarse de una mezcla de reacción en forma olfativamente pura para que las características de olor deseadas del compuesto objetivo no se distorsionen por las contribuciones de olor de la mezcla compleja de contaminantes y subproductos que pueden estar presentes en el medio de fermentación o el biocatalizador.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para aislar y purificar (-)-Ambrox a partir de una mezcla de reacción, que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV).

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para mejorar o potenciar el olor de (-)-Ambrox, que comprende las etapas de separación y purificación de (-)-Ambrox a partir de una mezcla de reacción que contiene uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV).

En forma aislada y purificada, (-)-Ambrox no contiene ninguno de los compuestos (II), (III) o (IV), o si contiene alguno de dichos compuestos, entonces cada uno debería estar presente en una cantidad olfativamente aceptable.

La mezcla de reacción obtenida del proceso de bioconversión, tal como un proceso como se ha descrito anteriormente en el presente documento, generalmente comprende una fase sólida que contiene (-)-Ambrox bruto y uno o más de los subproductos (II), (III) y (IV), así como material celular y/o residuos del mismo; y una fase líquida o fases líquidas que comprenden agua y/o cualquier homofarnesol sin reaccionar.

La fase sólida se puede separar de la fase o fases líquidas mediante filtración o centrifugación. Además, al seleccionar un filtro con un tamaño de poro apropiado, también es posible efectuar la separación del (-)-Ambrox bruto, del material celular y/o residuos. Una vez que el (-)-Ambrox bruto se separa del material celular y/o los residuos del mismo, se puede lavar, antes de someterlo a más procedimientos de tratamiento final ("work up") para aislar (-)-Ambrox de los compuestos (II), (III) y (IV).

Alternativamente, en lugar de filtración o centrifugación, la mezcla de reacción se puede calentar a una temperatura por encima del punto de fusión de (-)-Ambrox, después de lo cual (-)-Ambrox forma una fase oleosa por encima de una fase acuosa que contiene el material celular y los residuos. Opcionalmente, y con el fin de asegurar una recuperación completa de (-)-Ambrox, el material acuoso y celular se puede lavar con un disolvente orgánico inmiscible en agua (tal como tolueno) para retirar cualquier (-)-Ambrox residual que pueda haber sido arrastrado en la fase acuosa, y estos lavados se pueden combinar con la fase oleosa. Posteriormente, la fase oleosa se puede concentrar por evaporación para proporcionar una mezcla bruta que comprende (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), mezcla que a continuación se puede someter a procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar y purificar (-)-Ambrox.

En otra realización, en lugar de calentar la mezcla de reacción para formar una fase oleosa que contiene (-)-Ambrox, la mezcla de reacción se puede extraer con un disolvente orgánico inmiscible en agua adecuado (tal como tolueno) para formar una fase orgánica que contenga (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), que se pueden separar de una fase acuosa que contiene el material celular y los residuos. La fase orgánica se puede concentrar por evaporación para proporcionar una mezcla bruta que comprende (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), que se pueden someter a procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar y purificar (-)-Ambrox.

En otro método alternativo más, la mezcla de reacción se puede destilar por arrastre con vapor para separar del destilado del material celular y los residuos. El destilado se puede recoger como una mezcla bifásica, antes de que la fase oleosa de la mezcla bifásica que comprende una mezcla de (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV) se separe de la fase acuosa, y a continuación se somete a procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar y purificar (-)-Ambrox.

Dicho método de aislamiento y purificación de (-)-Ambrox comprende la etapa de cristalizar selectivamente (-)-Ambrox a partir de una mezcla que contiene uno o más de los compuestos (II), (III) o (IV).

La frase "cristalizar selectivamente" se refiere a una etapa del proceso mediante la que se hace que (-)-Ambrox cristalice de un disolvente, mientras que los compuestos (II), (III) y (IV) permanecen disueltos en el disolvente de cristalización, hasta tal punto que ese material cristalino aislado contiene solo (-)-Ambrox, o si contiene alguno de los compuestos (II), (III) o (IV), entonces están presentes solo en cantidades olfativamente aceptables.

La cristalización se puede llevar a cabo en un disolvente orgánico adecuado. La elección del disolvente se basa en consideraciones tales como diferencias de solubilidad a temperatura ambiente y a altas temperaturas, o en disolvente hirviendo; y por la necesidad de una gran cantidad de cristales recuperables en disolvente frío. Normalmente, un compuesto que se va a separar se disuelve en un disolvente relativamente polar y a continuación se puede añadir un disolvente relativamente menos polar para llevar el compuesto disuelto a su límite de solubilidad, después de lo cual comenzará a cristalizar. Además, en un proceso industrial, las cuestiones de costo así como la seguridad de la manipulación son relevantes. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, metanol, acetona, éter de petróleo, hexano, t-butil metil éter, THF y acetato de etilo. Los disolventes preferidos incluyen tolueno o alcohol etílico. También se pueden emplear pares de disolventes.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, la cristalización selectiva se lleva a cabo disolviendo la mezcla que contiene (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV) en etanol caliente y dejando que (-)-Ambrox se cristalice selectivamente añadiendo lentamente un no disolvente, tal como agua, a la solución etanólica de enfriamiento.

Teniendo en cuenta la estrecha relación estructural de (-)-Ambrox y los compuestos subproductos (II), (III) y (IV), que son respectivamente un isómero constitucional y dos estereoisómeros de (-)-Ambrox, fue notable que (-)-Ambrox podría cristalizarse selectivamente a partir de dicha mezcla, para proporcionar (-)-Ambrox en forma olfativamente pura y con altos rendimientos. El experto en la técnica podría anticipar razonablemente que los compuestos cristalizarían conjuntamente con (-)-Ambrox, haciendo que el procesamiento posterior sea mucho más complejo, lento y costoso de lo que se encontró que era el caso.

La manera sorprendentemente fácil en la que (-)-Ambrox se podría separar de una mezcla que contiene el compuesto (II), (III) y/o (IV) por cristalización representa una ventaja particular de la presente invención.

La facilidad con la que se pudo separar (-)-Ambrox por cristalización se podría contrastar con la observación de que no se podría recuperar (-)-Ambrox de una manera tan fácil y con tan alto rendimiento a partir de una mezcla que contenga (II), (III) y/o (IV) por otras técnicas de purificación, tales como por destilación, debido a los puntos de ebullición muy similares de (-)-Ambrox y los subproductos (II), (III) y (IV).

El término "olfativamente puro", como se usa en relación con (-)-Ambrox, pretende significar que (-)-Ambrox está libre de compuestos (II), (III) o (IV), o cualquier otro material encontrado en la mezcla de reacción, o que si dichos compuestos o materiales debieran estar presentes, están presentes en cantidades olfativamente aceptables, como se define ese término en el presente documento.

(-)-Ambrox en forma olfativamente pura contiene menos del 5 % en peso de cualquiera de los compuestos (II), (III) o (IV).

En realizaciones más particulares, (-)-Ambrox en forma olfativamente pura contiene menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, menos del 0,9 %, menos del 0,8 %, menos del 0,7 %, menos del 0,6 %, menos del 0,5 %, menos del 0,4 %, menos del 0,3 %, menos del 0,2 %, menos del 0,1 % o menos del 0,05 % en peso de cada uno de los compuestos (II), (III) o (IV).

La calidad de separación de (-)-Ambrox de la mezcla de los compuestos (II), (III) y/o (IV) por cristalización selectiva puede verse influida por la composición de la mezcla de la que se separa. Más particularmente, la calidad de la separación de (-)-Ambrox de una mezcla de compuestos (II), (III) y/o (IV) por cristalización se mejoró cuando la relación en peso de (-)-Ambrox y los otros compuestos (II), (III) y (IV) en la mezcla era superior a 70:30, más particularmente 80:20, más particularmente 90:10, aún más particularmente 95:5 y más particularmente aún 97:3.

