

VARIANTES DE ESCUALENO HOPENO CICLASA (SHC)

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona en general con enzimas SHC/HAC y variantes de las mismas. La presente invención se relaciona además con los diversos usos de las enzimas SHC/HAC y variantes de las mismas, por ejemplo, para convertir enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) a (-)-Ambrox o para convertir enzimáticamente E,E-bishomofarnesol (BisEEH) al óxido de Ambra. La presente invención también se relaciona con los productos de las reacciones enzimáticas, por ejemplo, el (-)-Ambrox o el óxido de Ambra elaborado usando las enzimas SHC/HAC y sus variantes, y los diversos usos de tales productos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las escualeno hopeno ciclasas (SHC, por sus siglas en inglés) son enzimas unidas a la membrana que actúan como biocatalizadores para la ciclación del escualeno triterpenoide lineal a hopeno y hopanol.

Se ha demostrado que varias enzimas SHC de tipo salvaje y variantes de una variedad de bacterias son útiles para convertir (3E,7E)-homofarnesol en (-)-Ambrox (ver, por ejemplo, WO 2016/170099; WO 2018/ 157021, Neumann & Simon 1986, Biol Chem Hoppe-Seyler 367, 723-729, JP2009060799, Seckler & Poralla 1986, Biochem Biophys Act 356-363, Ochs *et al.*, 1990,

J Bacteriol 174, 298-302, WO 2010/139719; US 8759043, WO 2012/066059, Seitz *et al.*, 2012, J Molecular Catalysis B: Enzymatic 84, 72-77 y Tesis doctoral de Seitz 2012 (<http://elib.uni-stuttgart.de/handle/11682/1400>), cuyo
5 contenido se incorpora en la presente como referencia). Es deseable proporcionar métodos nuevos y mejorados para producir (-)-Ambrox, por ejemplo, usando nuevas enzimas SHC o variantes de enzimas. También es deseable proporcionar métodos nuevos y mejorados para ciclar otros sustratos, por ejemplo, para formar
10 compuestos útiles en o como fragancias.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, el proceso comprende convertir
15 enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH a (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una variante de enzima SHC/HAC,

en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una
20 secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70.0% de identidad con la SEC ID NO.: 1,

en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la SEC ID NO.: 1 en las posiciones correspondientes a las
25 posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1 que son M132R,

A224V e I432T respectivamente, y

en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la SEC ID NO.: 1 en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona (-)-Ambrox obtenido u obtenible mediante el proceso del primer aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad del mismo.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso del (-)-Ambrox del segundo aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad del mismo, como parte de una fragancia o un cosmético o un producto de consumo.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una fragancia o un cosmético o un producto de consumo que comprende (-)-Ambrox del segundo aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad del mismo.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una variante de enzima SHC/HAC que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1,

en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la

enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1 que son M132R, A224V e I432T respectivamente, y

5 en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene además alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC
10 ID NO.: 1.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de la enzima SHC/HAC del quinto aspecto de la presente invención, que incluye cualquier modalidad de la misma.

15 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona una construcción que comprende la secuencia de ácido nucleico del sexto aspecto de la presente invención, que incluye cualquier modalidad de la misma.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención,
20 se proporciona un vector que comprende la construcción del séptimo aspecto de la presente invención, que incluye cualquier modalidad del mismo.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, se proporciona una célula hospedera recombinante que comprende
25 la secuencia de ácido nucleico del sexto aspecto de la presente

invención, la construcción del séptimo aspecto de la presente invención o el vector del octavo aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad de la misma.

De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención se proporciona un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, comprendiendo el proceso convertir enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH a (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, y en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada entre las posiciones correspondientes a las posiciones 557, 81, 431 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

De acuerdo con un undécimo aspecto de la presente invención, se proporciona una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con un aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, y en donde la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con

respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a las posiciones 557, 81, 431 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

De acuerdo con un duodécimo aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, el proceso comprende convertir enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH a (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC tiene un aminoácido secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

De acuerdo con un decimotercer aspecto de la presente invención, se proporciona una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

De acuerdo con un decimocuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar óxido de Ambra, comprendiendo el proceso convertir enzimáticamente E,E-Bishomofarnesol o una mezcla de isómeros de bishomofarnesol que comprende E,E-Bishomofarnesol en óxido de Ambra o una

mezcla que comprende Óxido de Ambra usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, estar de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención.

5 De acuerdo con un decimoquinto aspecto de la presente invención, se proporciona óxido de Ambra obtenido u obtenible mediante el proceso del decimocuarto aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad del mismo.

De acuerdo con un decimosexto aspecto de la presente
10 invención, se proporciona el uso del óxido de Ambra del decimoquinto aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad del mismo, como parte de una fragancia o un cosmético o un producto de consumo.

De acuerdo con un decimoséptimo aspecto de la presente
15 invención, se proporciona una fragancia o un cosmético o un producto de consumo que comprende el óxido de Ambra del decimoquinto aspecto de la presente invención, incluyendo cualquier modalidad del mismo.

En algunas modalidades de cualquier aspecto de la presente
20 invención, la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 17, SEC ID NO.: 18, SEC ID NO.: 24, SEC ID NO.: 25, SEC ID NO.: 26, SEC ID NO.: 27, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 y/o SEC ID NO.: 30.

