

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, caracterizado porque (3E,7E) homofarnesol (EEH) o una mezcla de estereoisómeros que
5 comprende EEH se convierte enzimáticamente a (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, en donde la conversión enzimática se lleva a cabo usando una enzima SHC/HAC bajo condiciones de reacción adecuadas para la producción de (-)-Ambrox y en donde la mezcla de estereoisómeros que comprende
10 EEH consiste esencialmente de isómeros de homofarnesol seleccionados de uno o más de los siguientes grupos que consisten de [(3E,7E) y [(3Z,7E)] y/o [(3E,7E) y (3E,7Z)] y/o [(3Z,7E), (3E,7E) y (3E,7Z)] también designados como [EE:EZ], [EE:ZE] y [EE:EZ:ZE] respectivamente.
- 15 2. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, caracterizado porque (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de estereoisómeros que comprende EEH se convierte enzimáticamente para dar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox en donde la
20 conversión enzimática usando una enzima SHC/HAC se lleva a cabo bajo condiciones de reacción adecuadas para la producción en (-)-Ambrox y en donde si la reacción se lleva a cabo en la presencia de un agente solubilizador, no se usa Triton X-100 o Taurodesoxicolato en combinación con la enzima
25 SHC/HAC tipo silvestre.

3. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, caracterizado porque (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de estereoisómeros que comprende EEH se convierte enzimáticamente a (-)-Ambrox o una
5 mezcla que comprende (-)-Ambrox en donde la conversión enzimática se lleva a cabo usando una enzima SHC/HAC bajo condiciones de reacción adecuadas para la producción de (-)-Ambrox y en donde la mezcla de estereoisómeros que comprende EEH consiste esencialmente de isómeros de homofarnesol
10 seleccionados del grupo que consiste de [(3E,7E) y [(3Z,7E)] y/o [(3E,7E) y (3E,7Z)] y/o [(3Z,7E), (3E,7E) y (3E,7Z)] también designados como [EE:EZ], [EE:ZE] y [EE:EZ:ZE] respectivamente y en donde la reacción toma lugar en un sistema de tres fases que comprende una fase acuosa, una fase
15 sólida y una fase de aceite.

4. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, 2 ó 3, caracterizado porque se lleva a cabo usando una secuencia de polipéptido de enzima de SHC seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No.
20 3, SEQ ID No. 4, o un derivado de SHC/HAC seleccionado de la Tabla 1, Tabla 5, Tabla 2, Tabla 6, Tabla 3, Tabla 7, Tabla 4, Tabla 8 o Tabla 13 o Tabla 14, o seleccionada de SEQ ID No. 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 171, 173, 175, 177 y/o 178 o una secuencia con al
25 menos 30% de identidad, 40% de identidad, al menos 50% de

identidad, o al menos 60% de identidad, o al menos 70% de
identidad, o al menos 80% de identidad, o al menos 90% de
identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 96% de
identidad, o al menos 97% de identidad, o al menos 98% de
5 identidad, o al menos 99% de identidad a SEQ ID No. 1, SEQ ID
No. 2, SEQ ID No. 3, o SEQ ID No. 4.

5. El proceso de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1-4, caracterizado porque usa células
hospedadoras recombinantes que producen la enzima SHC/HAC.

10 6. El proceso de conformidad con la reivindicación 4
o 5, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos que
codifica para la enzima SHC/HAC se selecciona del grupo que
consiste de SEQ ID No. 165, 166, 167, 168, 169 o SEQ ID No.
6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36,
15 38, 40 y/o 170, 172, 174 y/o 176.

7. El proceso de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1-6, caracterizado porque la conversión de
homofarnesol a (-)-Ambrox tomar lugar a una temperatura en el
intervalo de 30°C a 60°C, a un pH en el intervalo de
20 aproximadamente 4-8.