Además, la calidad de la separación de (-)-Ambrox por cristalización puede verse influida por la cantidad de homofarnesol sin reaccionar presente en la mezcla de la que se separa. Más particularmente, la calidad de la separación se mejora cuando el nivel de homofarnesol sin reaccionar es menos del 30 % en peso, más particularmente menos del 20 % en peso, más particularmente menos del 10 % en peso, más particularmente aún menos del 5 % en peso y aún más particularmente menos del 3 % en peso, aún más particularmente menos del 2 % en peso, y más particularmente aún menos del 1 % en peso, basado en el peso de la mezcla a partir de la cual se cristaliza (-)-Ambrox.

Preferiblemente, los reactivos y las condiciones de reacción empleados en el proceso de bioconversión de la presente invención son de tal modo que la reacción procede con una conversión del 100 % de homofarnesol, o sustancialmente, sin dejar así homofarnesol sin reaccionar en la mezcla de reacción. Sin embargo, si está presente homofarnesol sin reaccionar, aunque económicamente desfavorable, se puede separar de (-)-Ambrox y otros subproductos por destilación, por ejemplo.

Por consiguiente, en una realización particular de la invención, se proporciona un método para aislar y purificar (-)-Ambrox a partir de una mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), cuya mezcla está libre, o sustancialmente libre, de homofarnesol.

- 5 El aislamiento y purificación de (-)-Ambrox a partir de una mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), y libre o sustancialmente libre de homofarnesol, se logra mediante la cristalización selectiva de (-)-Ambrox.

El (-)-Ambrox obtenido según un método de la presente invención se obtiene en forma olfativamente pura.

(-)-Ambrox en forma cristalina constituye otro aspecto más de la presente divulgación.

- 10 El (-)-Ambrox formado de acuerdo con el método de la presente invención se puede mezclar con uno o más ingredientes de perfume adicionales para formar composiciones de perfume que encuentran uso en aplicaciones de perfumería, incluido el uso en perfumería fina, así como uso en productos de consumo, tales como aplicaciones de cuidado personal, cuidado de tejidos y cuidado del hogar.

Por consiguiente, la divulgación proporciona en otro de sus aspectos una composición de perfume que comprende (-)-Ambrox y al menos otro ingrediente de perfume, en donde dicha composición de perfume contiene cantidades olfativamente aceptables de uno o más de los compuestos (II), (III) o (IV).

- 15 La invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Preparación de homofarnesol

Condiciones analíticas generales:

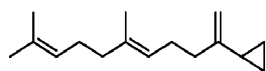
- 20 GC/MS no polar: 50 °C/2 min, 20 °C/min 200 °C, 35 °C/min 270 °C. GC/MS Agilent 5975C MSD con sistema de GC de la serie HP 7890A. Columna no polar: BPX5 de SGE, 5 % fenil 95 % dimetilpolisiloxano 0,22 mm x 0,25 mm x 12 m. Gas portador: helio. Temperatura del inyector: 230 °C. División 1:50. Flujo: 1,0 ml/min. Línea de transferencia: 250 °C. MS-cuadrupolo: 106 °C. Fuente de MS: 230 °C.

A) Preparación de MNU en THF

- 25 Se calienta una solución de urea (175 g, 2,9 mol) e hidrocloreto de metilamina (198 g, 2,9 mol) en agua (400 ml) a reflujo (105 °C) durante 3,5 h con agitación. A 40 °C se añade NaNO₂ (101 g, 1,45 moles) disuelto en agua (200 ml). Después de 15 min se añade THF (1.000 ml) lo que da como resultado una mezcla transparente de 2 fases. Se añade H₂SO₄ conc. (110 g, 1,1 mol) a 0 a 5 °C y se agita en 1,5 h. Después de otras 0,5 h a 0 a 5 °C, las dos fases transparentes se separan a 25 °C. La fase orgánica (A) (1.065 ml, teóricamente 1,35 M) se almacena durante unos días a 0 a 5 °C o se envía inmediatamente al reactor de ciclopropanación.
- 30

- Después de la separación de fases, se extrae la fase acuosa dos veces con THF (2 x 1 l). Esto da 1.100 ml de la fase B y 1.075 de la fase C. Mientras que la fase A da una conversión del 51 % de un alqueno terminal en un ciclopropano en una reacción de ciclopropanación posterior, la fase B da <0,5 % de ciclopropano y la fase C no da una conversión detectable. Concluimos que se extrae >99 % de MNU después de la primera separación de fases. Por lo tanto, normalmente la fase acuosa se descarta después de la primera separación de fases (de la fase orgánica A) después del tratamiento con KOH acuoso conc. y ácido acético.
- 35

B) Preparación de E-Δ-Farneseno usando MNU en THF



- 40 Se añade gota a gota N-metil-N-nitroso urea 1,35 M en THF (136 ml, 184 mmol) a 0 °C a una mezcla rápidamente agitada de E-beta-farneseno (CAS 18794-84-8) (25 g, 122 mmol) y KOH acuoso (50 ml, 40 %) a 0 a 5 °C. Después de la adición de 4 ml de la solución de MNU, se añade Pd(acac)₂ (7,4 mg, 0,024 mmol, 0,02 %) disuelto previamente en 0,5 ml de diclorometano. La solución de MNU restante se añade durante 4 h a 0 a 5 °C. Una GC en esta etapa mostró 28 % de E-beta-Farneseno no convertido, 65 % del monociclopropano deseado (mostrado arriba) y 3 % de un compuesto 5 bisciclopropanado. Después de 16 h a 25 °C, se añade ácido acético (100 ml) a 0 a 5 °C, a continuación
- 45 terc-butil metil éter (250 ml). Después de la separación de fases, la fase orgánica se lava con HCl 2 M (250 ml) y la fase acuosa se extrae con terc-butil metil éter (250 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 100 ml), NaOH acuoso al 10 % (2 x 100 ml) y agua (2 x 100 ml), se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran para dar 26,9 g de un líquido ligeramente amarillo que contiene 9 % de E-beta-Farneseno, 82 % del compuesto de monociclopropano deseado y 6 % de un subproducto bisciclopropanado.

- 50 El compuesto deseado se podría aislar además mediante purificación por destilación.

La adición de 1g de K_2CO_3 (1 g) y la destilación sobre una columna de bobina de acero de 30 cm a 4×10^3 a 6×10^3 Pa (40 a 60 mbar) da 147 g de compuesto de monociclopropano (68 % corr) a 135 a 145 °C. Las fracciones se combinan para dar 92 g de compuesto monociclopropano de 100 % de pureza.

Datos analíticos de E- Δ Farneseno:

- 5 ^1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): 5,1 (2 m, 2 H), 4,6 (2 H), 2,2 (2 H), 2,1 (4 H), 2,0 (2 H), 1,7 (s, 3 H), 1,6 (2 s, 6 H), 1,3 (1 H), 0,6 (2 H), 0,45 (2 H) ppm. ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): 150,9 (s), 135,1 (s), 131,2 (s), 124,4 (d), 124,1 (d), 106,0 (t), 39,7 (t), 35,9 (t), 26,7 (t), 25,7 (q), 17,7 (q), 16,0 (d), 6,0 (t) ppm. GC/MS: 218 (2 %, M+), 203 (5 %, [M - 15]+), 175 (11 %), 147 (31 %), 134 (15 %), 133 (20 %), 121 (12 %), 107 (55 %), 95 (16 %), 93 (30 %), 91 (20 %), 82 (11 %), 81 (33 %), 79 (42 %), 69 (100 %), 67 (22 %), 55 (20 %), 53 (21 %), 41 (75 %). IR (película): 3081 (w), 2967 (m), 2915 (m), 2854 (m), 1642 (m), 1439 (m), 1377 (m), 1107 (w), 1047 (w), 1018 (m), 875 (s), 819 (m), 629 (w). Anal. calcd. para $C_{16}H_{26}$: C, 88,00; H, 12,00. Encontrado: C, 87,80; H, 12,01.

