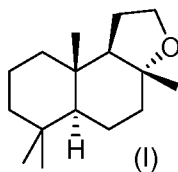


PROCESO PARA AISLAR Y PURIFICAR AMBROX

Descripción de la Invención

La presente invención tiene que ver con un método
5 de preparación, aislamiento y purificación del isómero
(-)-Ambrox. Más particularmente, la invención tiene que ver
con un método de preparación de (-)-Ambrox por medio de una
bioconversión, así como también con un método de su
recuperación y purificación de una mezcla de reacción.

10 AMBROFIX^{MR} es el nombre comercial de Givaudan
exclusivo del compuesto enantioméricamente puro (-)-Ambrox,
el cual tiene la fórmula general (I).



15 AMBROFIX^{MR} es una molécula muy importante en la variedad de
ingredientes de los perfumistas. Esta presenta una nota
amberina sumamente poderosa, sumamente sustancial y sumamente
estable para el uso en todas las aplicaciones de perfumería.
20 AMBROFIX^{MR}, disponible de Givaudan, es el material más
adecuado para obtener una nota de olor ámbar gris auténtica.

Actualmente, AMBROFIX^{MR} es producido sintéticamente
a partir de materiales de partida de origen natural. La
disponibilidad y calidad de ciertos materiales de partida es
25 dependiente de condiciones climáticas, así como también

factores socioeconómicos. Adicionalmente, puesto que los materiales de partida se pueden extraer de recursos naturales, con rendimientos modestos, éstos están disponibles a precios que, muy probablemente, harán cada vez más que su uso no sea rentable a escala industrial. Por consiguiente, si las provisiones industriales, comerciales de AMBROFIX^{MR} continúan estando disponibles a un costo razonable, existe la necesidad de un proceso más económico de producción y purificación, que tenga la capacidad de industrialización.

Una ruta biotecnológica industrialmente escalable en el AMBROFIX^{MR} sería atractiva debido a que es potencialmente menos compleja y menos contaminante que los procedimientos completamente sintéticos.

Un substrato potencialmente útil en el cual se intenta una bioconversión para proporcionar (-)-Ambrox es el homofarnesol. En su papel seminal, Neumann *y colaboradores* (Biol. Chem. Hoppe-Seyler Volumen 367 páginas 723-726 (1986)) plantearon la factibilidad de la conversión de homofarnesol a (-)-Ambrox bajo catálisis enzimática, empleando la enzima Escualeno Hopeno Ciclasa (SHC). El homofarnesol empleado fue una mezcla de cuatro isómeros geométricos de esta molécula. De los cuatro isómeros, solo el isómero geométrico 7E,3E (utilizando la nomenclatura convencional) podría ser ciclizado, y luego solo con un rendimiento muy bajo del (-)-Ambrox deseado.

El documento JP 2009-60799 (Kao) da a conocer una síntesis por medio de la cual la SHC actúa sobre un substrato de homofarnesol para producir el (-)-Ambrox. El substrato es una mezcla de los cuatro isómeros geométricos (3Z,7Z; 3E,7Z; 5 3Z,7E; y 3E,7E). El documento solo da a conocer la preparación de (-)-Ambrox a partir de extractos de homofarnesol que contienen SHC. La mezcla de homofarnesol se convierte a (-)-Ambrox y su estereoisómero 9-epi, y la purificación se puede llevar a cabo por medio de la 10 destilación o por medio de la cromatografía en columna. Kao no describe un proceso por medio del cual el homofarnesol se convierte en (-)-Ambrox utilizando microorganismos intactos que producen SHC, y adicionalmente, no proporciona ninguna enseñanza técnica relacionada con el procesamiento posterior 15 de mezclas de reacción complejas obtenidas por medio de estos procesos que pueden producir (-)-Ambrox en forma olfativamente pura.

Según lo que el solicitante sabe, la técnica anterior no describe ningún proceso viable industrialmente 20 escalable, que implique la bioconversión catalizada por SHC de homofarnesol, para proporcionar (-)-Ambrox en una forma olfativamente pura.

Adicionalmente, si la bioconversión de homofarnesol se debe realizar a escala industrial, deben estar disponibles 25 fuentes económicas de 3E,7E-homofarnesol sumamente puro. Sin

embargo, aunque las rutas sintéticas en homofarnesol han sido descritas en la bibliografía (véase por ejemplo el documento US 2013/0273619), según lo que el solicitante sabe no hay fuentes económicas industrialmente escalables de 7E,3E-homofarnesol puro que estén disponibles actualmente.

Permanece la necesidad de proporcionar una ruta económicamente factible e industrialmente escalable en el valioso ingrediente de fragancia (-)-Ambrox.

En las solicitudes de patente co-pendientes PCT/EP2014/072891 (publicada como WO2015/059293) y PCT2014/EP/072882 (publicada como WO2015/059290), el solicitante describe un método eficiente de preparación de 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 la información isomérica contenida en este material de partida se conserva, de tal manera que el enlace doble de homofarnesol en la posición 7 se fija en la configuración E. Sin embargo, incluso esta química elegante aún da por resultado una mezcla del isómero 3E/Z. El 7E,3E-homofarnesol puro sigue siendo sintéticamente desafiante, y solo se podría lograr por medio de una 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, por medio del cual la mezcla de homofarnesol es ciclizada enzimáticamente en presencia de un microorganismo recombinante que expresa una enzima, en particular el biocatalizador de Escualeno Hopeno Ciclasa (SHC) que tiene la capacidad de bioconvertir el homofarnesol a (-)-Ambrox, para producir una mezcla de reacción de la cual el (-)-Ambrox se puede aislar en forma olfativamente pura con un procesamiento posterior sorprendentemente fácil.

En un aspecto de la invención se proporciona una ciclización catalizada por una enzima de homofarnesol para proporcionar una mezcla de reacción que comprende (-)-Ambrox, en donde el homofarnesol comprende una mezcla de isómeros 7E,3E/Z-geométricos 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 modalidad de la invención, la reacción de ciclización se lleva a cabo en presencia de un biocatalizador de SHC con capacidad de bioconvertir homofarnesol a (-)-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 de *E. coli* recombinante. El biocatalizador de SHC se puede utilizar en cualquier forma tal como, pero no

limitada a una enzima SHC purificada, un extracto crudo que contiene una enzima SHC o una enzima SHC inmovilizada (por ejemplo sobre un portador), o el biocatalizador puede ser un microorganismo que ha producido o que 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 modalidad particular de la presente invención, la mezcla de homofarnesol está enriquecida en el isómero 7E,3E-geométrico.

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

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

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

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

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

En una modalidad particular de la presente invención, la mezcla de homofarnesol consiste de isómeros 7E,3E/Z-geométricos y ningún otro isómero geométrico de homofarnesol.

La persona experta entiende que el término 7E, 7Z,

3E o 3Z utilizado en relación con homofarnesol se refiere respectivamente a la orientación del enlace doble en la posición 7 y la posición 3 de homofarnesol. El compuesto 7E,3E-homofarnesol tiene el No. de CAS 459-89-2, mientras que
5 el compuesto de 7E,3Z-homofarnesol tiene el No. de CAS 138152-06-4. El uso del término 7E,3E/Z-homofarnesol se refiere a una mezcla de los compuestos.

Los métodos de obtención de mezclas de homofarnesol útiles como un substrato en la reacción de ciclización de
10 acuerdo con el método de la presente invención se exponen en las solicitudes co-pendientes PCT/EP2014/072891 (publicada como WO2015/059293) y PCT2014/EP/072882 (publicada como WO2015/059290) referidas anteriormente, las cuales se incorporan por este acto a manera de referencia en su
15 totalidad. En términos generales, éstas describen una síntesis de mezclas de homofarnesol que procede al convertir farneseno, más particularmente alfa-farneseno y/o beta-farneseno, a su derivado de farneseno ciclopropanado correspondiente, utilizando una solución orgánica de una N-
20 alquil-N-nitroso-urea. El derivado ciclopropanado entonces se somete a reacciones de apertura de anillo y reordenamiento en presencia de un ácido de Bronsted para proporcionar la mezcla de homofarnesol, la cual es selectiva para el isómero geométrico 7E,3E. El uso de farneseno, como material de
25 partida se prefiere particularmente debido a que asegura que

se fije la configuración E del enlace doble en la posición 7 de homofarnesol.

Las condiciones de reacción específicas, las cuales forman modalidades particulares de la presente invención, se exponen en las solicitudes co-pendientes, así como también los ejemplos posteriores, y no requieren mayor elaboración en este documento.