25 En algunas modalidades de cualquier aspecto de la presente

invención, la variante de la enzima SHC/HAC está codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada de la SEC ID NO.: 6, SEC ID NO.: 7, SEC ID NO.: 8, SEC ID NO.: 9, SEC ID NO.: 22 y SEC ID NO.: 23. Algunas modalidades de la presente invención pueden proporcionar una o más de las siguientes ventajas:

- tasa de conversión EEH mejorada, particularmente en las primeras 12 horas o las primeras 6 horas;
- ciclación de nuevos sustratos e/o identificación de nuevos productos;
- productividad mejorada (g/L/hora o g/L/hora/g biocatalizador);
- proceso a escala industrial para preparar productos finales tales como (-)-Ambrox y óxido de Ambra y/o mezclas isoméricas de los mismos;
- selectividad mejorada para EEH sobre otros isómeros de homofarnesol.

Los detalles, ejemplos y preferencias proporcionados en relación con uno o más de los aspectos establecidos de la presente invención se describirán con más detalle en la presente y se aplican por igual a todos los aspectos de la presente invención. La presente invención abarca cualquier combinación de las modalidades, ejemplos y preferencias descritas en la presente en todas sus variaciones posibles, a menos que se indique lo contrario en la presente, o que el

contexto lo contradiga claramente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las actividades relativas de las variantes de SHC en condiciones de reacción iniciales y optimizadas. Las reacciones se realizaron a 4 g/L de EEH y biocatalizador cargado a una OD_{650nm} de 10.0, ya sea en las condiciones iniciales (35°C, pH 5.4, 0.070% SDS), o en T, pH y [SDS] ajustados a las condiciones definidas como óptimas para cada una de las variantes (condiciones optimizadas).

La Figura 2 muestra la actividad relativa de las variantes de SHC en condiciones optimizadas en comparación con la enzima original 215G2 SHC. Las reacciones se llevaron a cabo a 4 g/L de EEH y el biocatalizador se cargó a una OD_{650nm} de 10.0, T, pH y [SDS] establecidos en condiciones definidas como óptimas para cada una de las variantes.

La Figura 3 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por variantes de la enzima SHC/HAC en condiciones óptimas en comparación con la enzima SHC/HAC original 215G2. Las reacciones se realizaron a 125 g/L de EEH y 250 g/L de biocatalizador en presencia de 1.3% de SDS, y a las condiciones de T y pH definidas como óptimas para cada una de las variantes.

La Figura 4 muestra el mejoramiento relativo de la conversión de EEH con las mejores variantes de la enzima SHC/HAC en comparación con la enzima original 215G2 SHC/HAC de referencia. Las reacciones se realizaron a 125 g/L de EEH y

250 g/L de biocatalizador en presencia de 1.3% de SDS, y a las condiciones de T y pH definidas como óptimas para cada una de las variantes. En todos los puntos de tiempo, la conversión de EEH obtenida con 215G2 SHC se estableció en 100% (referencia).

5 La Figura 5 muestra la actividad relativa de las variantes de SHC/HAC en condiciones óptimas en comparación con la enzima original (referencia) 215G2 SHC/HAC. Las reacciones se realizaron a 4 g/L de BisEEH y el biocatalizador se cargó a una OD_{650nm} de 10.0. T, pH y [SDS] se ajustaron a las condiciones
10 definidas como óptimas para cada una de las variantes.

La Figura 6 muestra la ciclación de bishomofarnesol con la enzima original (referencia) 215G2 SHC/HAC y nuevas variantes de enzimas SHC/HAC. Las reacciones se llevaron a cabo a 125 g/L de BisEEH y 250 g/L de biocatalizador en presencia
15 de SDS al 1.3% y a 35°C y pH 5.4 (todas las enzimas SHC).

La Figura 7 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos entre 215G2 SHC/HAC (SEC ID NO.: 10) y las variantes de la enzima SHC/HAC #49 (SEC ID NO.: 2), #65 (SEC ID NO.: 3), #66 (SEC ID NO.: 3), #66 (SEC ID NO.: 4), #90C7 (SEC ID NO.:
20 17), #110B8 (SEC ID NO.: 5) y #115A7 (SEC ID NO.: 18).

La Figura 8 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos entre 215G2 (SEC ID NO.: 10) y variantes de enzimas SHC/HAC derivadas de 215G2 con una o más de las sustituciones V174I, F601Y y L37Q.

25 La Figura 9A muestra una alineación de secuencias de

aminoácidos usando CLUSTAL O (1.2.4) entre AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) y TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12), BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13) y GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14). Las posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje están resaltadas con una letra blanca sobre un fondo negro.

La Figura 9B muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos usando CLUSTAL O (1.2.4) entre AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) y TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12), BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13), GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14), Bme SHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 28), SalSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 29) y ApaSHCA de tipo salvaje (SEC ID NO.: 30), posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje están resaltados con una letra blanca sobre un fondo negro.

La Figura 10 es el esquema de reacción usado para producir una mezcla inicial de E,E/Z-Bishomofarnesol.