8. El proceso de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la conversión de
homofarnesol a (-)-Ambrox toma lugar usando una o más de las
condiciones de reacción para la enzima SHC/HAC tipo silvestre
25 o enzimas de derivado de SHC/HAC como se expone en Tabla 24 o

Tabla 24a, preferentemente en un intervalo de pH de 5.0 a 6.2, preferentemente a una temperatura de 35°C.

5 9. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3-8, caracterizado porque la relación SDS/célula en el intervalo de 10:1 a 20:1 preferentemente a 16:1 en donde la relación de biocatalizador a EEH es aproximadamente 2:1.

10 10. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3-9, caracterizado porque la relación en peso de biocatalizador a homofarnesol está en el intervalo de aproximadamente 0.5-2:1, de manera preferente cerca de 1:1 o 0.5:1.

15 11. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3-10, caracterizado porque los pasos de reacción de bioconversión y crecimiento celular se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción.

20 12. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2, caracterizado porque el sustrato de homofarnesol comprende uno o más estereoisómeros de homofarnesol.

 13. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12, caracterizado porque el sustrato de homofarnesol comprende o consiste esencialmente de dos estereoisómeros de homofarnesol.

25 14. El proceso de conformidad con la reivindicación

13, caracterizado porque el sustrato de homofarnesol comprende o consiste esencialmente de estereoisómeros EE:EZ.

15. El proceso de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el homofarnesol comprende o consiste esencialmente de una mezcla de estereoisómeros EE:EZ en las relaciones en peso seleccionadas del peso que consiste de 100:00; 99:01; 98:02; 97:03; 96:04; 95:05; 94:06; 93:07; 92:08; 91:09; 90:10; 89:11; 88:12; 87:13; 86:14; 85:15; 84:16; 83:17; 82:18; 81:19; 80:20; 79:21; 78:22; 77:23; 76:24; 75:25; 74:26; 73:27; 72:28; 71:29 70:30; 69:31; 68:32; 67:33; 66:34; 65:35; 64:36; 63:37; 62:38; 61:39; y/o 60:40.

16. El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el homofarnesol comprende o consiste esencialmente de una mezcla de estereoisómeros EE:EZ en una relación en peso seleccionada del grupo que consiste de EE:EZ 92:08; EE:EZ 90:10; EE:EZ 80:20; EE:EZ 86:14; EE:EZ 70:30; EE:EZ 69:31; y/o EE:EZ 66:34.

17. El proceso de conformidad con la reivindicación 15 o 16, caracterizado porque el homofarnesol comprende o consiste esencialmente de una mezcla de estereoisómeros de EE:EZ en una relación en peso de 80:20.

18. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, caracterizado porque se produce (-)-Ambrox en mezcla con al menos uno o más de los subproductos (II), (IV) y/o (III).

19. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque (-)-Ambrox se aísla de la mezcla de reacción de bioconversión usando un solvente orgánico o un paso de extracción/destilación o
5 filtración.

20. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, caracterizado porque (-)-Ambrox se aísla de la fase sólida de la mezcla de reacción de bioconversión usando un solvente orgánico o un paso de
10 destilación con vapor/destilación.

21. El proceso de conformidad con la reivindicación 19 o 20, caracterizado porque el (-)-Ambrox se aísla de la mezcla de reacción usando un solvente orgánico, preferentemente etanol o tolueno.

15 22. El proceso de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el (-)-Ambrox se aísla de la mezcla de reacción usando etanol o tolueno.

23. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19-22, caracterizado porque el (-)-Ambrox se
20 cristaliza selectivamente usando un solvente orgánico.

24. El proceso de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el Ambrox está sustancialmente libre de los subproductos (II), (IV) y/o (III).

25 25. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, caracterizado porque se produce (-)-

Ambrox en un intervalo de concentración de aproximadamente 125-200g/l.

26. (-)-Ambrox obtenible por el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-25, caracterizado porque el (-)-Ambrox tiene un umbral de olor de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5ng/l.

27. El (-)-Ambrox de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque está en una forma sólida, preferentemente una forma amorfa o cristalina.