C) Preparación de (7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-ol ((7E)-homofarnesol)

- 15 Se calienta con agitación a 150 °C una mezcla de (E)-(6,10-dimetilundeca-1,5,9-trien-2-il)ciclopropano (E- Δ Farneseno) (1 g, 4,6 mmol), dodecano (0,2 g, 1,15 mmol, patrón interno) y ácido L-(+)-tartárico (1 g, 6,9 mmol) en un tubo de presión. Después de 18 h y conversión completa (según GC), la mezcla se vierte sobre agua (50 ml) y tolueno (50 ml). Las fases se separan y la fase acuosa se extrae con tolueno (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con Na_2CO_3 acuoso conc. (50 ml) y NaCl conc. (2 x 50 ml), se secan sobre $MgSO_4$, se filtran y se evaporan bajo presión reducida para dar una resina pardusca (1,35 g) que se mezcla con KOH acuoso al 30 % (4,3 ml) y se agita a 25 °C durante 2 h. El análisis de GC revela la formación de 96 % de (7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-ol según el patrón interno. Relación E/Z 68:22. Los datos analíticos del isómero E son consistentes con los de la bibliografía, véase por ejemplo P. Kocienski, S. Wadman *J. Org. Chem.* 54, 1.215 (1989).

Ejemplo 2

Preparación de plásmido de SHC y producción de biocatalizador

Preparación del plásmido de SHC

- 25 Se insertó el gen que codifica la escualeno-hopeno ciclasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) (GenBank M73834, Swissprot P33247) en el plásmido pET-28a(+), donde está bajo el control de un promotor T7 inducible por IPTG para la producción de proteínas en *Escherichia coli*. El plásmido se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) usando un protocolo estándar de transformación por choque térmico.

Cultivos en matraz de Erlenmeyer

- 30 Para la producción de proteínas se usó medio rico (medio LB) o medio mínimo. M9 es un ejemplo de medios mínimos que se usaron con éxito.

Preparación de medios

- 35 El medio mínimo elegido por defecto se preparó de la siguiente manera para 350 ml de cultivo: a 35 ml de solución madre de ácido cítrico/fosfato (133 g/l de KH_2PO_4 , 40 g/l de $(NH_4)_2HPO_4$, 17 g/g de ácido cítrico. H_2O con pH ajustado a 6,3) se añadieron 307 ml de H_2O , el pH se ajustó a 6,8 con NaOH al 32 % según era necesario. Después de esterilizar en autoclave 0,850 ml de $MgSO_4$ al 50 %, se añadieron 0,035 ml de solución de oligoelementos (composición en la siguiente sección), 0,035 ml de solución de tiamina y 7 ml de glucosa al 20 %.

Producción de biocatalizador de SHC (producción de biocatalizador)

- 40 Producción de biocatalizador a pequeña escala (SHC de tipo silvestre o variantes de SHC), se inocularon 350 ml de cultivo (medio suplementado con 50 μ g/ml de kanamicina) a partir de un precultivo de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que contiene el plásmido de producción de SHC. Las células se cultivaron hasta una densidad óptica de aproximadamente 0,5 (DO_{650nm}) a 37 °C con agitación constante (250 rpm).

- 45 A continuación, se indujo la producción de proteínas mediante la adición de IPTG a una concentración de 300 μ M seguido de incubación durante 5 a 6 horas más con agitación constante. La biomasa resultante se recogió finalmente por centrifugación, se lavó con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Las células se almacenaron como sedimentos a 4 °C o -20 °C hasta su uso posterior. En general, se obtuvieron de 2,5 a 4 gramos de células (peso húmedo) a partir de 1 litro de cultivo, independientemente del medio usado.

- 50 La fermentación se preparó y se realizó en reactores InforsHT de 750 ml. Al recipiente de fermentación se le añadieron 168 ml de agua desionizada. El recipiente de reacción estaba equipado con todas las sondas necesarias (pO_2 , pH, muestreo, antiespumante), alimentación de C + N y frascos de hidróxido de sodio y se esterilizó en autoclave. Después de la esterilización en autoclave, se añaden los siguientes ingredientes al reactor:

20 ml de 10x tampón de fosfato/ácido cítrico

14 ml de glucosa al 50 %

0,53 ml de solución de MgSO_4

2 ml de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,020 ml de solución de oligoelementos

5 0,400 ml de solución de tiamina

0,200 ml de caldo de kanamicina

Las condiciones de reacción se establecen de la siguiente manera: pH = 6,95, pO_2 = 40 %, T = 30 °C, agitación a 300 rpm. Cascada: punto de consigna de rpm a 300, min 300, max 1.000, punto de consigna de l/min de flujo 0,1, min 0, max 0,6. Control antiespumante: 1:9.

- 10 Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo semilla a una $\text{DO}_{650\text{nm}}$ de 0,4 a 0,5. Este cultivo semilla se cultivó en medio LB (+ Kanamicina) a 37 °C, 220 rpm durante 8 h. La fermentación se realizó primero en modo discontinuo durante 11,5 h, donde después se inició la alimentación de C + N con una solución de alimentación (solución de glucosa esterilizada (143 ml de H_2O + 35 g de glucosa) a la que se le había añadido tras la esterilización: 17,5 ml de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,8 ml de solución de MgSO_4 , 0,018 ml de solución de oligoelementos, 0,360 ml de solución de tiamina, 0,180 ml de solución madre de kanamicina. La alimentación se realizó a un caudal constante de aproximadamente 4,2 ml/h. Las mediciones de glucosa y NH_4^+ se hicieron externamente para evaluar la disponibilidad de las fuentes de C y N en el cultivo. Normalmente, los niveles de glucosa se mantienen muy bajos.

- 15 Los cultivos se cultivaron durante un total de aproximadamente 25 horas, donde alcanzaron típicamente una $\text{DO}_{650\text{nm}}$ de 40 a 45. A continuación, se inició la producción de SHC añadiendo IPTG a una concentración final de aproximadamente 1 mM en el fermentador (como pulso de IPTG o durante un período de 3 a 4 horas usando una jeringa de infusión), estableciendo la temperatura a 40 °C y pO_2 al 20 %. La inducción de la producción de SHC duró 16 h a 40 °C. Al final de la inducción, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón de ácido cítrico/citrato de sodio 0,1 M pH 5,4 y se almacenaron como sedimentos a 4 °C o -20 °C hasta su uso posterior.

Resultados la

- 25 En general, con todas las demás condiciones sin cambios, la actividad específica del biocatalizador producido fue mayor cuando se usó un medio mínimo en comparación con un medio rico.

La inducción se llevó a cabo con éxito a 30 o 37 °C. Se observó que cuando la inducción se hizo a 40 a 43 °C, se obtuvo un biocatalizador de mayor actividad específica.

Resultados lb

- 30 La siguiente Tabla 1 muestra, para los dos ejemplos, el volumen de cultivo, la densidad óptica y la cantidad de células tanto al inicio de la inducción como al final de la inducción, así como la cantidad de biomasa recogida (peso húmedo).

Tabla 1

	Volumen inicio de inducción (ml)	$\text{DO}_{650\text{nm}}$ inicio de inducción	Células calculadas (g)	Volumen final de inducción (ml)	$\text{DO}_{650\text{nm}}$, final de inducción	células recogidas (g)
Ejemplo 1	273	40	10,9	342	55	28
Ejemplo 2	272	44	12,0	341	57	23
$\text{DO}_{650\text{nm}}$ en la inoculación: 0,45 (Ejemplo 1) y 0,40 (Ejemplo 2). Volúmenes iniciales: 205 ml.						