La ciclización de homofarnesol para proporcionar una mezcla de reacción que contiene (-)-Ambrox puede ser catalizada por Escualeno Hopeno Ciclasa (SHC). La SHC puede ser una enzima de tipo silvestre (por ejemplo, la SEC ID No. 1), o una variante de la misma (por ejemplo, la SEC ID No. 2 o la SEC ID No. 4). La SHC se puede obtener de *Alucyclobacillus 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, utilizando técnicas que son conocidas generalmente en el campo.

El término "recombinante" como se utiliza con respecto a la producción de enzimas deberá referirse a enzimas producidas por medio de técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas por medio de una construcción de ADN exógeno que codifica la enzima deseada. El término "ADN recombinante" incluye por lo

tanto un ADN recombinante incorporado en un vector en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte (o el genoma de una célula homóloga, en una posición diferente de la ubicación cromosómica natural).

La(s) molécula(s) de ácido nucleico se une(n) de manera operativa a secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células hospedantes procarióticas y/o eucarióticas. Como se utiliza en este documento, "se une operativamente" significa incorporado en una construcción genética de modo que las secuencias de control de expresión controlen de manera efectiva la expresión de una secuencia de codificación de interés. Los elementos regulatorios de transcripción/traducción referidos anteriormente incluyen pero no están limitados a promotores inducibles y no inducibles, constitutivos, regulados por el ciclo celular, regulados metabólicamente, potenciadores, operadores, silenciadores, represores y otros elementos que son conocidos para aquellas personas expertas en el campo y que impulsan o regulan de otra manera la expresión génica. Estos elementos regulatorios incluyen pero no están limitados a elementos regulatorios que dirigen la expresión constitutiva o los cuales permiten la expresión inducible como, por ejemplo, el promotor de CUP-1, el represor de tet como se emplea, por ejemplo, en los sistemas tet-on^{MR} o tet-off^{MR}, el sistema de

lac, los elementos regulatorios del sistema de trp. A manera de ejemplo, la β -D-1-Tiogalactopiranosida de isopropilo (IPTG) es un inductor efectivo de la expresión de proteínas en el intervalo de concentración de 100 μ M a 1.0 mM. Este
5 compuesto es un imitador molecular de alolactosa, un metabolito de lactosa que activa la transcripción del operon *lac*, y por lo tanto se utiliza para inducir la expresión de proteínas donde el gen está bajo el control del operador *lac*.

Similarmente, la(s) molécula(s) de ácido nucleico
10 puede(n) formar parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales, por ejemplo, una secuencia que funciona como un marcador o reportero. Los ejemplos de genes marcadores y reporteros incluyen beta-lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina
15 desaminasa (ADA), aminoglucósido fosfotransferasa dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina cinasa (TK), lacZ (que codifica beta-galactosidasa), y xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Como con muchos de los
20 procedimientos estándar asociados con la práctica de la descripción, los artífices expertos tendrán conocimiento de reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden servir para la función de un marcador o reportero.

25 Los polinucleótidos recombinantes pueden codificar

enzimas SHC tal como la SHC de tipo silvestre o una variante de la misma, la cual se puede insertar en un vector para la expresión y purificación opcional. Un tipo de vector es un plásmido que representa un bucle de ADN de doble cadena circular en el cual se ligan segmentos adicionales de ADN. Ciertos vectores pueden controlar la expresión de genes a los cuales se unen funcionalmente. Estos vectores son llamados "vectores de expresión". Usualmente 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 la SHC de tipo silvestre o una variante de la misma. En la presente descripción, los términos "plásmido" y "vector" se utilizan de manera intercambiable puesto que el plásmido es el tipo de vector utilizado más frecuentemente.

Estos vectores pueden incluir secuencias de ADN las cuales incluyen pero no están limitadas a secuencias de ADN que no están presentes naturalmente en la célula hospedante, secuencias de ADN que no son transcritas normalmente en ARN o traducidas en una proteína ("expresadas") y otros genes o secuencias de ADN los cuales uno desea introducir en el hospedante no recombinante. Se apreciará que típicamente el genoma de un hospedante recombinante se aumenta a través de la introducción estable de uno o más genes recombinantes. Sin embargo, los plásmidos o vectores autónomos o replicativos también se pueden utilizar dentro del alcance de esta

descripción. Sin embargo, la presente descripción se puede practicar utilizando un plásmido o vector de bajo número de copias, por ejemplo, una copia individual, o alto número de copias.

5 En una modalidad preferida, el vector de la presente descripción comprende plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, cromosomas bacterianos artificiales y de levadura artificiales, construcciones de desactivación genética o introducción genética, secuencias o casetes de ácidos
10 nucleicos sintéticos y subconjuntos se pueden producir en forma de polinucleótidos lineales, plásmidos, megaplásmidos, cromosomas sintéticos o artificiales, tales como cromosomas artificiales de plantas, bacterias, mamíferos o levadura.

 Se prefiere que las proteínas codificadas por el
15 polinucleótido introducido se produzcan dentro de la célula tras la introducción del vector. Los diversos substratos de genes se pueden incorporar en plásmidos. Los plásmidos son frecuentemente vectores de clonación estándar, por ejemplo, plásmidos bacterianos de múltiples copias. Los substratos se
20 pueden incorporar en los mismos o diferentes plásmidos. Frecuentemente, por lo menos dos tipos diferentes de plásmido que tienen diferentes tipos de marcadores seleccionables se utilizan para permitir la selección de células que contienen por lo menos dos tipos de vectores.

25 Típicamente, las células de bacterias o levadura se

pueden transformar con uno o más de cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos como es bien sabido en el campo. Para la recombinación *in vivo*, el gen que es recombinado con el genoma u otros genes se utiliza para
5 transformar el hospedante utilizando técnicas de transformación estándar. En una modalidad adecuada, el ADN que proporciona un origen de replicación se incluye en la construcción. El origen de replicación puede ser seleccionado adecuadamente por la persona experta. Dependiendo de la
10 naturaleza de los genes, un origen de replicación complementario puede no ser requerido si las secuencias ya están presentes con los genes o genoma que son operables como orígenes de replicación por sí mismos.

Una célula de bacteria o levadura puede ser
15 transformada por ADN exógeno o heterólogo cuando este ADN ha sido introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede ser integrado o no, es decir, unido covalentemente en el genoma de la célula. En los procariontes y la levadura, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener en un
20 elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada establemente es una célula en la cual el ADN transfectado se ha integrado en un cromosoma de modo que es heredado por células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad es
25 demostrada por la capacidad de la célula eucariótica para

establecer líneas de células o clones comprendidos de una población de células hijas que contienen el ADN transformante.

Generalmente, el ADN introducido no es residente originalmente en el hospedante que es el receptor del ADN, pero está dentro del alcance de la descripción aislar un segmento de ADN de un hospedante determinado, e introducir subsecuentemente una o más copias adicionales de ese ADN en el mismo hospedante, por ejemplo, para mejorar la generación 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 endógeno o secuencia de ADN por medio de, por ejemplo, la recombinación homóloga o la mutagénesis dirigida a un sitio. Los hospedantes recombinantes adecuados incluyen microorganismos, células de plantas y plantas.

La presente descripción también presenta hospedantes recombinantes. El término "hospedante recombinante", también referido como una "célula hospedante modificada genéticamente" o una "célula transgénica" indica una célula hospedante que comprende un ácido nucleico heterólogo o el genoma del cual ha sido aumentado por al menos una secuencia de ADN incorporada. Una célula hospedante de la presente descripción puede ser diseñada genéticamente con el polinucleótido o el vector como se resumiera

anteriormente.

Las células hospedantes que se pueden utilizar para los fines de la descripción incluyen pero no están limitadas a células procariotas tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*), las cuales se pueden transformar con, por ejemplo, ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico, cromosoma artificial bacteriano o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen las moléculas de polinucleótidos de la descripción; células eucarióticas simples como levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*), las cuales se pueden transformar con, por ejemplo, vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la molécula de polinucleótido de la descripción. Dependiendo de la célula hospedante y el vector respectivo utilizado para introducir el polinucleótido de la descripción 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 de manera transitoria en las células.

El término "célula", como se utiliza en este documento en particular con referencia a la ingeniería genética y la introducción de uno o más genes o una agrupación ensamblada de genes en una célula, o una célula de producción se entiende que se refiere a cualquier célula

procariótica o eucariótica. Las células hospedantes procarióticas y eucarióticas están contempladas ambas para el uso de acuerdo con la invención, inclusive células hospedantes bacterianas como *E. coli* o *Bacillus sp*, células
5 hospedantes de levadura, tal como *S. cerevisiae*, células hospedantes de insecto, tal como *Spodoptora frugiperda* o células hospedantes de humano, tales como HeLa y Jurkat.