28. Un proceso para producir un producto que contiene (-)-Ambrox, caracterizado porque comprende incorporar el (-)-Ambrox de conformidad con la reivindicación 26 o 27 en el producto.

29. El proceso de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el producto es un producto de fragancia, un cosmético, un producto de limpieza, un producto detergente o un producto de jabón.

30. Una fragancia o cosmético o producto de cuidado de consumidor, caracterizada porque comprende el (-)-Ambrox de conformidad con la reivindicación 26 o 27.

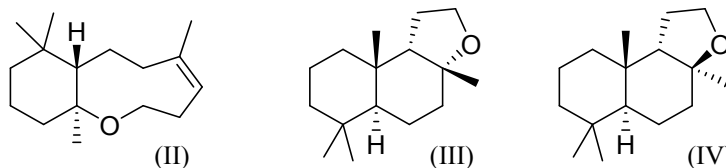
31. Una fragancia o cosmético o composición de cuidado de consumidor, caracterizada porque comprende el (-)-Ambrox de conformidad con la reivindicación 26 o 27 y uno o más componentes adicionales.

32. El uso del (-)-Ambrox de conformidad con la

reivindicación 26 o 27, como parte de una fragancia o cosmético o un producto de consumidor tal como un producto de cuidado de telas, un producto de artículos de tocador, de cuidado de belleza y/o un producto de limpieza.

5 33. Un proceso para aumentar, mejorar o impartir un aroma en o a una composición de fragancia, caracterizado porque comprende el paso de mezclar con la composición de fragancia, un producto aumentador o mejorador de aroma producido de acuerdo a un proceso que comprende los pasos de:

10 (a) preparar una mezcla de reacción que comprende (-)-Ambrox en mezcla con uno o más de los compuestos de subproducto (II), (III) o (IV).



(b) extraer (-)-Ambrox en mezcla con uno o más de los compuestos de subproducto (II), (III) o (IV); y

(c) cristalizar selectivamente (-)-Ambrox de la mezcla de reacción;

20 en donde el (-)-Ambrox se prepara por una conversión enzimática de (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de estereoisómeros que comprende EEH usando una enzima SHC/HAC bajo condiciones de reacción adecuadas para la producción de (-)-Ambrox y en donde la mezcla de estereoisómeros que
25 comprende EEH consiste esencialmente de isómeros de

homofarnesol seleccionados del grupo que consiste de [(3E,7E) y [(3Z,7E)] y/o [(3E,7E) y (3E,7Z)] y/o [(3Z,7E), (3E,7E) y (3E,7Z)] también designados como EE:EZ], [EE:ZE] y [EE:EZ:ZE] respectivamente.

5 34. El proceso de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la reacción toma lugar en un sistema de tres fases que comprende una fase acuosa, una fase líquida y una fase de aceite.

10 35. El proceso de conformidad con la reivindicación 33 o 34, caracterizado porque en el proceso se lleva a cabo usando una secuencia de polipéptido de enzima SHC/HAC seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3; SEQ ID No. 4, o un derivado de SHC/HAC seleccionado de Tabla 1, Tabla 5, Tabla 2, Tabla 6, Tabla 3,
15 Tabla 7, Tabla 4, Tabla 8 o Tabla 14, o seleccionada de SEQ ID No. 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 171, 173, 175 y/o 177 o una secuencia con al menos 30% de identidad, al menos 40% de identidad, al menos 50% de identidad, o al menos 60% de identidad, o al menos 70%
20 de identidad, o al menos 80% de identidad, o al menos 90% de identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 96% de identidad, o al menos 97% de identidad, o al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad a SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, o SEQ ID No. 4.

25 36. El proceso de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 33-35, caracterizado porque usa células hospedadoras recombinantes que producen la enzima SHC/HAC.

37. El proceso de conformidad con la reivindicación 35 o 36, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos que
5 codifica para la enzima SHC/HAC se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID No. 165, 166, 167, 168, 169 o SEQ ID No. 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 y/o 170, 172, 174 y/o 176.