La Figura 11 es el esquema de reacción que muestra la ciclación de bishomofarnesol con enzimas SHC. El bishomofarnesol usado consistió en una mezcla de isómeros.

La Figura 12 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por variantes de enzima SHC/HAC en condiciones óptimas en comparación con la enzima SHC/HAC original 215G2. Las reacciones se realizaron a 125 g/L de EEH y 250 g/L de biocatalizador en presencia de 1.3% de SDS, y a las condiciones de T y pH definidas como óptimas para cada una de las variantes.

La Figura 13 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por variantes de enzima SHC/HAC en condiciones óptimas en comparación con la enzima SHC/HAC original 215G2. Las reacciones se realizaron a 125 g/L de EEH y 125 g/L de biocatalizador en presencia de 0.65% de SDS, y a las condiciones de T y pH definidas como óptimas para cada una de las variantes.

La Figura 14 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por la variante de enzima SHC/HAC SHC#65 bajo condiciones óptimas en comparación con la enzima SHC/HAC original 215G2. Las reacciones se realizaron a 125 g/L a 300 g/L de EEH y 250 g/L de biocatalizador o a una relación [EEH]:[células] de 1. Se suministró SDS a una relación constante [SDS]:[células] de 0.052. Las reacciones se realizaron en condiciones de T y pH definidas como óptimas para la variante SHC SHC#65.

La Figura 15 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1), BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13), Bme SHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 28), GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14), ApaSHCA de tipo

salvaje (SEC ID NO.: 30), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), SalSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 29), TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11) y ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12). Las reacciones se realizaron a 4 g/L de EEH para todas las enzimas SHC de tipo salvaje enumeradas y a 125 g/L de EEH para todas las enzimas SHC de tipo salvaje enumeradas distintas de ApaSHCA de tipo salvaje (SEC ID NO.: 30), SalSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 29), TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19) y de tipo salvaje ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12). Las reacciones se realizaron en condiciones de T y pH y la concentración de SDS se definió como óptima para cada enzima SHC de tipo salvaje enumerada. La concentración de SDS se ajustó en la bioconversión EEH de 125 g/L para permitir la mejor actividad biocatalizadora.

La Figura 16 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por SHC/HAC. Las bioconversiones se corrieron con el biocatalizador SHC#65. Las reacciones se realizaron a 125 g/L de EEH con 150 g/L de células, a 45°C y pH 5.6, y en presencia de 0.060 a 0.090% de SDS correspondiente a una relación [SDS]: [células] que oscila entre 0.040 y 0.060. Se indican los valores de conversión de EEH a las 72 h de reacción.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID NO.: 1 es la secuencia de aminoácidos de SHC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac) de tipo salvaje.

SEC ID NO.: 2 corresponde a la SEC ID NO.: 1 con las

sustituciones M132R, A224V, I432T, A557T y H431L y puede denominarse variante de enzima SHC/HAC #49 en la presente.

SEC ID NO.: 3 corresponde a la SEC ID NO.: 1 con las sustituciones M132R, A224V, I432T, A557T y R613S y puede denominarse variante de enzima SHC/HAC #65 en la presente.

SEC ID NO.: 4 corresponde a la SEC ID NO.: 1 con las sustituciones M132R, A224V, I432T, Y81H, A557T y R613S y puede denominarse variante de enzima SHC/HAC #66 en la presente.

SEC ID NO.: 5 corresponde a la SEC ID NO.: 1 con las sustituciones M132R, A224V, I432T, Y81H, H431L y A557T y puede denominarse variante de enzima SHC/HAC #110B8 en la presente.

SEC ID NO.: 6 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID NO.: 2 (variante de enzima SHC/HAC #49).

SEC ID NO.: 7 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID NO.: 3 (variante de enzima SHC/HAC #65).

SEC ID NO.: 8 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID NO.: 4 (variante de enzima SHC/HAC #66).

SEC ID NO.: 9 es la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID NO.: 5 (variante de enzima SHC/HAC #110B8).

SEC ID NO.: 10 puede denominarse 215G2 y corresponde a la secuencia de aminoácidos de AacSHC de tipo salvaje con las

mutaciones M132R, A224V e I432T.

SEC ID NO.: 11 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de ZmoSHC1.

5 SEC ID NO.: 12 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de ZmoSHC2.

SEC ID NO.: 13 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de BjpSHC/BjaSHC.

SEC ID NO.: 14 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de GmoSHC.

10 SEC ID NO.: 15 es la secuencia de nucleótidos que codifica el AacSHC de tipo salvaje.

SEC ID NO.: 16 es la secuencia de nucleótidos que codifica 215G2 SHC.

15 SEC ID NO.: 17 corresponde a SEC ID NO.: 1 con las sustituciones M132R, A224V, I432T, T90A y R613S y puede denominarse variante de enzima SHC/HAC #90C7 en la presente.

SEC ID NO.: 18 corresponde a la SEC ID NO.: 1 con las sustituciones M132R, A224V, I432T, A172T y M277K y puede denominarse variante de enzima SHC/HAC #115A7 en este
20 documento.

SEC ID NO.: 19 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de TelSHC.

SEC ID NO.: 20 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de ApaSHC1.