Específicamente, la célula es una célula eucariótica, preferiblemente un célula fúngica, de mamífero o
10 planta, o una célula procariótica. Las células eucarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células de mamíferos, células de levadura o células de insectos (que incluyen Sf9), células de anfibios (que incluyen melanocitos), o células de gusanos que incluyen células de
15 *Caenorhabditis* (que incluye *Caenorhabditis elegans*). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células COS (que incluyen Cos-1 y Cos-7), células CHO, células HEK293, células HEK293T, células HEK293 T-Rex™ u otras líneas de células eucarióticas transfectables. Las
20 células bacterianas adecuadas incluyen sin limitación *E. coli*.

Preferiblemente se pueden utilizar procariontes, tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, o células de mamífero, como células HeLa o células Jurkat, o células de
25 plantas, como *Arabidopsis*.

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

Preferiblemente, la célula hospedante de *E. coli* es una célula hospedante de *E. coli* la cual es reconocida por la industria y autoridades reglamentarias (que incluye pero o está limitada a una célula hospedante de *E. coli* K12 o como
10 se demuestra en los Ejemplos, un célula hospedante de *E. coli* BL21).

Una célula hospedante preferida para el uso con la presente descripción es *E. coli*, la cual se puede preparar de manera recombinante como se describe en este documento. De
15 esta manera, el hospedante recombinante puede ser una célula hospedante de *E. coli* recombinante. Existen colecciones de mutantes, plásmidos, modelos de computadora detallados de metabolismo y otra información disponible para *E. coli*, que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el
20 rendimiento del producto. Los métodos similares a aquellos descritos anteriormente para *Saccharomyces* se pueden utilizar para hacer microorganismos de *E. coli* recombinantes.

En una modalidad, el microorganismo de *E. coli* recombinante comprende secuencias de nucleótidos que
25 codifican genes de SHC o equivalentes/homologías funcionales

de los mismos que incluyen pero no están limitados a variantes, mutantes homólogos, derivados o fragmentos de los mismos.

Otra célula hospedante preferida para el uso con la presente descripción es *S. cerevisiae* la cual es un organismo bastidor utilizado ampliamente en la biología sintética. De esta manera, el hospedante recombinante puede ser *S. cerevisiae*. Existen colecciones de mutantes, plásmidos, modelos de computadora detallados de metabolismo y otra información disponible para *S. cerevisiae*, que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el rendimiento del producto. Se conocen métodos para hacer microorganismos de *S. cerevisiae* recombinantes.

El cultivo de células se realiza, de una manera convencional. El medio de cultivo contiene una fuente de carbono, por lo menos una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas, y a éste se agregan vitaminas. Los constituyentes de este medio pueden ser aquellos los cuales se utilizan convencionalmente para cultivar la especie de microorganismo en cuestión.

Las fuentes de carbono para el uso en el presente método incluyen cualquier molécula que pueda ser metabolizada por la célula hospedante recombinante para facilitar el crecimiento y/o producción de (-)-Ambrox. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen, pero no están

limitados a, sacarosa (por ejemplo, como se encuentra en la melaza), fructosa, xilosa, glicerol, glucosa, celulosa, almidón, celobiosa u otro polímero que contiene glucosa.

En modalidades que emplean levadura como un
5 hospedante, por ejemplo, las fuentes de carbono tales como sacarosa, fructosa, xilosa, etanol, glicerol y glucosa son adecuadas. La fuente de carbono puede ser proporcionada al organismo hospedante por todo el periodo de cultivo o, alternativamente, el organismo puede ser desarrollado durante
10 un periodo de tiempo en presencia de otra fuente de energía, por ejemplo, proteína, y luego se puede proveer con una fuente de carbono solo durante la fase discontinua alimentada.

La idoneidad de un microorganismo de célula
15 hospedante recombinante para el uso en los métodos de la presente descripción se puede determinar por medio de procedimientos de prueba simples utilizando métodos bien conocidos. Por ejemplo, el microorganismo que es sometido a prueba se puede propagar en un medio rico (por ejemplo, medio
20 LB, medio de extracto de levadura de Bacto-triptona, medio nutriente y similares) a un pH, temperatura y bajo condiciones de aireación utilizadas comúnmente para la propagación del microorganismo. Una vez que se seleccionan los microorganismos recombinantes (es decir células
25 hospedantes recombinantes) que generan los productos deseados

de bioconversión, los productos son generados típicamente por una línea de células hospedantes de producción a gran escala por medio de sistemas de expresión y fermentaciones adecuados, por ejemplo por medio de la producción microbiana en un cultivo de células.

En una modalidad de la presente descripción, un medio mínimo definido tal como M9A se utiliza para el cultivo de células. Los componentes del medio M9A comprenden: 14 g/L de KH_2PO_4 , 16 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de Citrato de $\text{Na}_3.2\text{H}_2\text{O}$, 7.5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.25 g/L de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 g/L de $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L de glucosa y 1.25 g/L de extracto de levadura).

En otra modalidad de la presente descripción, se utiliza 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 dan a conocer, por ejemplo, en los documentos US 6524831B2 y US 2003/0092143A1.

El microorganismo recombinante puede desarrollarse en un proceso discontinuo, discontinuo alimentado o continuo o combinaciones de los mismos. Típicamente, el microorganismo recombinante se desarrolla en un fermentador a una temperatura definida en presencia de una fuente de nutrientes adecuada, por ejemplo, una fuente de carbono, durante un

periodo de tiempo deseado para bioconvertir homofarnesol a (-)-Ambrox en una cantidad deseada.

Las células hospedantes recombinantes se pueden cultivar de cualquier manera adecuada, por ejemplo por medio del cultivo discontinuo o el cultivo discontinuo alimentado. Como se utiliza en este documento, el término "cultivo discontinuo" es un método de cultivo en el cual el medio de cultivo ni se agrega ni se retira durante el cultivo. Como se utiliza en este documento, el término "discontinuo alimentado" significa un método de cultivo en el cual se agrega medio de cultivo durante el cultivo pero no se retira medio de cultivo.

Una modalidad de la presente descripción proporciona un método de producción de (-)-Ambrox en un sistema celular que comprende la producción de SHC de tipo silvestre o variantes de la misma bajo condiciones adecuadas en un sistema celular, la alimentación de homofarnesol al sistema celular, la conversión del homofarnesol a (-)-Ambrox utilizando la SHC o variantes producidas utilizando el sistema celular, la recolección de (-)-Ambrox del sistema celular y el aislamiento del (-)-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 hacer (-)-Ambrox.

Una modalidad adicional de la presente descripción es un método de bioconversión de elaboración de (-)-Ambrox que comprende desarrollar células hospedantes que comprenden la SHC de tipo silvestre o genes variantes, producir SHC de tipo silvestre o enzimas variantes en las células hospedantes, alimentar homofarnesol (por ejemplo EEH) a las células hospedantes, incubar las células hospedantes bajo condiciones de pH, temperatura y agente de solubilización adecuadas para promover la conversión de homofarnesol a Ambrox y recolectar el (-)-Ambrox. La producción de la SHC de tipo silvestre o enzimas variantes en las células hospedantes proporciona un método de elaboración de (-)-Ambrox cuando se agrega homofarnesol a las células hospedantes bajo condiciones de reacción adecuadas. La conversión lograda se puede mejorar al agregar más biocatalizador y SDS a la mezcla de reacción.

El microorganismo de célula hospedante recombinante se puede cultivar en una variedad de maneras con el propósito de proporcionar células en cantidades adecuadas que expresan la SHC de tipo silvestre o enzimas variantes para el paso de bioconversión subsecuente. Puesto que los microorganismos aplicables para el paso de bioconversión varían ampliamente (por ejemplo levaduras, bacterias y hongos), las condiciones

de cultivo se ajustan, por supuesto, a los requerimientos
específicos de cada especie y estas condiciones son bien
conocidas y están bien documentadas. Cualquiera de los
métodos conocidos de la técnica para desarrollar células de
5 microorganismos de células hospedantes recombinantes se
pueden utilizar para producir las células utilizables en el
paso de bioconversión subsecuente de la presente descripción.
Típicamente, las células se desarrollan a una densidad
particular (de manera medible como densidad óptica (OD, por
10 sus siglas en inglés)) para producir una biomasa suficiente
para la reacción de bioconversión. Las condiciones de cultivo
seleccionadas incluyen no solo en la cantidad de células
obtenidas (la biomasa), sino que la calidad de las
condiciones de cultivo también influye en como la biomasa se
15 convierte en un biocatalizador. El microorganismo de célula
hospedante recombinante que expresa la SHC de tipo silvestre
o genes variantes y que produce la SHC de tipo silvestre o
enzimas variantes se denomina un biocatalizador el cual es
adecuado para el uso en una reacción de bioconversión. En
20 algunas modalidades, el biocatalizador es una célula completa
recombinante que produce SHC de tipo silvestre o enzimas
variantes o puede estar en suspensión o un formato
inmovilizado.