Secuencia de aminoácidos de SHC de tipo silvestre (SEQ ID N.º 1 (GenBank M73834 Swissprot P33247))

MAEQLVĖAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWĖGPLLSNVTMEĖYVLLCHILDRVDRDRMEKIRRYĖLLHEQREDGTWĖLYPGGP
PDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMVPEIMFLGKRMPĖLNIYĖFGSWA
RATVVALSIVMSRQPVFFLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAEIRALDWLLERQAGD
GSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHĖPAFIKGWĖGLELYGVĖLDYGGWMFQASISPVWDTGLĖVLALRAAGLPADHDRLVKĖGEWL

35

LDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDNDNT
SDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIIRRAVEYLKREQKPDGWSWFGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGID
TREPYIQKALDWVEQHONPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEAAARRGVQYLIVETQRPDGGWDEPY
YTGTFPGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

Secuencia de aminoácidos de SHC variante F601Y (SEQ ID N.º 2) - variante con respecto a SEQ ID N.º 1

MAEQLV EAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLL SNVTMEAEYVLLCHI LDRVDRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGP
PDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIES SRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPVPEIMFLGKRMP LNIYEFGSWA
RATVVALSIVMSRQPVFFLPERARVPELYETDVP PRRRGAKGGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGD
GSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHFAFIKWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHRLVKAGEWL
LDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDNDNT
SDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIIRRAVEYLKREQKPDGWSWFGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGID
TREPYIQKALDWVEQHONPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEAAARRGVQYLIVETQRPDGGWDEPY
YTGTYPGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

Secuencia de nucleótidos de SHC variante F605W (SEQ ID N.º 3)

ATGGCTGAGCAGTTGGTGAAGCGCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCTCCTGCCAAAAGGACG
AAGGCTACTGGTGGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGTCCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGA
TCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCACGAGCAGCGCGAGGACGGCAGCTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCG
CCGGACCTCGACACGACCATCGAGGCGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGC
TCCGGTTCATTACAGACCCAGGCGGGATCGAGTCGTCGCGCGTGTTCACGCGGATGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATATCCGTG
GGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCTACGAGTTTGGCTCGTGGGCT
CGGGCGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCGTGCCTGAGCGGGCGCGCTGCCGAGCTGT
ACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCCAAGGGAGGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGCGCTGCACGG
GTATCAGAAGCTGTCGGTGCACCCGTTCCGCGCGCGCGCCGAGATCCGCGCCTTGGAAGTGGTGTCTCGAGCGCCAGGCGCGAGAC
GGCAGCTGGGGCGGGATTACAGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCGAGCATCCGGCGTTCA
TCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGTTTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTG
GGACACGGGCCTCGCGCTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCCGGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTG
TTGGACCGGCAGATCACGGTTCGGGGCGACTGGGCGGTGAAGCGCCCAACCTCAAGCGGGCGGGTTCGCGTTCCAGTTCGACA
ACGTGTACTACCCGACGTGGACGACACGGCCGTCGTGGTGTGGCGCTCAACACCTCGCGCTTGCCTGACGAGCGCGCGAGGCG
GGACGCCATGACGAAGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGCGGTTGGGGCGCCTACGACGTGACAAACAG
AGCGATCTCCGAACCATCCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGCGTCAGAGGACGTACCCGCCACGTGCTCG
AGTGTTCGCGAGCTTCGGGTACGATGACGCTTGAAGGTATCCGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGA
CGGCAGCTGGTTCGGTTCGTTGGGGCGTCAATTACCTCTACGGCAGCGGCGCGGTGGTGTGCGGCGTGAAGGCGGTTCGGGATCGAC
ACGCGCGAGCCGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACC CGGACGCGCGGTGGGGCGAGGACTGCCGCT
CGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCGTCGCGAGCGGCTGGGCGCTGATGGCGCTCATCGCGGCGG
CAGGGCGGAGTCCGAGGCGCGCGCGCGGCGTGAATACCTCGTGGAGACGCGCGCCCGGACGGCGGCTGGGATGAGCCGTAC
TACACCGGACGGGCTTCCAGGGGATTGGTACCTCGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCT
ACAAGCAAGCCATCGAGCGCAGGTGA

5

Secuencia de aminoácidos de SHC variante F605W (SEQ ID N.º 4) - variante con respecto a SEQ ID N.º 1

MAEQLV EAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLL SNVTMEAEYVLLCHI LDRVDRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGP
PDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIES SRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPVPEIMFLGKRMP LNIYEFGSWA
RATVVALSIVMSRQPVFFLPERARVPELYETDVP PRRRGAKGGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGD
GSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHFAFIKWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHRLVKAGEWL
LDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDNDNT
SDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIIRRAVEYLKREQKPDGWSWFGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGID
TREPYIQKALDWVEQHONPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEAAARRGVQYLIVETQRPDGGWDEPY
YTGTFPGDWYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

Ejemplo 3

10 Bioconversión de la mezcla de 7E, 3E/Z-homofarnesol

La bioconversión se emprendió usando las siguientes condiciones de reacción:

La reacción (150,1 g de volumen total) realizada en tampón de ácido cítrico/citrato de sodio 0,1 M pH 5,4 en un fermentador InforsHT de 750 ml contenía 146 g/l de homofarnesol total usando un sustrato de homofarnesol, que era una mezcla de 7E,3E:7E,3Z de 86:14, 250 g/l de células (formadas de acuerdo con el método del Ejemplo 2, fermentación) y SDS al 1,55 %. La reacción se realizó a 35 °C con agitación constante (900 rpm), el control del pH se hizo usando ácido cítrico al 10 al 40 % en agua.

La mezcla de reacción se sometió a etapas de aislamiento y purificación como se indica en el Ejemplo 4, a continuación.

Ejemplo 4

Procedimiento del procesamiento posterior

Una mezcla de reacción formada a partir de la bioconversión de 7E, 3E/Z-homofarnesol (86:14 3E:3Z) se sometió a destilación por arrastre con vapor. El destilado se recogió como una mezcla bifásica. Se retuvo la fase orgánica y se descartó la fase acuosa. La composición de la fase orgánica se analizó mediante GC y los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación (véase "bruto").

A continuación, la fase orgánica se concentró hasta sequedad. A continuación, se añadió etanol al producto seco bruto y la mezcla se calentó hasta que se disolvió el producto. A temperatura ambiente, se añade lentamente agua y (-)-Ambrox cristaliza con agitación ocasional y enfriamiento en un baño de hielo.

La Tabla 1 muestra los resultados de los análisis de GC para el producto cristalizado. Los datos muestran un fuerte enriquecimiento de (-)-Ambrox, sin que prácticamente se encuentren los subproductos (a), (b) o (c) en la muestra cristalizada.

Cabe señalar que en la Tabla 2, "a", "b" y "c" se refieren al compuesto (II), al compuesto (IV) y al compuesto (III) respectivamente. "EZH" y "EEH" se refieren a 7E,3Z-homofarnesol y 7E,3E-homofarnesol respectivamente.

Tabla 1

	Área de pico (GC)						(-)-Ambrox (%)
	a	b	c	(-)-Ambrox	EZH	EEH	
Bruto	215073	190376	588769	6751605	13429	14184	86,9
Cristalizado	10088	8951	64625	9032941	0	0	99,1

Ejemplo 5

Extracción de la fase sólida del caldo de reacción:

Dado que (-)-Ambrox no es soluble en agua y no es líquido a temperaturas inferiores a aproximadamente 75 °C, estas propiedades se tomaron como posibles ventajas para extraer el producto de la fase sólida de la biotransformación usando disolventes miscibles en agua (por ejemplo, etanol) y disolventes inmiscibles en agua (por ejemplo, tolueno).