25 SEC ID NO.: 21 es una variante de GmoSHC.

SEC ID NO.: 22 es la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la SEC ID NO.: 17 (variante de enzima SHC/HAC #90C7).

SEC ID NO.: 23 es la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la SEC ID NO.: 18 (variante de enzima SHC/HAC #115A7).

SEC ID NO.: 24 es la secuencia de aminoácidos de la variante 215G2 SHC de SHC/HAC con la mutación adicional L37Q.

SEC ID NO.: 25 es la secuencia de aminoácidos de la variante 215G2 SHC de SHC/HAC con la mutación adicional V174I.

SEC ID NO.: 26 es la secuencia de aminoácidos de la variante 215G2 SHC de SHC/HAC con las mutaciones adicionales V174I y F601Y.

SEC ID NO.: 27 es la secuencia de aminoácidos de la variante 215G2 SHC de SHC/HAC con las mutaciones adicionales L37Q, V174I y F601Y.

SEC ID NO.: 28 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de BmeSHC.

SEC ID NO.: 29 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de SalSHC.

SEC ID NO.: 30 es la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de ApaSHCA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

ENZIMAS SHC/HAC Y VARIANTES DE LAS MISMAS

Como se usa en la presente, el término "enzima SHC"

significa una enzima escualeno hopeno ciclasa de tipo salvaje (WT) que se produce de forma natural, por ejemplo, en una bacteria termófila, tal como *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Las SHC que actúan en la ciclación de homofarnesol a Ambrox también pueden denominarse enzimas Homofarnesol Ambrox Ciclasa (HAC). Por lo tanto, el término "enzima SHC/HAC" puede usarse en la presente.

Como se usa en la presente, el término "variante" debe entenderse como un polipéptido que difiere en comparación con el polipéptido del que se deriva por uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos. El polipéptido del que se deriva una variante también se conoce como polipéptido original o de referencia. Por lo general, una variante se construye artificialmente, de preferencia por medios tecnológicos genéticos. Normalmente, el polipéptido del que se deriva la variante es una proteína de tipo salvaje o un dominio de proteína de tipo salvaje. Sin embargo, las variantes utilizables en la presente descripción también pueden derivarse de homólogos, ortólogos o parálogos del polipéptido original o de variantes construidas artificialmente, siempre que la variante muestre por lo menos una actividad biológica del polipéptido original. Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden ser intercambios de aminoácidos (sustituciones), inserciones, eliminaciones, truncamientos N-terminales o truncamientos C-terminales, o cualquier

combinación de estos cambios, que se pueden presentar en uno o varios sitios.

Como se usa en la presente, el término "variante de la enzima SHC/HAC" significa una enzima que se deriva de una enzima SHC de tipo salvaje, pero que tiene una o más alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC de tipo salvaje y, por lo tanto, no se produce de forma natural en un procariota. Las alteraciones de uno o más aminoácidos pueden, por ejemplo, modificar (por ejemplo, aumentar) la actividad enzimática para un sustrato (por ejemplo, EEH).

Las pruebas para determinar y cuantificar la actividad de la enzima SHC/HAC y/o la variante de la enzima SHC/HAC se describen en la presente y son conocidas en la técnica. A modo de ejemplo, la actividad de la enzima SHC/HAC y/o la variante de la enzima SHC/HAC puede determinarse incubando la enzima SHC/HAC purificada o la variante de la enzima o extractos de células hospederas o un organismo hospedero recombinante completo que haya producido la enzima SHC/HAC o una variante enzimática con un sustrato adecuado en las condiciones adecuadas y realizando un análisis de los productos de reacción (por ejemplo, mediante cromatografía de gases (GC) o análisis HPLC). En los Ejemplos se proporcionan más detalles sobre las pruebas de actividad de la enzima SHC/HAC y/o variante de la enzima SHC/HAC y el análisis de los productos de reacción. Estas pruebas incluyen la producción de la variante de la

enzima SHC/HAC en células hospederas recombinantes (por ejemplo, *E. coli*).

Como se usa en la presente, el término "actividad" significa la capacidad de una enzima para reaccionar con un sustrato para proporcionar un producto deseado. La actividad se puede determinar en lo que se conoce como prueba de actividad para controlar la formación del producto deseado. Los derivados de la enzima SHC/HAC de la presente descripción pueden caracterizarse por su capacidad para ciclar homofarnesol (por ejemplo, EEH) en (-)-Ambrox y demostrar una actividad biológica tal como una actividad HAC. Los derivados de la enzima SHC/HAC de la presente descripción pueden caracterizarse por su capacidad para ciclar bishomofarnesol (por ejemplo, E,E-bishomofarnesol) en óxido de Ambra.