En una modalidad, el biocatalizador se produce en
25 cantidades suficientes (para crear una biomasa suficiente),

se recolecta y se lava (y opcionalmente se almacena (por ejemplo congelado o liofilizado)) antes del paso de bioconversión.

En una modalidad adicional, las células se producen
5 en cantidades suficientes (para crear un biocatalizador suficiente) y las condiciones de reacción luego se ajustan sin la necesidad de recolectar y lavar el biocatalizador para la reacción de bioconversión. Este método de un paso (o "en un solo reactor") es ventajoso ya que simplifica el proceso
10 mientras que reduce los costos. El medio de cultivo utilizado para desarrollar las células también es adecuado para el uso en la reacción de bioconversión mientras que las condiciones de reacción se ajusten para facilitar la reacción de bioconversión.

15 Los métodos de bioconversión de la presente descripción se llevan a cabo bajo condiciones de tiempo, temperatura, pH y agente de solubilización que proporcionan la conversión de la materia prima de homofarnesol a (-)-Ambrox. El pH de la mezcla de reacción puede estar en el
20 intervalo de 4-8, preferiblemente de 5 a 6.5, más preferiblemente de 4.8-6.0 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 por medio de la adición de amortiguadores a la
25 mezcla de reacción. Un amortiguador ejemplar para este

propósito es un amortiguador de ácido cítrico. La temperatura preferida está entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 45°C, preferiblemente entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 40°C, aunque puede ser más alta, hasta 55°C para organismos termófilos especialmente si se utiliza 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 de solubilización (por ejemplo un tensioactivo, detergente, promotor de solubilidad, solvente orgánico miscible en agua y similares) en la reacción de bioconversión. Los ejemplos de tensioactivos incluyen pero no están limitados a Triton X-100^{MR}, Tween 80^{MR}, taurodesoxicolato, taurodesoxicolato de sodio, dodecil-sulfato de sodio (SDS) y/o lauril-sulfato de sodio (SLS).

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

Sin desear ser limitado a teoría alguna, el uso de

SDS con células hospedantes, microbianas, recombinantes puede ser ventajoso ya que el SDS puede interactuar ventajosamente con la membrana de células hospedantes con el propósito de hacer que la enzima SHC (la cual es una enzima unida a la
5 membrana) sea más accesible al substrato 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 puede mejorar el acceso del substrato de homofarnesol a la enzima SHC dentro de la célula
10 hospedante, mientras que al mismo tiempo se previene la alteración (por ejemplo desnaturalización/inactivación de la SHC de tipo silvestre o una enzima variante).

La concentración del agente de solubilización (por ejemplo SDS) utilizado en la reacción de bioconversión es
15 influenciada por la cantidad de biomasa y la concentración de substrato (EEH). Es decir, existe un grado de interdependencia entre la concentración de agente de solubilización (por ejemplo SDS), la cantidad de biomasa y la concentración de substrato (EEH). A manera de ejemplo,
20 conforme la concentración del substrato de homofarnesol incrementa, se requieren cantidades suficientes de biocatalizador y agente de solubilización (por ejemplo SDS) para que tenga lugar una reacción de bioconversión eficiente. Si, por ejemplo, la concentración de agente de solubilización
25 (por ejemplo SDS) es muy baja, se puede observar una

conversión subóptima de homofarnesol. Por otra parte, si, por ejemplo, la concentración de agente de solubilización (por ejemplo SDS) es muy alta, entonces puede haber un riesgo de que el biocatalizador sea afectado a través de ya sea la
5 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 de la persona
10 experta. A manera de ejemplo, un modelo predictivo está disponible para que la persona experta determine 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-
15 60°C, preferiblemente 55°C.

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, aún con mayor preferencia
20 aproximadamente 6.0.

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

El pH de la reacción de bioconversión para una
25 enzima variante SHC es aproximadamente 4.8-6.4, de

preferencia aproximadamente 5.2-6.0.

Preferiblemente, el agente de solubilización utilizado en la reacción de bioconversión es SDS.

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

La concentración de SDS en la reacción de
10 bioconversión para una enzima variante SHC está en el intervalo de aproximadamente 1-2%, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1.4-1.7%, aún más preferiblemente de aproximadamente 1.5% cuando la concentración de homofarnesol es aproximadamente 125 g/l de
15 EEH y la concentración de biocatalizador es 250 g/l (que corresponde a una OD de aproximadamente 175 (650 nm)).

La relación de biocatalizador con respecto a sustrato de EEH homofarnesol está en el intervalo de aproximadamente 0.5:1-2:1, en algunas modalidades 2:1, de
20 preferencia aproximadamente 1:1 o 0.5:1.

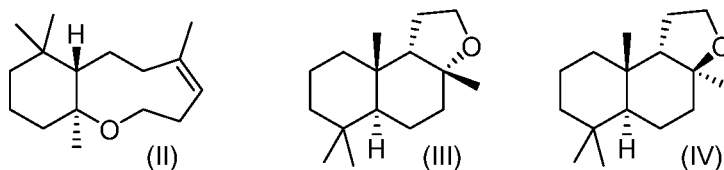
En algunas modalidades, el (-)-Ambrox se produce utilizando un biocatalizador al cual se agrega el sustrato de homofarnesol. Es posible agregar el sustrato por medio de la alimentación utilizando medios conocidos (por ejemplo
25 bomba peristáltica, jeringa de infusión y similares). El

homofarnesol es un compuesto soluble en aceite y se proporciona en un formato oleoso. Dado que el biocatalizador está presente en una fase acuosa, la reacción de bioconversión se puede considerar como un sistema de dos
 5 fases cuando el homofarnesol se agrega a la mezcla de reacción de bioconversión. Este es el caso incluso cuando está presente un agente de solubilización (por ejemplo SDS).

Los detalles adicionales de un proceso de bioconversión adecuados se dan a conocer en los ejemplos,
 10 expuestos posteriormente en este documento.

El proceso de bioconversión de acuerdo con la presente invención produce una mezcla de reacción que contiene el (-)-Ambrox deseado, y también una variedad de subproductos. Más particularmente, la mezcla de reacción
 15 contiene, además de (-)-Ambrox una mezcla compleja de subproductos, que incluyen un isómero constitucional novedoso de (-)-Ambrox de acuerdo con la fórmula (II), así como también estereoisómeros conocidos de (-)-Ambrox de acuerdo con las fórmulas (III) y (IV)

20



El solicitante cree, aunque no pretende ser limitado por alguna teoría particular, que el compuesto de la
 25 fórmula (II) se forma por medio de la ciclización del isómero

7E,3Z-geométrico de homofarnesol. Se ha descrito como prácticamente inoloro, con un umbral de detección de > 500 ng/l.

Como se estableciera anteriormente, el solicitante
5 cree que el compuesto de la fórmula (II) es una molécula novedosa, y como tal, este compuesto forma un aspecto adicional de la presente invención.

Los ingredientes de perfumes y composiciones de perfumes que consisten de o que comprenden el compuesto (II),
10 así como también artículos perfumados que contienen los mismos, forman aspectos adicionales de la invención.

El uso del compuesto de la fórmula (II) como un ingrediente de perfume en aplicaciones de perfumería, tal como perfumes finos o composiciones de perfumes funcionales
15 tales como composiciones para el cuidado personal, cuidado del hogar y cuidado de telas, forma aún más aspectos adicionales de la invención.

Las mezclas de (-)-Ambrox y una cantidad aceptable, olfativa del compuesto (II) forma aún otro aspecto de la
20 presente invención.

El término "cantidad olfativa aceptable" como se utiliza en este documento en relación con el compuesto de la fórmula (II), o cualquiera de los otros subproductos (III) o (IV), o en realidad, cualquier material que pueda estar
25 presente como una impureza en el (-)-Ambrox formado de

acuerdo con un método de la presente invención, se entiende que significa que el compuesto o material está presente en una mezcla con (-)-Ambrox en una cantidad inferior a su umbral de detección de olor, o en una cantidad a la cual no
5 contribuirá sus características olfativas de una manera que afectará el carácter olfativo del (-)-Ambrox. El (-)-Ambrox que contiene una cantidad olfativa aceptable de cualquier compuesto o material sería identificable para un perfumista experto como que posee el carácter de olor de grados
10 comerciales de (-)-Ambrox, tal como AMBROFIX^{MR} obtenido por medio de un procedimiento sintético ex-esclareol, y disponible de Givaudan.

En modalidades preferidas de la presente invención, la mezcla de reacción no contiene, o sustancialmente no
15 contiene, homofarnesol sin reaccionar.