38. El proceso de conformidad con cualquiera de las
10 reivindicaciones 33-37, caracterizado porque la conversión de homofarnesol a (-)-Ambrox toma lugar a una temperatura en el intervalo de 30°C a 60°C, a un pH en el intervalo de aproximadamente 4-8.

39. El proceso de conformidad con cualquiera de las
15 reivindicaciones 33-38, caracterizado porque la conversión de homofarnesol a (-)-Ambrox toma lugar usando una o más de las condiciones de reacción para las enzimas de derivado de SHC/HAC o SHC/HAC tipo silvestre como se expone en la Tabla 24 o Tabla 24a, preferentemente a un intervalo de pH de 5.0 a
20 6.2, preferentemente a una temperatura de 35°C.

40. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34-39, caracterizado porque la relación SDS/célula en el intervalo de 10:1 a 20:1, de manera preferente a 16:1 cuando la relación de biocatalizador a EEH
25 es aproximadamente 2:1.

41. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34-40, caracterizado porque la relación en peso de biocatalizador a homofarnesol está en el intervalo de aproximadamente 0.5-2:1, de manera preferente cerca de 1:1 o 0.5:1.

42. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34-41, caracterizado porque la reacción de bioconversión y concentración celular se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción.

43. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-42, caracterizado porque el sustrato de homofarnesol comprende o consiste esencialmente de una mezcla de estereoisómeros EE:EZ en las relaciones en peso seleccionadas del grupo que consiste de: 100:00; 99:01; 98:02; 97:03; 96:04; 95:05; 94:06; 93:07; 92:08; 91:09; 90:10; 89:11; 88:12; 87:13; 86:14; 85:15; 84:16; 83:17; 82:18; 81:19; 80:20; 79:21; 78:22; 77:23; 76:24; 75:25; 74:26; 73:27; 72:28; 71:29 70:30; 69:31; 68:32; 67:33; 66:34; 65:35; 64:36; 63:37; 62:38; 61:39; y 60:40.

44. El proceso de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el homofarnesol comprende o consiste esencialmente de una mezcla de estereoisómeros EE:EZ en una relación en peso seleccionada del grupo que consiste de: EE:EZ 92:8; EE:EZ 90:10; EE:EZ 80:20; EE:EZ 86:14; EE:EZ 70:30; EE:EZ 69:31;y EE:EZ 66:34.

45. El proceso de conformidad con la reivindicación 43 o 44, caracterizado porque el homofarnesol comprende o consiste esencialmente de una mezcla de estereoisómeros EE:EZ en una relación en peso de 80:20.

5 46. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-45, caracterizado porque (-)-Ambrox se produce en mezcla con al menos uno o más de los subproductos (II), (IV) y/o (III).

10 47. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-46, caracterizado porque el (-)-Ambrox de la mezcla de reacción de bioconversión usando un solvente orgánico o un paso de extracción/destilación por vapor o filtración.

15 48. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-47, caracterizado porque el (-)-Ambrox se aísla de la fase sólida de la mezcla de reacción de bioconversión usando un solvente orgánico o un paso de destilación/extracción con vapor.

20 49. El proceso de conformidad con la reivindicación 47 o 48, caracterizado porque el (-)-Ambrox se aísla de la mezcla de reacción usando un solvente orgánico.

 50. El proceso de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque (-)-Ambrox se aísla de la mezcla de reacción usando etanol o tolueno.

25 51. El proceso de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 47-49, caracterizado porque el (-)-Ambrox se cristaliza selectivamente usando un solvente orgánico.

52. El proceso de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el (-)-Ambrox está sustancialmente libre de los subproductos (II), (IV) y/o (III).

53. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-52, caracterizado porque se produce (-)-Ambrox en un intervalo de concentración de aproximadamente 125-200 g/l.

54. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33-53, caracterizado porque el (-)-Ambrox tiene un umbral de olor de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 ng/l.

15

20

25