Una "actividad biológica" como se usa en la presente, se refiere a cualquier actividad que un polipéptido pueda exhibir, incluyendo, sin limitación: actividad enzimática; actividad de unión a otro compuesto (por ejemplo, unión a otro polipéptido, en particular unión a un receptor, o unión a un ácido nucleico); actividad inhibidora (por ejemplo, actividad inhibidora de enzimas); actividad activadora (por ejemplo, actividad activadora de enzimas); o efectos tóxicos. No se requiere que la variante muestre tal actividad en la misma medida que el polipéptido original o de tipo salvaje. Una variante se considera una variante dentro del contexto de la presente

solicitud, si exhibe la actividad relevante en un grado de por lo menos 10% de la actividad del polipéptido original. Del mismo modo, una variante se considera una variante en el contexto de la presente solicitud, si muestra la actividad biológica relevante en un grado de por lo menos 10% de la actividad del polipéptido original (ya que los términos derivado y variante se usan indistintamente en toda la presente descripción). En otras modalidades, las variantes de la enzima SHC/HAC de la presente descripción muestran un mejor rendimiento que la proteína SHC de referencia (por ejemplo, una enzima SHC/HAC de tipo salvaje o una variante conocida de la enzima SHC/HAC). El término "rendimiento" se refiere al gramo de producto recuperable por gramo de materia prima (que se puede calcular como una tasa de conversión molar porcentual). En modalidades adicionales, las variantes de la enzima SHC/HAC de la presente descripción muestran una productividad modificada (por ejemplo, aumentada) en relación con la proteína SHC de referencia (por ejemplo, AacSHC de tipo salvaje o 215G2 AacSHC). El término "productividad" se refiere a la cantidad de producto recuperable en gramos por litro de capacidad de reacción por hora de tiempo de bioconversión (es decir, tiempo después de adicionar el sustrato). El término "productividad" también se refiere a la cantidad de producto recuperable en gramos por litro de capacidad de reacción por hora de tiempo de bioconversión (es decir, tiempo después de

adicionar el sustrato) por gramo de biocatalizador usado en la reacción.

En modalidades adicionales, las variantes de la enzima SHC/HAC de la presente descripción muestran un rendimiento
5 modificado en comparación con la proteína SHC de referencia (por ejemplo, AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) o 215G2 AacSHC (SEC ID NO.: 10) o ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11) o ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12) o BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13) o GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.:
10 14) o TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19) o ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20) o BmeSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 28) o SalSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 29) o ApaSHCA de tipo salvaje (SEC ID NO.: 30)). El término "factor de rendimiento objetivo" se refiere a la relación entre la concentración del
15 producto obtenido y la concentración de la enzima variante SHC/HAC (por ejemplo, variante de enzima SHC/HAC purificada o un extracto de las células hospederas recombinantes que producen la variante enzimática SHC/HAC) en el medio de reacción. En varias modalidades, las variantes de la enzima
20 SHC/HAC de la presente descripción muestran un aumento de veces modificado (por ejemplo, aumentado) en la actividad enzimática (por ejemplo, una actividad de homofarnesol Ambrox ciclasa (HAC) modificada/aumentada) en relación con la proteína SHC de referencia (por ejemplo, SEC ID NO.: 1 o SEC ID NO.: 10 o SEC
25 ID NO.: 11 o SEC ID NO.: 12 o SEC ID NO.: 13 o SEC ID NO.: 14

o SEC ID NO.: 19 o SEC ID NO.: 20 o SEC ID NO.: 28 o SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30). Este aumento de actividad puede ser por lo menos por un factor de: 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y/o 100.

Como se usa en la presente, el término "alteración de aminoácidos" significa una inserción de uno o más aminoácidos entre dos aminoácidos, una eliminación de uno o más aminoácidos o una sustitución (que puede ser conservadora o no conservadora) de uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos diferentes en relación con la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de referencia. Las sustituciones reemplazan los aminoácidos de la secuencia de referencia con el mismo número de aminoácidos en la secuencia variante. Las secuencias de aminoácidos de referencia pueden ser, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (WT) (por ejemplo, SEC ID NO.: 1 o SEC ID NO.: 11 o SEC ID NO.: 12 o SEC ID NO.: 13 o SEC ID NO.: 14 o SEC ID NO.: 19 o SEC ID NO.: 20 o SEC ID NO.: 28 o SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30) o puede, por ejemplo, ser en sí mismo una secuencia variante de enzima SHC/HAC (por ejemplo, la variante Aac 215G2 - SEC ID NO.: 10).

Las alteraciones de aminoácidos pueden identificarse fácilmente mediante una comparación de las secuencias de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC con la

secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia.

Se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos, por ejemplo, en base a la similitud en polaridad, carga, tamaño, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos de aminoácidos involucrados. Los 20 aminoácidos naturales descritos anteriormente se pueden agrupar en los siguientes seis grupos de aminoácidos estándares:

- (1) hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena:
Gly, Pro; y
- (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Por consiguiente, como se usa en la presente, el término "sustituciones conservadoras" significa un intercambio de un aminoácido por otro aminoácido enumerado dentro del mismo grupo de los seis grupos de aminoácidos estándares que se muestran arriba. Por ejemplo, el intercambio de Asp por Glu retiene una carga negativa en el polipéptido así modificado. Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse entre sí en función de su capacidad para interrumpir las hélices alfa. Algunas sustituciones conservadoras preferidas dentro de los seis

grupos anteriores son intercambios dentro de los siguientes subgrupos: (i) Ala, Val, Leu e Ile; (ii) Ser y Thr; (ii) Asn y Gln; (iv) Lys y Arg; y (v) Tyr y Phe. Dado el código genético conocido y las técnicas de ADN sintético y recombinante, el científico experimentado puede construir fácilmente ADN que
5 codifican las variantes de aminoácidos conservadoras.