El solicitante descubrió que el homofarnesol era un solvente poderoso para el (-)-Ambrox, así como también para los subproductos mencionados anteriormente del proceso de bioconversión. Como tal, en presencia de cantidades
20 apreciables de homofarnesol, el (-)-Ambrox y los subproductos permanecen disueltos juntos en una mezcla intratable, cruda, de la cual es difícil, prolongado y costoso separar y finalmente aislar el (-)-Ambrox en una forma olfativamente pura. Se descubrió que la reducción del nivel de homofarnesol
25 sin reaccionar en una 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 será apreciado por
5 personas expertas en el campo, es una operación crucial en la
manufactura de compuestos útiles formados por medio de
procesos de bioconversión. Como parte de la síntesis de un
compuesto, puede afectar las propiedades físicas del
compuesto. En el caso de la preparación de ingredientes de
10 perfume por medio de métodos de biotecnología, es deseable
que un compuesto objetivo se pueda preparar a partir de una
mezcla de reacción en forma olfativamente pura con el
propósito de que las características deseadas de olor del
compuesto objetivo no sean alteradas por contribuciones de
15 olor de la mezcla compleja de contaminantes y subproductos
que pueden estar presentes en el medio de fermentación o el
biocatalizador.

Por consiguiente, la invención proporciona en otros
aspectos un método de aislamiento y purificación de
20 (-)-Ambrox de una mezcla de reacción, que comprende uno o más
de los compuestos (II), (III) y (IV).

En todavía otro aspecto de la presente invención,
se proporciona un método de mejoramiento o incremento del
olor de (-)-Ambrox, que comprende los pasos de separación y
25 purificación de (-)-Ambrox de una mezcla de reacción que

contiene uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV).

En una forma aislada y purificada, el (-)-Ambrox ya sea no contiene ninguno de los compuestos (II), (III) o (IV), o si contiene alguno de los compuestos, entonces cada uno
5 debe estar presente en una cantidad olfativa aceptable.

La mezcla de reacción obtenida a partir del proceso de bioconversión, tal como un proceso como se describiera anteriormente en este documento, comprende generalmente una fase sólida que contiene (-)-Ambrox crudo y uno o más de los
10 subproductos (II), (III) y (IV), así como también material celular y/o residuos del mismo; y una fase líquida o fases líquidas que comprenden agua y/o algún homofarnesol sin reaccionar.

La fase sólida se puede separar de la fase líquida
15 o fases líquidas por medio de la filtración o centrifugación. Adicionalmente, al seleccionar un filtro con un tamaño de poro apropiado, también es posible efectuar la separación del (-)-Ambrox crudo, del material celular y/o residuos. Una vez que el (-)-Ambrox crudo se separa del material celular y/o
20 residuos del mismo, se puede lavar, antes de ser sujetado a procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar el (-)-Ambrox de los compuestos (II), (III) y (IV).

Alternativamente, en lugar de la filtración o centrifugación, la mezcla de reacción puede ser calentada a
25 una temperatura superior al punto de fusión de (-)-Ambrox,

después de lo cual el (-)-Ambrox forma una fase oleosa arriba de una fase acuosa que contiene el material celular y residuos. Opcionalmente, y con el propósito de asegurar la recuperación completa del (-)-Ambrox, el material acuoso y celular se puede lavar con un solvente orgánico inmiscible en agua (tal como tolueno) para retirar cualquier (-)-Ambrox residual que pueda haber estado atrapado en la fase acuosa, y estos lavados se pueden combinar con la fase oleosa. Después, la fase oleosa se puede concentrar por medio de la evaporación para proporcionar una mezcla cruda que comprende (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), mezcla la cual luego se puede sujetar a procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar y purificar el (-)-Ambrox.

En otra modalidad, 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 solvente orgánico inmiscible en agua adecuado (tal como tolueno) para formar una fase orgánica que contiene (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), los cuales se pueden separar de una fase acuosa que contiene el material celular y residuos. La fase orgánica se puede concentrar por medio de la evaporación para proporcionar una mezcla cruda que comprende (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), los cuales se pueden sujetar a

procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar y purificar el (-)-Ambrox.

En todavía otro método alternativo, la mezcla de reacción puede ser destilada por vapor para retirar el
5 producto destilado del material celular y residuos. El producto destilado se puede recolectar 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
10 luego se puede sujetar a procedimientos de tratamiento final adicionales para aislar y purificar el (-)-Ambrox.

En una modalidad particular de la presente invención, el método de aislamiento y purificación de (-)-Ambrox comprende el paso de cristalización selectiva del
15 (-)-Ambrox de una mezcla que contiene uno o más de los compuestos (II), (III) o (IV).

La frase "cristalización selectiva" se refiere a un paso de proceso por medio del cual se provoca que el (-)-Ambrox se cristalice de un solvente, mientras que los
20 compuestos (II), (III) y (IV) permanecen disueltos en el solvente de cristalización, a tal grado que el material cristalino, aislado contenga solo (-)-Ambrox, o si contiene cualquiera de los compuestos (II), (III) o (IV), entonces estén presentes solo en cantidades olfativas aceptables.

25 La cristalización se puede llevar a cabo en un

solvente orgánico adecuado. La elección del solvente se basa en consideraciones, tales como diferencias de solubilidad a temperatura ambiente y a temperaturas altas, o en el solvente de ebullición; y por la necesidad de una abundancia de cristales recuperables en un solvente frío. Usualmente, un compuesto que es separado se disuelve en un solvente relativamente polar y luego se puede agregar un solvente relativamente menos polar para llevar el compuesto disuelto a su límite de solubilidad, después de lo cual comenzará a cristalizarse. También, en un procedimiento industrial, las cuestiones de costo así como también seguridad de manejo son relevantes. Los solventes adecuados incluyen, pero no están limitados a metanol, acetona, éter de petróleo, hexano, éter t-butil-metílico, THF y acetato de etilo. Los solventes preferidos incluyen tolueno o alcohol etílico. También se pueden emplear pares de solventes.

En una modalidad particularmente preferida de la presente invención, la cristalización selectiva se emprende al disolver la mezcla que contiene (-)-Ambrox y uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV) en etanol caliente y permitir que el (-)-Ambrox se cristalice de manera selectiva al agregar lentamente un material no disolvente, tal como agua, a la solución etanólica de enfriamiento.

Considerando la relación estructural cercana del (-)-Ambrox y los compuestos de subproductos (II), (III) y

(IV), los cuales son respectivamente un isómero constitucional y dos estereoisómeros de (-)-Ambrox, fue notable que el (-)-Ambrox pudiera ser cristalizado selectivamente de esta mezcla, para proporcionar el
5 (-)-Ambrox en forma olfativamente pura y en altos rendimientos. La persona experta anticiparía razonablemente que los compuestos se co-cristalizarían con (-)-Ambrox, lo que hace que el procesamiento posterior sea mucho más complejo, tardado y costoso que se descubrió que es el caso.

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

La facilidad con la cual el (-)-Ambrox se podría
15 separar por medio de la cristalización podría ser contrastada con la observación de que el (-)-Ambrox no se podría recuperar de una manera tan fácil y en tal rendimiento alto de una mezcla que contiene los compuestos (II), (III) y/o (IV) por medio de otras técnicas de purificación, tal como
20 por medio de la destilación, debido a los puntos de ebullición muy similares del (-)-Ambrox y los subproductos (II), (III) y (IV).

El término "olfativamente puro", como se utiliza en relación con el (-)-Ambrox, se propone para dar a entender
25 que el (-)-Ambrox está libre de los compuestos (II), (III) o

(IV), o cualquier otro material encontrado en la mezcla de reacción, o que si estos compuestos o materiales deben estar presentes, éstos están presentes en cantidades olfativas aceptables, como ese término se define en este documento.

5 En una modalidad de la invención el (-)-Ambrox en una forma olfativamente pura contiene menos de 5% en peso de cualquiera de los compuestos (II), (III) o (IV).

 En modalidades más particulares, el (-)-Ambrox en forma olfativamente pura contiene menos de 4%, menos de 3%,
10 menos de 2%, menos de 1%, menos de 0.9%, menos de 0.8%, menos de 0.7%, menos de 0.6%, menos de 0.5%, menos de 0.4%, menos de 0.3%, menos de 0.2%, menos de 0.1%, o menos de 0.05% en peso de cada uno de los compuestos (II), (III) o (IV).