Se centrifugaron 200 ml de caldo de reacción para separar el sólido de la fase líquida (acuosa) (Sorvall GS3, 5.000 rpm, 10 min, 10 °C). Esto separó aproximadamente 80 ml de sedimento sólido de aproximadamente 120 ml de fase líquida. El análisis (cromatografía de gases) de la fase acuosa después de la extracción con MTBE mostró que no contenía más de aproximadamente 0,3 % del (-)-Ambrox inicialmente presente en los 200 ml de caldo de reacción. Se usaron tolueno y etanol al 99 % para extraer (-)-Ambrox de la fase sólida.

Extracción de tolueno:

Se extrajeron 80 ml de fase sólida 6 veces con 45 ml de tolueno (aproximadamente ½ volumen de fase sólida, con agitación vigorosa durante 30 s, centrifugación (Sorvall GS3, 5.000 rpm, 10 min, 10 °C). La fase disolvente se analizó con GC para su contenido de (-)-Ambrox. Más del 99,5 % de (-)-Ambrox inicialmente presente en el caldo de reacción se extrajo con 6 extracciones que representaban un volumen total de tolueno de 1,35 veces el volumen del caldo de reacción completo inicial (200 ml) o 3,4 veces el volumen de la fase sólida.

Extracción de etanol:

Se extrajeron 80 ml de fase sólida (Infors Multifors HT, 35 °C, 1.000 rpm, 30 min) con aproximadamente 160 ml (2 volumen) de etanol al 99 %, seguido de centrifugación. (-)-Ambrox no cristalizó durante el procedimiento de extracción. Después de 4 lavados (un total de 640 ml de etanol, es decir, 3,2 veces el volumen del caldo de reacción completo inicial o 8 veces el volumen de la fase sólida), se recuperó aproximadamente el 99 % de (-)-Ambrox inicialmente

presente en el caldo de reacción. Se requiere suficiente etanol en la primera etapa de extracción para evitar la cristalización de (-)-Ambrox (solubilidad en etanol). Cuando se usó solo 1 o ½ volumen de la fase sólida en la primera etapa de extracción, se obtuvo una pasta pegajosa, que era difícil de manipular y el (-)-Ambrox cristalizó como agujas sobre el sedimento durante la centrifugación. La temperatura parecía no ser el factor responsable de esta cristalización (extracción y centrifugación ensayadas a temperatura ambiente y aproximadamente 35 °C a 40 °C).

La concentración de (-)-Ambrox en la fase de etanol, así como la relación de etanol/agua de la fase líquida (humedad residual de la fase sólida) parecían ser responsables de la formación de cristales. Sin embargo, se observó que era posible reducir el volumen de etanol a 1 volumen de la fase sólida.

Ya que (-)-Ambrox no está en la fase líquida a temperatura ambiente, se separa con la biomasa y se puede extraer con un disolvente orgánico (por ejemplo, un disolvente miscible en agua (por ejemplo, etanol) o un disolvente inmiscible en agua (por ejemplo, tolueno). La etapa de centrifugación que separa el (-)-Ambrox en la fase sólida de la mezcla de reacción es ventajosa porque reduce la cantidad de disolvente necesaria para extraer (-)-Ambrox.

Ejemplo 6

Análisis sensorial

Finalidad: llevar a cabo un análisis sensorial de (-)-Ambrox y los compuestos (II), (III) y (IV) formados en el material bruto y en el material cristalizado.

La biotransformación de E,E-homofarnesol da como resultado (-)-Ambrox y el compuesto (IV).

La biotransformación de E,Z-homofarnesol da como resultado el compuesto de éter macrocíclico (II) y el compuesto epi-Ambrox (III).

Una mezcla bruta de (-)-Ambrox comprende el (-)-Ambrox deseado, el compuesto (II), (III) y (IV) presentes en una cantidad de 87,1 % en peso, 2,8 % en peso, 2,5 % en peso y 7,6 % en peso respectivamente.

Cuando una mezcla bruta se cristaliza selectivamente (escala de laboratorio), el material cristalizado tiene los mismos componentes que la mezcla bruta, pero están presentes en una cantidad de 99,1 % en peso, 0,1 % en peso, 0,1 % en peso y 0,7 % en peso, respectivamente.

Los resultados analíticos sensoriales fueron los siguientes:

(-)-Ambrox: Umbral olfativo 0,2 ng/l.

Compuesto (IV): débil, IsoE, leñoso, umbral de detección de GC 5 a 10 ng.

Compuesto (II): "inodoro" (umbral de GC > 500 ng).

Compuesto (III): umbral de GC aproximadamente 10 veces más alto que (-)-Ambrox (aproximadamente 2 ng).

El análisis sensorial de los 3 subproductos (compuestos II, III y IV) indica un olor más débil que el de (-)-Ambrox. De hecho, el olor de epi-ambrox (Compuesto III) es aproximadamente 10 veces más débil que el de (-)-Ambrox, lo que sugiere que es esencialmente inodoro.

Ejemplo 7

Recuperación de Ambrox por extracción por arrastre con vapor

Pureza resultante del (-)-Ambrox bruto (extraído por arrastre con vapor) y cristalizado

La biotransformación de EE:EZ-homofarnesol 86:14 proporcionó una mezcla de reacción que se extrajo por arrastre con vapor. El destilado por arrastre con vapor se recogió como una mezcla bifásica. Se retuvo la fase orgánica y se descartó la fase acuosa. La composición de la fase orgánica se analizó mediante GC y los resultados se muestran en la Tabla siguiente (véase "bruto"). A continuación, la fase orgánica se concentró hasta sequedad. A continuación, se añadió etanol al producto seco bruto y la mezcla se calentó hasta que se disolvió el producto. A temperatura ambiente, se añade lentamente agua y (-)-Ambrox cristaliza con agitación ocasional y enfriamiento en un baño de hielo.

Los datos tabulados también muestran los resultados del análisis de GC para los productos obtenidos después de la etapa de extracción/destilación por arrastre con vapor ("bruto") y el producto cristalizado ((-)-Ambrox). Las referencias en la Tabla a "EZH" y "EEH" se refieren a (3Z,7E)-homofarnesol y 7E,3E-homofarnesol respectivamente.

Los datos tabulados a continuación indican que la materia prima particular (EEH:EZH 86:14) produce el producto final deseado (-)-Ambrox y una mezcla muy específica de subproductos (II, IV y III) usando la enzima SHC tipo silvestre o un derivado de SHC. Los datos para la cristalización selectiva muestran un fuerte enriquecimiento de (-)-Ambrox, sin que prácticamente se encuentren los subproductos (II), (IV) o (III) en la muestra cristalizada. Por consiguiente, esta mezcla EE:EZ proporciona un producto (-)-Ambrox olfativamente puro, que se cristaliza selectivamente en una materia

relativamente sencilla y rentable.

Tabla: muestra los resultados del análisis de GC para el producto cristalizado.

	Área de pico (GC)						Ambrox (%)
	(II)	(IV)	(III)	Ambrox	EZH	EEH	
Bruto	215073	190376	588769	6751605	13429	14184	86,9
Cristalizado	10088	8951	64625	9032941	0	0	99,1

La extracción/filtración por arrastre con vapor son métodos ecológicos para aislar (-)-Ambrox porque ofrecen un práctico aislamiento sin disolventes de (-)-Ambrox con una inactivación asociada del biocatalizador.