Como se usa en la presente, "sustituciones no conservadoras" o "intercambios de aminoácidos no conservadores" se definen como intercambios de un aminoácido
10 por otro aminoácido enumerado en un grupo diferente de los seis grupos de aminoácidos estándares (1) a (6) como se muestra arriba. Típicamente, las variantes de la enzima SHC/HAC descritas en la presente se preparan usando sustituciones no conservadoras que alteran la función biológica (por ejemplo,
15 la actividad de HAC) de las variantes de la enzima SHC/HAC descritas. Para facilitar la referencia, los símbolos de aminoácidos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB se indican a continuación. Los códigos de tres letras también se
20 proporcionan como referencia.

Código de una letra	Código de tres letras	Nombre del aminoácido
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína

5

10

15

D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

20

25

Las alteraciones de aminoácidos, tal como las sustituciones de aminoácidos, pueden introducirse usando protocolos conocidos de tecnología de genes recombinantes que incluyen PCR, clonación de genes, mutagénesis dirigida al sitio de ADNc, transfección de células hospederas y transcripción *in vitro* que pueden usarse para introducir tales cambios en la

secuencia de referencia que da como resultado una variante de la enzima SHC/HAC. A continuación, las variantes de la enzima pueden examinarse para determinar la actividad funcional de SHC/HAC.

5 Las fuentes adecuadas de enzimas SHC/HAC incluyen, por ejemplo, *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac), *Zymomonas mobilis* (Zmo), *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp), *Gluconobacter morbifer* (Gmo), *Burkholderia ambifaria*, *Bacillus anthracis*, *Methylococcus capsulatus*, *Frankia alni*, *Acetobacter*
 10 *pasteurianus* (Apa), *Thermosynechococcus elongatus* (Tel), *Streptomyces coelicolor* (Sco), *Rhodopseudomonas palustris* (Rpa), *Teredinibacter turnerae* (Ttu), *Pelobacter carbinolicus* (Pca), *Bacillus megaterium* (Bme), *Streptomyces albolongus* (Sal) y *Tetrahymena pyriformis* (ver, por ejemplo WO
 15 2010/139719, US 2012/01345477, WO 2012/066059, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia).

En particular, la enzima SHC/HAC (por ejemplo, de la cual la variante de la enzima SHC/HAC puede derivarse) puede ser la enzima *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac) SHC/HAC, la
 20 enzima *Zymomonas mobilis* SHC/HAC (ZmoSHC1) la enzima *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp o Bja) SHC/HAC o la enzima *Gluconobacter morbifer* (Gmo) SHC/HAC o una enzima *Acetobacter pasteurianus* SHC/HAC (ApaSHC1) o la enzima *Bacillus megaterium* (Bme) SHC/HAC. En particular, la enzima SHC/HAC (por ejemplo,
 25 de la que puede derivarse la variante de la enzima SHC/HAC)

puede ser la enzima SHC/HAC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac).

Para facilitar la referencia, la designación "AacSHC" puede usarse para referirse a la enzima SHC/HAC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac), "ZmoSHC" puede usarse para referirse a las enzimas SHC/HAC de *Zymomonas mobilis* (Zmo), "BjpSHC" o "BjaSHC" puede usarse para referirse a la enzima *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp) SHC/HAC, "ApaSHC" puede usarse para referirse a las enzimas *Acetobacter pasteurianus* (Apa) SHC/HAC, "BmeSHC" puede usarse para referirse a *Bacillus megaterium* (Bme) SHC/HAC, "SalSHC" puede usarse para referirse a la enzima *Streptomyces albolongus* (Sal) SHC/HAC y "GmoSHC" puede usarse para referirse a la enzima *Gluconobacter morbifer* (Gmo) SHC/HAC.

Las secuencias de enzimas AacSHC, ZmoSHC y BjpSHC se describen en BASF WO 2010/139719, US 2012/01345477A1, Seitz *et al.*, (como se citó anteriormente) y Seitz (tesis doctoral de 2012 como se citó anteriormente). Se describen dos secuencias diferentes para ZmoSHC, denominadas ZmoSHC1 y ZmoSHC2. La secuencia de la enzima Gmo SHC/HAC se describe en WO 2018/157021. La enzima SalSHC se describe en Liu *et al.*, (2020): A Novel Soluble Squalene-Hopene Cyclase and Its Application in Efficient Synthesis of Hopene, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, artículo 426, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00426>).

La Tabla 1 describe las fuentes y los números de acceso de las enzimas SHC de tipo salvaje.

Tabla 1. Fuentes y números de acceso de enzimas SHC de tipo salvaje (WT).