 La calidad de la separación del (-)-Ambrox de la
15 mezcla de los compuestos (II), (III) y/o (IV) por medio de la cristalización selectiva puede ser influenciada por la composición de la mezcla de la cual se separa. Más particularmente, la calidad de la separación del (-)-Ambrox de una mezcla de los compuestos (II), (III) y/o (IV) por
20 medio de la cristalización se mejoró cuando la relación en peso del (-)-Ambrox con respecto a los otros compuestos (II), (III) y (IV) en la mezcla fue mayor que 70:30, más particularmente 80:20, más particularmente 90:10, aún más particularmente 95:5, y más particularmente aún 97:3.

25 Adicionalmente, la calidad de la separación del

(-)-Ambrox por medio de la cristalización puede ser influenciada por la cantidad de homofarnesol sin reaccionar que está presente en la mezcla de la cual se separa. Más particularmente, la calidad de la separación se mejora cuando
5 el nivel de homofarnesol sin reaccionar es menor que 30% en peso en peso, más particularmente menor que 20% en peso, más particularmente menor que 10% en peso, más particularmente aún menor que 5% en peso y aún más particularmente menor que 3% en peso, aún más particularmente menor que 2% en peso, y
10 más particularmente aún menor que 1% en peso, con base en el peso de la mezcla de la cual el (-)-Ambrox se cristaliza.

Preferiblemente, los reactivos y las condiciones de reacción empleados en el proceso de bioconversión de la presente invención son tales que la reacción procede con 100%
15 de conversión de homofarnesol, o sustancialmente así, no dejando de esta manera homofarnesol sin reaccionar en la mezcla de reacción. Sin embargo, si está presente homofarnesol sin reaccionar, aunque es desventajoso económicamente, se puede separar del (-)-Ambrox y otros
20 subproductos por medio de la destilación, por ejemplo.

Por consiguiente, en una modalidad particular de la invención, se proporciona un método de aislamiento y purificación de (-)-Ambrox de una mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), mezcla la cual está
25 libre, o sustancialmente libre, de homofarnesol.

En una modalidad más particular, el aislamiento y la purificación de (-)-Ambrox de una mezcla que comprende uno o más de los compuestos (II), (III) y (IV), y está libre o sustancialmente libre de homofarnesol, se logra por medio de la cristalización selectiva de (-)-Ambrox.

El (-)-Ambrox obtenido de acuerdo con un método de la presente invención se obtiene en forma olfativamente pura. El (-)-Ambrox olfativamente puro forma otro aspecto de la presente invención.

El (-)-Ambrox en forma cristalina forma todavía otro aspecto de la presente invención.

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, que incluyen el uso en la perfumería fina, así como también el uso en productos de consumo, tales como aplicaciones para el cuidado personal, cuidado de telas y cuidado del hogar.

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

La invención se ilustrará además con referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Preparación de homofarnesol

Condiciones analíticas generales:

5 GC/MS no polar: 50°C/2 minutos, 20°C/minuto 200°C, 35°C/minuto 270°C. GC/MS Agilent 5975C MSD con sistema de GC Serie HP 7890A. Columna no polar: BPX5 de SGE, 5% de fenilo 95% de dimetilpolisiloxano 0.22 mm x 0.25 mm x 12 m. Gas portador: helio. Temperatura del inyector: 230°C. División
10 1:50. Flujo: 1.0 ml/minuto. Línea de transferencia: 250°C. MS-cuadropolo: 106°C. MS-fuente: 230°C.

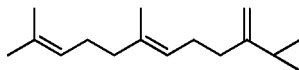
A) Preparación de MNU en THF

Una solución de urea (175 g, 2.9 mol) y clorhidrato de metilamina (198 g, 2.9 mol) en agua (400 ml) se calienta a
15 reflujo (105°C) durante 3.5 horas bajo agitación. A 40°C se agrega NaNO₂ (101 g, 1.45 mol) disuelto en agua (200 ml). Después 15 minutos se agrega THF (1000 ml) lo cual da por resultado una mezcla transparente de 2 fases. Se agrega H₂SO₄ concentrado (110 g, 1.1 mol) a 0-5°C y se agita dentro de 1.5
20 horas. Después de otra 0.5 hora a 0-5°C, las dos fases transparentes se separan a 25°C. La fase orgánica (A) (1065 ml, teóricamente 1.35 M) se almacena durante algunos días a 0-5°C o se envía inmediatamente al reactor de ciclopropanación.

25 Después de la separación de fases, la fase acuosa

se extrae dos veces con THF (2 x 1 l). Esto proporciona 1100 ml de la fase B y 1075 de la fase C. Mientras que la fase A proporciona una conversión del 51% de un alqueno terminal a un ciclopropano en una reacción de ciclopropanación subsecuente, la fase B proporciona < 0.5% de ciclopropano y la fase C no proporciona una conversión detectable. Se concluye que > 99% de MNU se extrae después de la primera separación de fases. Usualmente, la fase acuosa se desecha por lo tanto después de la primera separación de fases (de la fase orgánica A) después del tratamiento con KOH acuoso, concentrado y ácido acético.

B) Preparación de E- Δ -farneseno utilizando MNU en THF



La N-metil-N-nitroso-urea 1.35 M en THF (136 ml, 184 mmol) se agrega gota a gota a 0°C a una mezcla agitada rápidamente de E-beta-farneseno (CAS 18794-84-8) (25 g, 122 mmol) y KOH acuoso (50 ml, 40%) a 0-5°C. Después de la adición de 4 ml de la solución de MNU, se agrega 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 agrega durante 4 horas a 0-5°C. Una GC en esta etapa mostró 28% de E-beta-farneseno no convertido, 65% del monociclopropano deseado (mostrado anteriormente) y 3% de un compuesto bisciclopropanado 5. Después de 16 horas a 25°C se agrega

ácido acético (100 ml) a 0-5°C, luego éter terc-butil-
 metílico (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 éter terc-butil-metílico (250 ml). Las capas
 5 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 proporcionar
 26.9 g de un líquido ligeramente amarillo el cual contiene 9%
 de E-beta-Farneseno, 82% del compuesto de monociclopropano
 10 deseado y 6% de un producto secundario bisciclopropanado.

El compuesto deseado podría ser aislado
 adicionalmente por medio de la purificación por destilación.

La adición de 1 g de K₂CO₃ (1 g) y la destilación
 sobre una columna de bobina de acero de 30 cm a 40-60 mbar
 15 proporciona 147 g de compuesto de monociclopropano (68% corr)
 a 135-145°C. Las fracciones se reúnen para proporcionar 92 g
 del compuesto de monociclopropano de 100% de pureza.

Datos analíticos de E-Δ-farneseno:

RMN-1H (CDCl₃, 400 MHz): 5.1 (2 m, 2 H), 4.6 (2 H), 2.2 (2
 20 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. RMN-13C (CDCl₃, 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 25 (q),
 16.0 (d), 6.0 (t) ppm. GC/MS: 218 (2%, M⁺), 203 (5%, [M -
 25 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
 5 (s), 819 (m), 629 (w). Análisis calculado para C₁₆H₂₆: 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)

Una mezcla de (E)-(6,10-dimetilundeca-1,5,9-trien-
 10 2-il)ciclopropano (E- Δ Farneseno) (1 g, 4.6 mmol), dodecano
 (0.2 g, 1.15 mmol, estándar interno) y ácido L-(+)-tartárico
 (1 g, 6.9 mmol) en un tubo de presión se calienta bajo
 agitación a 150°C. Después de 18 horas y la conversión
 completa (de acuerdo con la GC), la mezcla se vierte en agua
 15 (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 Na₂CO₃ acuoso, concentrado (50 ml) y
 NaCl concentrado (2 x 50 ml), se secan sobre MgSO₄, se
 filtran y se evaporan bajo presión reducida para proporcionar
 20 una resina parduzca (1.35 g) la cual se mezcla con KOH acuoso
 al 30% (4.3 ml) y se agita a 25°C durante 2 horas. El
 análisis de GC revela la formación de 96% de (7E)-4,8,12-
 trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-ol de acuerdo con el estándar
 interno. Relación de E/Z 68:22. Los datos analíticos del
 25 isómero E son consistentes con aquellos de la bibliografía,

véase por ejemplo P. Kocienski, S. Wadman J. Org. Chem. 54, 1215 (1989).

Ejemplo 2

Preparación de Plásmido de SHC y producción del Biocatalizador

5 Preparación de Plásmido de SHC

El gen que codifica la escualeno hopeno ciclasa *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) (GenBank M73834, Swissprot P33247) se insertó 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) utilizando un protocolo de transformación de choque térmico estándar.

Cultivos en matraces Erlenmeyer

15 Para la producción de proteínas se utilizó ya sea medio rico (medio LB) o medios mínimos. M9 es un ejemplo de medios mínimos, los cuales se utilizaron exitosamente.