El (-)-Ambrox producido usando la reacción de bioconversión se puede extraer usando disolvente de toda la mezcla de reacción (por ejemplo, usando un disolvente inmiscible en agua o mediante extracción/destilación por arrastre con vapor o mediante filtración) o de la fase sólida (por ejemplo, usando un disolvente miscible en agua) usando métodos que son conocidos por los expertos en la técnica.

10 Listado de secuencias

<110> Givaudan SA

<120> Proceso

<130> 30804PCT

<150> GB 1507170.7

15 <151> 24-04-2015

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 631

20 <212> PRT

<213> *Alicyclobacillus acidocaldarius*

<400> 1

ES 2 856 887 T3

Met	Ala	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Arg	Thr	Leu	Asp	1	5	10	15
Arg	Ala	Val	Glu	Tyr	Leu	Leu	Ser	Cys	Gln	Lys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Trp	20	25	30	
Trp	Gly	Pro	Leu	Leu	Ser	Asn	Val	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Tyr	Val	Leu	35	40	45	
Leu	Cys	His	Ile	Leu	Asp	Arg	Val	Asp	Arg	Asp	Arg	Met	Glu	Lys	Ile	50	55	60	
Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	His	Glu	Gln	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Trp	Ala	Leu	65	70	75	80
Tyr	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Asp	Leu	Asp	Thr	Thr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Val	85	90	95	
Ala	Leu	Lys	Tyr	Ile	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Glu	Glu	Pro	Met	Gln	Lys	100	105	110	
Ala	Leu	Arg	Phe	Ile	Gln	Ser	Gln	Gly	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	Arg	Val	115	120	125	
Phe	Thr	Arg	Met	Trp	Leu	Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Tyr	Pro	Trp	Glu	Lys	130	135	140	
Val	Pro	Met	Val	Pro	Pro	Glu	Ile	Met	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Met	Pro	145	150	155	160
Leu	Asn	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	Ser	Trp	Ala	Arg	Ala	Thr	Val	Val	Ala				

ES 2 856 887 T3

165							170					175				
Leu	Ser	Ile	Val	Met	Ser	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Pro	Leu	Pro	Glu	Arg	
			180					185				190				
Ala	Arg	Val	Pro	Glu	Leu	Tyr	Glu	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg	
		195					200				205					
Gly	Ala	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Ile	Phe	Asp	Ala	Leu	Asp	Arg	Ala	
		210					215				220					
Leu	His	Gly	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	Val	His	Pro	Phe	Arg	Arg	Ala	Ala	
225					230				235						240	
Glu	Ile	Arg	Ala	Leu	Asp	Trp	Leu	Leu	Glu	Arg	Gln	Ala	Gly	Asp	Gly	
			245					250					255			
Ser	Trp	Gly	Gly	Ile	Gln	Pro	Pro	Trp	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	
			260					265					270			
Lys	Ile	Leu	Asp	Met	Thr	Gln	His	Pro	Ala	Phe	Ile	Lys	Gly	Trp	Glu	
			275					280					285			
Gly	Leu	Glu	Leu	Tyr	Gly	Val	Glu	Leu	Asp	Tyr	Gly	Gly	Trp	Met	Phe	
		290					295					300				
Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Pro	Val	Trp	Asp	Thr	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	
305					310					315						320
Leu	Arg	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asp	His	Asp	Arg	Leu	Val	Lys	Ala	
				325				330					335			
Gly	Glu	Trp	Leu	Leu	Asp	Arg	Gln	Ile	Thr	Val	Pro	Gly	Asp	Trp	Ala	
			340					345					350			
Val	Lys	Arg	Pro	Asn	Leu	Lys	Pro	Gly	Gly	Phe	Ala	Phe	Gln	Phe	Asp	
			355					360					365			
Asn	Val	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Val	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Val	Val	Trp	Ala	
		370					375					380				
Leu	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Pro	Asp	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Asp	Ala	Met	
385					390					395						400
Thr	Lys	Gly	Phe	Arg	Trp	Ile	Val	Gly	Met	Gln	Ser	Ser	Asn	Gly	Gly	
				405					410						415	

ES 2 856 887 T3

Trp Gly Ala Tyr Asp Val Asp Asn Thr Ser Asp Leu Pro Asn His Ile
420 425 430

Pro Phe Cys Asp Phe Gly Glu Val Thr Asp Pro Pro Ser Glu Asp Val
435 440 445

Thr Ala His Val Leu Glu Cys Phe Gly Ser Phe Gly Tyr Asp Asp Ala
450 455 460

Trp Lys Val Ile Arg Arg Ala Val Glu Tyr Leu Lys Arg Glu Gln Lys
465 470 475 480

Pro Asp Gly Ser Trp Phe Gly Arg Trp Gly Val Asn Tyr Leu Tyr Gly
485 490 495

Thr Gly Ala Val Val Ser Ala Leu Lys Ala Val Gly Ile Asp Thr Arg
500 505 510

Glu Pro Tyr Ile Gln Lys Ala Leu Asp Trp Val Glu Gln His Gln Asn
515 520 525

Pro Asp Gly Gly Trp Gly Glu Asp Cys Arg Ser Tyr Glu Asp Pro Ala
530 535 540

Tyr Ala Gly Lys Gly Ala Ser Thr Pro Ser Gln Thr Ala Trp Ala Leu
545 550 555 560

Met Ala Leu Ile Ala Gly Gly Arg Ala Glu Ser Glu Ala Ala Arg Arg
565 570 575

Gly Val Gln Tyr Leu Val Glu Thr Gln Arg Pro Asp Gly Gly Trp Asp
580 585 590

Glu Pro Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Phe Pro Gly Asp Phe Tyr Leu Gly
595 600 605

Tyr Thr Met Tyr Arg His Val Phe Pro Thr Leu Ala Leu Gly Arg Tyr
610 615 620

Lys Gln Ala Ile Glu Arg Arg
625 630

<210> 2

<211> 631

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado sintético de AacSHC

<400> 2

ES 2 856 887 T3

Met	Ala	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Arg	Thr	Leu	Asp	1	5	10	15
Arg	Ala	Val	Glu	Tyr	Leu	Leu	Ser	Cys	Gln	Lys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Trp	20	25	30	
Trp	Gly	Pro	Leu	Leu	Ser	Asn	Val	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Tyr	Val	Leu	35	40	45	
Leu	Cys	His	Ile	Leu	Asp	Arg	Val	Asp	Arg	Asp	Arg	Met	Glu	Lys	Ile	50	55	60	
Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	His	Glu	Gln	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Trp	Ala	Leu	65	70	75	80
Tyr	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Asp	Leu	Asp	Thr	Thr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Val	85	90	95	
Ala	Leu	Lys	Tyr	Ile	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Glu	Glu	Pro	Met	Gln	Lys	100	105	110	
Ala	Leu	Arg	Phe	Ile	Gln	Ser	Gln	Gly	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	Arg	Val	115	120	125	
Phe	Thr	Arg	Met	Trp	Leu	Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Tyr	Pro	Trp	Glu	Lys	130	135	140	
Val	Pro	Met	Val	Pro	Pro	Glu	Ile	Met	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Met	Pro	145	150	155	160
Leu	Asn	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	Ser	Trp	Ala	Arg	Ala	Thr	Val	Val	Ala	165	170	175	
Leu	Ser	Ile	Val	Met	Ser	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Pro	Leu	Pro	Glu	Arg	180	185	190	
Ala	Arg	Val	Pro	Glu	Leu	Tyr	Glu	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg	195	200	205	
Gly	Ala	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Ile	Phe	Asp	Ala	Leu	Asp	Arg	Ala	210	215	220	
Leu	His	Gly	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	Val	His	Pro	Phe	Arg	Arg	Ala	Ala	225	230	235	240