5	Cepa de fuente SHC (nombre SHC)	Referencia (e incorporado en la presente por referencia)	Acceso No.	SEC ID NO.: de acuerdo con WO 2010139719 US2012/0135477 (*) o a la presente descripción (**)
10	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (WT AacSHC)	JP2009-060799 (Kao) Neumann <i>et al.</i> , Biol Chem (1986) 367; 723-729	NBRC15652	SEC ID NO.: 1**
15	<i>Zymomonas mobilis</i> (WT ZmoSHC1)	WO2010139719 US20120135477	ATCC31821 PF62207_2 Genpept Acceso No. AAV90172 AAF12829.1 AVZ42714.1	SEC ID NO.: 1* SEC ID NO.: 2*
20	Cepa de fuente SHC (nombre SHC)	Referencia (e incorporado en la presente por referencia)	Acceso No.	SEC ID NO.: de acuerdo con WO 2010139719 US2012/0135477 (*) o a la presente descripción (**)
25	<i>Zymomonas mobilis</i> (WT ZmoSHC2)	Reipen <i>et al.</i> , (1995) Microbiology 141:155-161	EMBL/Genbank Acceso No. X80766	SEC ID NO.: 12**
	<i>Bradryhizobium japonicum</i> (WT BjpSHC)	WO2010139719 US2012/0135477	PF62207_5 ABQ33590.1	SEC ID NO.: 5*
	<i>Burkholderia ambifaria</i>	WO2010139719 US2012/0135477		SEC ID NO.: 6*

5

10

15

20

<i>Burkholderia ambifaria</i>	WO2010139719 US2012/0135477		SEC ID NO.: 7*
<i>Bacillus anthracis</i>	WO2010139719 US2012/0135477		SEC ID NO.: 8*
<i>Frankia alni</i>	WO2010139719 US2012/0135477		SEC ID NO.: 9*
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	WO2010139719 US2012/0135477		SEC ID NO.: 10*
<i>Gluconobacter morbifer</i> (WT GmoSHC)	WO2018157021	EHH69691.1	SEC ID NO.: 14**
<i>Thermosynechococcus elongates</i> (TelSHC)		BAC09861.1	SEC ID NO.: 19**
<i>Acetobacter pasteurianus</i> (ApaSHC1)		ASC07046.1	SEC ID NO.: 20**
<i>Bacillus megaterium</i> (WT BmeSHC)		WP 016763969	SEC ID NO.: 28**
Cepa de fuente SHC (nombre SHC)	Referencia (e incorporado en la presente por referencia)	Acceso No.	SEC ID NO.: de acuerdo con WO 2010139719 US2012/0135477 (*) o a la presente descripción (**)
<i>Streptomyces albolongus</i> (WT SalSHC)		AZN28579	SEC ID NO.: 29**
<i>Acetobacter pasteurianus</i> (WT ApaSHCA)		WP 003625617	SEC ID NO.: 30**

Las secuencias de AacSHC de tipo salvaje, ZmoSHC1 de tipo salvaje, ZmoSHC2 de tipo salvaje, BjpSHC de tipo salvaje, GmoSHC de tipo salvaje, TelSHC de tipo salvaje y ApaSHC1 de tipo salvaje, BmeSHC de tipo salvaje, SalSHC de tipo salvaje y

ApaSHCA de tipo salvaje, también se describen en la presente (SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 y SEC ID NO.: 30 respectivamente).

5 Una alineación de las secuencias WT SHC preparada por Hoshino and Sato (2002 como se citó anteriormente) indica que se detectaron múltiples motivos en las cuatro secuencias y consiste en la secuencia central Gln-X-X-X-Gly-X-Trp que se encuentra seis veces en el SHC secuencias tanto de *Z. mobilis*
10 como de *A. acidocaldarius* (ver la Figura 3 de Reipen *et al.*, 1995, Microbiology 141, 155-161). Hoshino and Sato (2002, citado anteriormente) reportan que los aminoácidos aromáticos son inusualmente abundantes en los SHC y que se observaron dos motivos característicos en los SHC: uno es un motivo QW
15 representado por motivos de aminoácidos específicos [(K/R) (G/A)X2-3 (F/Y/W) (L/IV) 3X3QX2-5GXW] y la alternativa es un motivo DXDDTA. Wendt *et al.*, (1997, Science 277, 1811-1815 y 1999, J Mol Biol 286, 175-187) reportaron sobre el análisis de la estructura de rayos X de *A. acidocaldarius* SHC. El motivo
20 DXDDTA parece correlacionarse con el sitio activo SHC.

Una proteína AacSHC de referencia como se usa en el presente documento puede referirse a la proteína AacSHC de tipo salvaje como se describe en SEC ID NO.: 1. AacSHC tiene la actividad de una homofarnesol Ambrox ciclasa (HAC) útil en la
25 producción de derivados de Ambrox a través de una reacción

biocatalítica de SHC con un sustrato de homofarnesol. La principal reacción de AacSHC es la ciclación de un sustrato lineal o no lineal como el homofarnesol para producir Ambrox.

Los homólogos funcionales de las enzimas SHC/HAC de tipo salvaje o las variantes de enzimas SHC/HAC descritas en la presente también son adecuados para usar en reacciones de ciclación, por ejemplo para producir (-)-Ambrox, por ejemplo, en un hospedero recombinante. Por lo tanto, el hospedero recombinante puede incluir uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican homólogos funcionales de los polipéptidos descritos anteriormente y/o un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima derivada de SHC/HAC como se describe en la presente.