Preparación de medios

El medio mínimo seleccionado por defecto se preparó de la siguiente manera para un cultivo de 350 ml: a 35 ml de una reserva de ácido cítrico/fosfato (133 g/l de KH_2PO_4 , 40 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 17 g/g de ácido cítrico. H_2O con pH ajustado a 6.3) se agregaron 307 ml de H_2O , el pH se ajustó a 6.8 con NaOH al 32% como se requiera. Después del tratamiento en autoclave de 0.850 ml de MgSO_4 al 50%, se agregaron 0.035 ml

de una solución de elementos traza (composición en la siguiente sección), 0.035 ml de solución de Tiamina y 7 ml de glucosa al 20%.

5 Producción de Biocatalizador de SHC (producción de biocatalizador)

La producción de biocatalizador a pequeña escala (SHC de tipo silvestre o variantes de SHC), 350 ml de cultivo (medio complementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina) se incubaron desde un pre-cultivo de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que
10 contenía el plásmido de producción de SHC. Las células se desarrollaron hasta una densidad óptica de aproximadamente 0.5 ($\text{OD}_{650 \text{ nm}}$) a 37°C con agitación constante (250 rpm).

La producción de proteínas luego se indujo por medio de la adición de IPTG a una concentración de 300 μM
15 seguido por la incubación durante 5-6 horas adicionales con agitación constante. La biomasa resultante se recolectó finalmente por medio de la centrifugación, se lavó con amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Las células se almacenaron como pelotillas a 4°C o -20°C hasta el uso
20 adicional. En general de 2.5 a 4 gramos de células (peso en húmedo) se obtuvieron de 1 litro de cultivo, independientemente del medio utilizado.

La fermentación se preparó y se condujo en reactores InforsHT de 750 ml. Al recipiente de fermentación
25 se agregaron 168 ml de agua desionizada. El recipiente de

reacción se equipó con todas las sondas requeridas (pO_2 , pH, muestreo, antiespuma), alimentación de C + N y botellas de hidróxido de sodio y se trató en autoclave. Después del tratamiento en autoclave, los siguientes ingredientes se
 5 agregan al reactor:

20 ml de amortiguador de fosfato/ácido cítrico 10x

14 ml de glucosa al 50%

0.53 ml de solución de $MgSO_4$

2 ml de solución de $(NH_4)_2SO_4$

10 0.020 ml de una solución de elementos traza

0.400 ml de solución de tiamina

0.200 ml de solución madre de kanamicina

Las condiciones de reacción se establecieron de la siguiente manera: pH = 6.95, pO_2 = 40%, T = 30°C, Agitación a
 15 300 rpm. Cascada: punto de ajuste de rpm a 300, mínimo 300, máximo 1000, flujo l/minuto punto de ajuste 0.1, mínimo 0, máximo 0.6: Control antiespuma: 1:9.

El fermentador se inoculó de un cultivo semilla a una $OD_{650\text{ nm}}$ de 0.4-0.5. Este cultivo semilla se desarrolló en
 20 medio LB (+ kanamicina) a 37°C, 220 rpm durante 8 horas. La fermentación se condujo primero en un modo discontinuo durante 11.5 horas, 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 cual se
 25 había agregado después de 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 elementos traza, 0.360 ml de solución de tiamina, 0.180 ml de solución madre de kanamicina. La alimentación se condujo a un caudal constante de
5 aproximadamente 4.2 ml/hora. Las mediciones de glucosa y NH_4^+ se realizaron externamente para evaluar la disponibilidad de las fuentes de C y N en el cultivo. Usualmente los niveles de glucosa permanecen muy bajos.

Los cultivos se desarrollaron durante un total de
10 aproximadamente 25 horas, donde alcanzaron típicamente $\text{OD}_{650\text{ nm}}$ de 40-45. La producción de SHC luego se inició al agregar IPTG a una concentración final de aproximadamente 1 mM en el fermentador (como un pulso de IPTG o durante un periodo de 3-4 horas utilizando una jeringa de infusión), ajustar la
15 temperatura a 40°C y pO_2 a 20%. La inducción de la producción de SHC duró 16 horas a 40°C. Al final de la inducción, las células se recolectaron por medio de la centrifugación, se lavaron con amortiguador de ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M pH 5.4 y se almacenaron como pelotillas a 4°C o -20°C
20 hasta el uso adicional.

Resultados Ia

En general, con todas las otras condiciones no cambiadas la actividad específica del biocatalizador producido fue más alta cuando se utilizó un medio mínimo en
25 comparación con un medio rico.

La inducción se llevó a cabo exitosamente a 30 o 37°C. Se observó que cuando la inducción se realizó a 40-43°C, se obtuvo un biocatalizador de actividad específica más alta.

5 **Resultados 1b**

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

Tabla 1

	Volumen inicio de inducción (ml)	OD _{650 nm} inicio de inducción	Células calculadas (g)	Volumen fin de la inducción (ml)	OD _{650 nm} , fin de la inducción	Células recolectadas (g)
15 Ejemplo 1	273	40	10.9	342	55	28
Ejemplo 2	272	44	12.0	341	57	23

OD_{650 nm} en la inoculación: 0.45 (Ejemplo 1) y 0.40 (Ejemplo 2). Volúmenes de inicio: 205 ml.

Secuencia de aminoácidos de SHC de tipo silvestre (SEC ID No.

20 **1) (GenBank M73834, Swissprot P33247)**

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAAYVLLCHILDRVDRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALY
 PGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPPEIMFLGKRMPLN
 IYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIR
 ALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAA
 GLPADHDLRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFR
 WIVGMQSSNGGWGAYDVTNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLLKREQKPDGSWF
 GRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGG
 25 RAEEAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

Secuencia de aminoácidos de SHC F601Y variante (SEC ID No. 2)

- variante con respecto a la SEC ID No. 1

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDREVDRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALY
 PGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPPEIMFLGKRMLN
 IYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIR
 ALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPAFIKWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAA
 GLPADHDRILVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFR
 WIVGMQSSNGGWGAYDNDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLLKREQKPDGSWF
 GRWGVNLYLGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGG
 RAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGYPGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

Secuencia de nucleótidos de SHC F605W variante (SEC ID No. 3)

ATGGCTGAGCAGTTGGTGGGAAGCGCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCTCCTGCCAAAAG
 GACGAAGGCTACTGGTGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTACGATGGAAGCGGAGTACGTCTCTTGTGCCACATTCTCGAT
 CGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCACGAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGTAC
 CCGGGTGGGCCCGCGACCTCGACACGACCATCGAGGCGTACGTGCGGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAG
 CCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTTATTACAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTCGCGCGTGTTCACGCGGATGTGGCTGGCG
 CTGGTGGGAGAATAATCCGTGGGAGAAGGTGCCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAAC
 ATCTACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCTGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCGCTG
 CCCGAGCGGGCGCGCGTGCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCGCCCGCGCGGTGCCAAGGGAGGGGGTGGGTGG
 ATCTTCGACGCGCTCGACCGGGCGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTCCGTGCACCCGTTCGCGCGCGGGCGGAGATCCGC
 GCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAGCTGGGGCGGGATTACAGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATC
 GCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCGCATCCGGCGTTTATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTG
 GATTACGGAGGATGGATGTTTACAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCG
 GGGCTTCCGGCCGATACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGTTTCCGGGCGACTGG
 GCGGTGAAGCGCCCAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGGACGTGGACGACACG
 GCCGTGCTGGTGTGGGCGCTCAACACCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCGGGACGCCATGACGAAGGGATTCCGC
 TGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTTGGGGCGCCTACGACGTGACAACACGAGCGATCTCCGGAACCACATC
 CCGTTCTGCGCACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGCCGTAGAGGACGTACCCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCGAGTTT
 GGGTACGATGACGCTGGAAGGTATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTT
 GGTGCTTGGGGCGTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTGGGATCGACACGCGCGAG
 CCGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGCGGCTGGGGCGAGGACTGCCGCTCGTAC
 GAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTTCGACAGCGGCTGGGGCGTGAITGGCGCTCATCGCGGGCGGC
 AGGGCGGAGTCCGAGGCGCGCGCGCGCGGTGCAATACCTCGTGGAGACGAGCGCCCGGACGGCGGCTGGGATGAGCCG
 TACTACACCGGCACGGGCTTCCAGGGGATTGGTACCTCGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTC
 GGCGGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGCAGGTGA

Secuencia de aminoácidos de SHC F605W variante (SEC ID No. 4)-variante con respecto a la SEC ID No. 1

5 MAEQLVEAPAYARTILDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAAYVLLCHILDVRDRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALY
 PGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPVPEIMFLGKRMPLN
 IYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIR
 ALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHAPAFIKGWEGLYGVLDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAA
 GLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFR
 WIVGMQSSNGGWGAYDVNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYILKREQKPDGSWF
 GRWGVNLYLGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGG
 RAESSEARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFGDWYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR

Ejemplo 3

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

La bioconversión se emprendió utilizando las siguientes condiciones de reacción:

La reacción (volumen total de 150.1 g) conducida en amortiguador 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 utilizando un sustrato de homofarnesol, el cual fue 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 1.55% de SDS. La reacción se condujo a 35°C con agitación constante (900 rpm), el control de pH se realizó utilizando de 10 a 40% de ácido cítrico en agua.