ES 2 856 887 T3

Glu Ile Arg Ala Leu Asp Trp Leu Leu Glu Arg Gln Ala Gly Asp Gly
 245 250 255
 Ser Trp Gly Gly Ile Gln Pro Pro Trp Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Leu
 260 265 270
 Lys Ile Leu Asp Met Thr Gln His Pro Ala Phe Ile Lys Gly Trp Glu
 275 280 285
 Gly Leu Glu Leu Tyr Gly Val Glu Leu Asp Tyr Gly Gly Trp Met Phe
 290 295 300
 Gln Ala Ser Ile Ser Pro Val Trp Asp Thr Gly Leu Ala Val Leu Ala
 305 310 315 320
 Leu Arg Ala Ala Gly Leu Pro Ala Asp His Asp Arg Leu Val Lys Ala
 325 330 335
 Gly Glu Trp Leu Leu Asp Arg Gln Ile Thr Val Pro Gly Asp Trp Ala
 340 345 350
 Val Lys Arg Pro Asn Leu Lys Pro Gly Gly Phe Ala Phe Gln Phe Asp
 355 360 365
 Asn Val Tyr Tyr Pro Asp Val Asp Asp Thr Ala Val Val Val Trp Ala
 370 375 380
 Leu Asn Thr Leu Arg Leu Pro Asp Glu Arg Arg Arg Asp Ala Met
 385 390 395 400
 Thr Lys Gly Phe Arg Trp Ile Val Gly Met Gln Ser Ser Asn Gly Gly
 405 410 415
 Trp Gly Ala Tyr Asp Val Asp Asn Thr Ser Asp Leu Pro Asn His Ile
 420 425 430
 Pro Phe Cys Asp Phe Gly Glu Val Thr Asp Pro Pro Ser Glu Asp Val
 435 440 445
 Thr Ala His Val Leu Glu Cys Phe Gly Ser Phe Gly Tyr Asp Asp Ala
 450 455 460
 Trp Lys Val Ile Arg Arg Ala Val Glu Tyr Leu Lys Arg Glu Gln Lys
 465 470 475 480
 Pro Asp Gly Ser Trp Phe Gly Arg Trp Gly Val Asn Tyr Leu Tyr Gly
 485 490 495

ES 2 856 887 T3

Thr Gly Ala Val Val Ser Ala Leu Lys Ala Val Gly Ile Asp Thr Arg
500 505 510

Glu Pro Tyr Ile Gln Lys Ala Leu Asp Trp Val Glu Gln His Gln Asn
515 520 525

Pro Asp Gly Gly Trp Gly Glu Asp Cys Arg Ser Tyr Glu Asp Pro Ala
530 535 540

Tyr Ala Gly Lys Gly Ala Ser Thr Pro Ser Gln Thr Ala Trp Ala Leu
545 550 555 560

Met Ala Leu Ile Ala Gly Gly Arg Ala Glu Ser Glu Ala Ala Arg Arg
565 570 575

Gly Val Gln Tyr Leu Val Glu Thr Gln Arg Pro Asp Gly Gly Trp Asp
580 585 590

Glu Pro Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Tyr Pro Gly Asp Phe Tyr Leu Gly
595 600 605

Tyr Thr Met Tyr Arg His Val Phe Pro Thr Leu Ala Leu Gly Arg Tyr
610 615 620

Lys Gln Ala Ile Glu Arg Arg
625 630

<210> 3

<211> 1896

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado sintético de AacSHC

<400> 3

atggctgagc agttggtgga agcgccggcc tacgcgcgga cgctggatcg cgcggtggag	60
tatctcctct cctgccaaaa ggacgaaggc tactggtggg ggccgcttct gagcaacgtc	120
acgatggaag cggagtacgt cctcttgtgc cacattctcg atcgctcga tcgggatcgc	180
atggagaaga tccggcggta cctgttgac gagcagcgcg aggacggcac gtgggccctg	240
tacccgggtg ggccgccgga cctcgacacg accatcgagg cgtacgtcgc gctcaagtat	300
atcggcattgt cgcgcgacga ggagccgatg cagaaggcgc tccggttcattcagagccag	360
ggcgggatcg agtcgtcgcg cgtgttcacg cggatgtggc tggcgctggt ggagagaatat	420
ccgtgggaga aggtgcccatt ggtcccgcg gagatcatgt tcctcgga ggcgatgccg	480
ctcaacatct acgagtttgg ctctgtgggct cgggcgaccg tcgtggcgct ctcgattgtg	540

10

ES 2 856 887 T3

```

atgagccgcc agccggtgtt cccgctgccc gagcggggcg gcgtgcccga gctgtacgag 600
accgacgtgc ctccgcgccc gcgcggtgcc aaggaggagg gtgggtggat cttcgacgcg 660
ctcgaccggg cgctgcacgg gtatcagaag ctgtcgggtgc acccgttccg ccgcgcggcc 720
gagatccgcg ccttgactg gtgtctcgag cgccaggccg gagacggcag ctggggcggg 780
attcagccgc cttggtttta cgcgctcatc gcgctcaaga ttctcgacat gacgcagcat 840
ccggcggttca tcaagggctg ggaaggtcta gagctgtacg gcgtggagct ggattacgga 900
ggatggatgt ttcaggcttc catctcgccg gtgtgggaca cgggcctcgc cgtgctcgcg 960
ctgcgcgctg cggggcttcc ggccgatcac gaccgcttgg tcaaggcggg cgagtggctg 1020
ttggaccggc agatcacggt tccgggcgac tgggcggtga agcggccgaa cctcaagccg 1080
ggcgggttcg cgttccagtt cgacaacgtg tactaccggg acgtggacga cacggccgctc 1140
gtggtgtggg cgctcaacac cctgcgcttg ccggacgagc gccgcaggcg ggacgccatg 1200
acgaagggat tccgctggat tgtcggcatg cagagctcga acggcggttg gggcgccctac 1260
gacgtcgaca acacgagcga tctcccgaa ccatcccgt tctgcgactt cggcgaagtg 1320
accgatccgc cgtcagagga cgtcaccgcc cacgtgctcg agtgtttcgg cagcttcggg 1380
tacgatgacg cctggaaggc catccggcgc gcggtggaat atctcaagcg ggagcagaag 1440
ccggacggca gctggttcg tctgtggggc gtcaattacc tctacggcac gggcgcggtg 1500
gtgtcggcgc tgaaggcggc cgggatcgac acgcgcgagc cgtacattca aaaggcgctc 1560
gactgggtcg agcagcatca gaacccggac ggcggttggg gcgaggactg ccgctcgtac 1620
gaggatccgg cgtacgcggg taaggcgcg agcaccgccg cgcagacggc ctgggcgctg 1680
atggcgctca tcgcggggcg caggcgggag tccgaggccg cgcgccgcgg cgtgcaatac 1740
ctcgtggaga cgcagcgccc ggacggcggc tgggatgagc cgtactacac cggcacgggc 1800
ttcccgaggg attggtacct cggctacacc atgtaccgcc acgtgtttcc gacgctcgcg 1860
ctcgcccgct acaagcaagc catcgagcgc aggtga 1896

```

<210> 4

<211> 631

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Derivado sintético de AacSHC

<400> 4

```

Met Ala Glu Gln Leu Val Glu Ala Pro Ala Tyr Ala Arg Thr Leu Asp
1           5           10           15