La mezcla de reacción se sujetó a pasos de aislamiento y purificación como se expone en el Ejemplo 4, a continuación.

Ejemplo 4

Procedimiento de procesamiento posterior

Una mezcla de reacción formada a partir de la bioconversión del 7E,3E/Z-homofarnesol (86:14 3E:3Z) se
5 sujetó a una destilación por vapor. El producto destilado se recolectó como una mezcla bifásica. La fase orgánica se retuvo y la fase acuosa se desechó. La composición de la fase orgánica se analizó por medio de GC y los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación
10 (véase "crudo").

La fase orgánica luego se concentró hasta sequedad. Luego se agregó etanol al producto seco, crudo y la mezcla se calentó hasta que se disolvió el producto. A temperatura ambiente se agrega agua lentamente y el (-)-Ambrox se
15 cristaliza bajo agitación ocasional y enfriamiento en un baño de hielo.

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

Se debe tener en cuenta que en la Tabla 2, "a", "b" y "c" se refieren al compuesto (II), compuesto (IV) y compuesto (III) respectivamente. "EZH" y "EEH" se refieren a
25 7E,3Z-homofarnesol y 7E,3E-homofarnesol respectivamente.

Tabla 1

	Área pico (GC)						(-)- Ambrox (%)
	a	b	c	(-)-Ambrox	EZH	EEH	
5 Crudo	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:

10 Dado que el (-)-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 y de la biotransformación utilizando ya sea solventes miscibles en agua (por ejemplo etanol) y solventes inmiscibles en agua
15 (por ejemplo tolueno).

200 ml de caldo de reacción se centrifugaron para separar el sólido de la fase líquida (acuosa) (Sorvall GS3, 5000 rpm, 10 minutos, 10°C). Esto separó un pellet sólido de aproximadamente 80 ml de una fase líquida de
20 aproximadamente 120 ml. El análisis (cromatografía de gases) de la fase acuosa después de la extracción de MTBE mostró que no contenía más de aproximadamente 0.3% del (-)-Ambrox presente inicialmente en los 200 ml de caldo de reacción. El tolueno y etanol al 99% se utilizaron para extraer (-)-Ambrox
25 de la fase sólida.

Extracción de tolueno:

80 ml de la fase sólida se extrajeron 6x con 45 ml de tolueno (aproximadamente 1/2 del volumen de fase sólida, agitación vigorosa durante 30 s, centrifugación (Sorvall GS3, 5 5000 rpm, 10 minutos, 10°C). La fase de solvente se analizó con GC por su contenido de (-)-Ambrox. Más de 99.5% de (-)-Ambrox presente inicialmente en el caldo de reacción se extrajo con 6 extracciones que representaban un volumen total de tolueno de 1.35x el volumen de caldo de reacción completo, 10 inicial (200 ml) o 3.4x el volumen de la fase sólida.

Extracción de etanol:

80 ml de la fase sólida se extrajeron (Infors Multifors HT, 35°C, 1000 rpm, 30 minutos) con aproximadamente 160 ml (2 vol.) de etanol al 99%, seguido por la 15 centrifugación. El (-)-Ambrox no se cristalizó durante el procedimiento de extracción. Después de 4 lavados (640 ml de etanol total, es decir 3.2x el volumen del caldo de reacción total, inicial u 8x el volumen de la fase sólida), se recuperó aproximadamente 99% del (-)-Ambrox presente 20 inicialmente en el caldo de reacción. Se requiere suficiente etanol en el primer paso de extracción para prevenir la cristalización de (-)-Ambrox (solubilidad en etanol). Cuando solo 1 o 1/2 vol. de la fase sólida se utilizó en el primer paso de extracción, se obtuvo una pasta pegajosa, la cual fue 25 difícil de manejar y el (-)-Ambrox se cristalizó como agujas

en la pelletilla durante la centrifugación. La temperatura no pareció ser el factor responsable de esta cristalización (extracción y centrifugación sometidas a prueba a temperatura ambiente y aproximadamente 35°C-40°C).

5 La concentración de (-)-Ambrox en la fase de etanol así como también la relación de etanol/agua de la fase líquida (humedad residual de la fase sólida) pareció ser responsable de la formación de cristales. Sin embargo, se observó que fue posible reducir el volumen de etanol a 1 vol.
10 de la fase sólida.

 Como el (-)-Ambrox no está en la fase líquida a temperatura ambiente, se separa con la biomasa y se puede extraer con un solvente orgánico (por ejemplo un solvente miscible en agua (por ejemplo etanol) o un solvente
15 inmiscible en agua (por ejemplo tolueno). El paso de centrifugación que separa el (-)-Ambrox en la fase sólida de la mezcla de reacción es ventajoso debido a que reduce la cantidad de solvente requerido para extraer el (-)-Ambrox.

Ejemplo 6

20 Análisis sensorial

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

 La biotransformación del E,E-homofarnesol da por
25 resultado el (-)-Ambrox, y el compuesto (IV).

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

Una mezcla cruda de (-)-Ambrox comprende el
5 (-)-Ambrox deseado, los compuestos (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 cruda se cristaliza selectivamente (a escala de laboratorio), el material
10 cristalizado tiene los mismos componentes que la mezcla cruda, 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 de la siguiente manera:

15 (-)-Ambrox: Umbral de Olor 0.2 ng/l.

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

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

Compuesto (III): umbral de GC aproximadamente 10 x
20 más alto que el (-)-Ambrox (cerca de 2 ng).

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

Ejemplo 7

Recuperación de Ambrox por medio de la extracción por vapor

Pureza resultante del (-)-Ambrox crudo (extraído
5 por vapor) y cristalizado.

La biotransformación del EE:EZ-homofarnesol 86:14
proporcionó una mezcla de reacción que fue extraída por
vapor. El producto destilado por vapor se recolectó como
una mezcla bifásica. La fase orgánica se retuvo y la fase
10 acuosa se desechó. La composición de la fase orgánica se
analizó por medio de GC y los resultados se muestran en la
Tabla a continuación (véase "crudo"). La fase orgánica
luego se concentró hasta sequedad. Luego se agregó etanol
al producto seco, crudo y la mezcla se calentó hasta que
15 el producto se disolvió. A temperatura ambiente se agrega
agua lentamente y el (-)-Ambrox se cristaliza bajo
agitación ocasional y enfriamiento en un baño de hielo.

Los datos tabulados también muestran los
resultados analíticos de GC para productos obtenidos
20 después del paso de extracción por vapor/destilación
("crudo") 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.

25 Los datos tabulados a continuación indican que el

material de partida particular (EEH:EZH 86:14) genera el producto final deseado (-)-Ambrox y una mezcla muy específica de subproductos (II, IV y III) utilizando la enzima WT SHC o un derivado de SHC. Los datos para la

5 cristalización selectiva muestran un fuerte enriquecimiento de (-)-Ambrox, prácticamente sin que se encuentren los subproductos (II), (IV) o (III) en la muestra cristalizada. Por consiguiente, esta mezcla EE:EZ proporciona un producto de (-)-Ambrox olfativamente puro,

10 el cual se cristaliza selectivamente en un material relativamente directo y económico.

Tabla: muestra los resultados analíticos de GC para el producto cristalizado

	Área pico (GC)						Ambrox (%)
	(II)	(IV)	(III)	Ambrox	EZH	EEH	
Crudo	215073	190376	588769	6751605	13429	14184	86.9
Cristalizado	10088	8951	64625	9032941	0	0	99.1

La extracción por vapor/filtración son métodos respetuosos con el medio ambiente para aislar el (-)-Ambrox,

20 debido a que ofrecen un aislamiento libre de solventes, conveniente del (-)-Ambrox con una inactivación asociada del biocatalizador.

El (-)-Ambrox producido utilizando la reacción de bioconversión se puede extraer utilizando solvente de la

25 mezcla de reacción completa (por ejemplo utilizando un

solvente inmiscible en agua o por medio de la extracción por vapor/destilación o por medio de la filtración) o de la fase sólida (por ejemplo, utilizando un solvente miscible en agua) utilizando métodos los cuales son conocidos para aquellas
5 personas de experiencia en el campo.

10

15

20

25