```

```

Arg Ala Val Glu Tyr Leu Leu Ser Cys Gln Lys Asp Glu Gly Tyr Trp

```

10

ES 2 856 887 T3

20					25					30					
Trp	Gly	Pro	Leu	Leu	Ser	Asn	Val	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Tyr	Val	Leu
		35					40					45			
Leu	Cys	His	Ile	Leu	Asp	Arg	Val	Asp	Arg	Asp	Arg	Met	Glu	Lys	Ile
	50					55					60				
Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	His	Glu	Gln	Arg	Glu	Asp	Gly	Thr	Trp	Ala	Leu
65					70					75					80
Tyr	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Asp	Leu	Asp	Thr	Thr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Val
				85					90					95	
Ala	Leu	Lys	Tyr	Ile	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Glu	Glu	Pro	Met	Gln	Lys
			100					105					110		
Ala	Leu	Arg	Phe	Ile	Gln	Ser	Gln	Gly	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	Arg	Val
		115					120					125			
Phe	Thr	Arg	Met	Trp	Leu	Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Tyr	Pro	Trp	Glu	Lys
	130					135					140				
Val	Pro	Met	Val	Pro	Pro	Glu	Ile	Met	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Met	Pro
145					150					155					160
Leu	Asn	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	Ser	Trp	Ala	Arg	Ala	Thr	Val	Val	Ala
				165					170					175	
Leu	Ser	Ile	Val	Met	Ser	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Pro	Leu	Pro	Glu	Arg
			180					185					190		
Ala	Arg	Val	Pro	Glu	Leu	Tyr	Glu	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg
		195					200					205			
Gly	Ala	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Ile	Phe	Asp	Ala	Leu	Asp	Arg	Ala
	210					215					220				
Leu	His	Gly	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	Val	His	Pro	Phe	Arg	Arg	Ala	Ala
225					230					235					240
Glu	Ile	Arg	Ala	Leu	Asp	Trp	Leu	Leu	Glu	Arg	Gln	Ala	Gly	Asp	Gly
				245					250					255	
Ser	Trp	Gly	Gly	Ile	Gln	Pro	Pro	Trp	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu
			260					265					270		

ES 2 856 887 T3

Lys Ile Leu Asp Met Thr Gln His Pro Ala Phe Ile Lys Gly Trp Glu
 275 280 285
 Gly Leu Glu Leu Tyr Gly Val Glu Leu Asp Tyr Gly Gly Trp Met Phe
 290 295 300
 Gln Ala Ser Ile Ser Pro Val Trp Asp Thr Gly Leu Ala Val Leu Ala
 305 310 315 320
 Leu Arg Ala Ala Gly Leu Pro Ala Asp His Asp Arg Leu Val Lys Ala
 325 330 335
 Gly Glu Trp Leu Leu Asp Arg Gln Ile Thr Val Pro Gly Asp Trp Ala
 340 345 350
 Val Lys Arg Pro Asn Leu Lys Pro Gly Gly Phe Ala Phe Gln Phe Asp
 355 360 365
 Asn Val Tyr Tyr Pro Asp Val Asp Asp Thr Ala Val Val Val Trp Ala
 370 375 380
 Leu Asn Thr Leu Arg Leu Pro Asp Glu Arg Arg Arg Arg Asp Ala Met
 385 390 395 400
 Thr Lys Gly Phe Arg Trp Ile Val Gly Met Gln Ser Ser Asn Gly Gly
 405 410 415
 Trp Gly Ala Tyr Asp Val Asp Asn Thr Ser Asp Leu Pro Asn His Ile
 420 425 430
 Pro Phe Cys Asp Phe Gly Glu Val Thr Asp Pro Pro Ser Glu Asp Val
 435 440 445
 Thr Ala His Val Leu Glu Cys Phe Gly Ser Phe Gly Tyr Asp Asp Ala
 450 455 460
 Trp Lys Val Ile Arg Arg Ala Val Glu Tyr Leu Lys Arg Glu Gln Lys
 465 470 475 480
 Pro Asp Gly Ser Trp Phe Gly Arg Trp Gly Val Asn Tyr Leu Tyr Gly
 485 490 495
 Thr Gly Ala Val Val Ser Ala Leu Lys Ala Val Gly Ile Asp Thr Arg
 500 505 510
 Glu Pro Tyr Ile Gln Lys Ala Leu Asp Trp Val Glu Gln His Gln Asn
 515 520 525

ES 2 856 887 T3

Pro Asp Gly Gly Trp Gly Glu Asp Cys Arg Ser Tyr Glu Asp Pro Ala
530 535 540

Tyr Ala Gly Lys Gly Ala Ser Thr Pro Ser Gln Thr Ala Trp Ala Leu
545 550 555 560

Met Ala Leu Ile Ala Gly Gly Arg Ala Glu Ser Glu Ala Ala Arg Arg
565 570 575

Gly Val Gln Tyr Leu Val Glu Thr Gln Arg Pro Asp Gly Gly Trp Asp
580 585 590

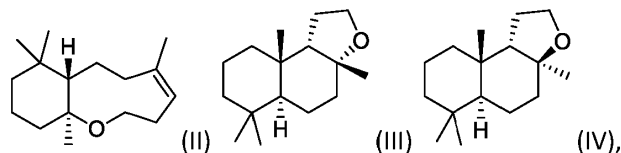
Glu Pro Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Phe Pro Gly Asp Trp Tyr Leu Gly
595 600 605

Tyr Thr Met Tyr Arg His Val Phe Pro Thr Leu Ala Leu Gly Arg Tyr
610 615 620

Lys Gln Ala Ile Glu Arg Arg
625 630

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar y purificar (-)-Ambrox de una mezcla de reacción, que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV)



5 dicho método comprende la etapa de cristalizar selectivamente (-)-Ambrox a partir de la mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), por lo que (-)-Ambrox se hace cristalizar de un disolvente, mientras los compuestos (II), (III) y (IV) permanecen disueltos en el disolvente de cristalización.

10 2. Un método para mejorar o potenciar el olor de (-)-Ambrox que comprende la etapa de cristalizar selectivamente (-)-Ambrox a partir de una mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) o (IV) mediante cristalización selectiva de (-)-Ambrox de la mezcla, por lo que (-)-Ambrox se hace cristalizar de un disolvente, mientras que los compuestos (II), (III) y (IV) permanecen disueltos en el disolvente de cristalización, de modo que después de la separación (-)-Ambrox no contiene ninguno, o solo cantidades olfativamente aceptables, de los compuestos (II), (III) o (IV).

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la mezcla está libre o sustancialmente libre de homofarnesol.

15 4. El método según las reivindicaciones 1 a 3, en donde el disolvente de cristalización se selecciona del grupo que consiste en agua, metanol, acetona, éter de petróleo, hexano, t-butil metil éter, THF y acetato de etilo etanol, tolueno y mezclas de los mismos.

5. El método según la reivindicación 4, en donde el disolvente de cristalización es una mezcla de agua etanol.

20 6. El método según la reivindicación 5, en donde la cristalización selectiva se realiza disolviendo la mezcla que contiene (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV) en etanol caliente y dejando que (-)-Ambrox cristalice selectivamente añadiendo lentamente un no disolvente, tal como agua, a la solución etanólica de enfriamiento.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la mezcla se forma como resultado de una ciclación catalizada por enzima de homofarnesol que comprende una mezcla de isómeros geométricos de homofarnesol 7E,3E y 7E,3Z homofarnesol, en donde la reacción se lleva a cabo en presencia de un microorganismo recombinante que expresa el gen que codifica la enzima.

25 8. El método según la reivindicación 7, en donde la mezcla de homofarnesol 7E,3E y 7E,3Z está enriquecida en el isómero geométrico 7E,3E.

9. El método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la mezcla de homofarnesol 7E,3E y 7E,3Z consiste en homofarnesol 7E,3E y 7E,3Z y ningún otro isómero geométrico de homofarnesol.

30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la relación en peso del isómero 7E,3E y el isómero 7E,3Z es al menos 80:20, y más particularmente al menos 90:10, y más particularmente aún al menos 95:5.

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la enzima es una escualeno-hopeno ciclasa de tipo silvestre o una variante de la escualeno-hopeno ciclasa de tipo silvestre.