Un homólogo funcional es un polipéptido que tiene una secuencia similar a un polipéptido de referencia y que lleva a cabo una o más funciones bioquímicas o fisiológicas del polipéptido de referencia. Un homólogo funcional y la referencia.

El polipéptido puede ser un polipéptido natural y la similitud de secuencia puede deberse a eventos evolutivos convergentes o divergentes. Como tal, los homólogos funcionales a veces se designan en la literatura como homólogos, ortólogos o parálogos. Las variantes de un homólogo funcional natural, como los polipéptidos codificados por mutantes de una secuencia codificante de tipo salvaje, pueden ser homólogos funcionales.

Los homólogos funcionales también se pueden crear mediante mutagénesis dirigida al sitio de la secuencia codificante de un polipéptido, o mediante la combinación de dominios de las secuencias codificantes de diferentes polipéptidos que se producen de forma natural ("intercambio de dominios"). Las técnicas para modificar genes que codifican homólogos funcionales descritos en la presente son conocidas e incluyen, entre otras, técnicas de evolución dirigida, técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y técnicas de mutagénesis aleatoria, y pueden ser útiles para aumentar la actividad específica de un polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, alterar los niveles de expresión, alterar la ubicación subcelular o modificar las interacciones polipéptido:polipéptido de la manera deseada. Tales polipéptidos modificados se consideran homólogos funcionales. El término "homólogo funcional" se aplica a veces al ácido nucleico que codifica un polipéptido funcionalmente homólogo.

Los homólogos funcionales pueden identificarse mediante análisis de alineamientos de secuencias de nucleótidos y polipéptidos. Por ejemplo, realizar una consulta en una base de datos de secuencias de nucleótidos o polipéptidos puede identificar homólogos de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos derivados de SHC y similares.

La hibridación también puede usarse para identificar homólogos funcionales y/o como una medida de homología entre

dos secuencias de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas descritas en la presente, o una parte de la misma, puede usarse como sonda de hibridación de acuerdo con las técnicas de hibridación estándares. La hibridación de una sonda con ADN o ARN de una fuente de prueba (por ejemplo, una célula de mamífero) es una indicación de la presencia del ADN o ARN relevante en la fuente de prueba. Las condiciones de hibridación son conocidas por los experimentados en la técnica y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Las condiciones de hibridación moderadas se definen como equivalentes a la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio 2x (SSC) a 30°C seguido de un lavado en 1x SSC, SDS al 0.1% a 50°C. Las condiciones muy estrictas se definen como equivalentes a la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio 6x (SSC) a 45°C seguido de un lavado en 0.2x SSC, SDS al 0.1% a 65°C. El análisis de secuencias para identificar homólogos funcionales también puede implicar el análisis BLAST, BLAST recíproco o PSI-BLAST de bases de datos no redundantes usando una secuencia de aminoácidos relevante como la secuencia de referencia. La secuencia de aminoácidos se deduce, en algunos casos, de la secuencia de nucleótidos. Los polipéptidos de la base de datos que tienen una identidad de secuencia superior a 40% son candidatos para una evaluación adicional de su disponibilidad

para su uso en la reacción de bioconversión SHC/HAC. La similitud de la secuencia de aminoácidos permite sustituciones conservadoras de aminoácidos, tal como la sustitución de un residuo hidrofóbico por otro o la sustitución de un residuo polar por otro. Si se desea, se puede realizar una inspección manual de tales candidatos para reducir el número de candidatos que se van a evaluar más a fondo. La inspección manual se puede realizar seleccionando aquellos candidatos que parecen tener, por ejemplo, dominios funcionales conservados.

Típicamente, los polipéptidos que exhiben por lo menos aproximadamente 30% de identidad de secuencia de aminoácidos son útiles para identificar regiones conservadas. Las regiones conservadas de polipéptidos relacionados exhiben por lo menos 30%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, identidad de secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, una región conservada exhibe por lo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos. La identidad de la secuencia se puede

determinar como se establece arriba y a continuación.

Las enzimas SHC/HAC o las variantes de enzimas descritas en la presente y usadas en los métodos descritos en la presente, por ejemplo, basarse en una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 10, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29, SEC ID NO.: 30, o una variante, homólogo, mutante, derivado o fragmento del mismo. La enzima SHC/HAC o variante de enzima puede, por ejemplo, tener una secuencia de aminoácidos con por lo menos 30%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 10, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14 o la SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Además, la SHC de referencia producida puede basarse en una secuencia de aminoácidos producida a partir de *E. coli*.

El "porcentaje (%) de identidad" con respecto a la

secuencia de nucleótidos de un gen se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia de ADN candidata que es idéntica con los nucleótidos en la secuencia de ADN, después de alinear la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando elementos de programación ("software") disponibles públicamente. Los experimentados en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente y significan cualquier cadena de aminoácidos unida a péptido, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona

Como se usa en la presente, el término "derivado" incluye, pero no se limita a una variante. Los términos "derivado" y "variante" se usan indistintamente en la presente.

En modalidades preferidas, una enzima variante utilizable en la presente descripción muestra un número total de hasta 200 (hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35,

40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200) cambios (alteraciones) en la secuencia de aminoácidos (es decir, intercambios, inserciones, eliminaciones, truncamientos N-terminales y/o truncamientos C-terminales). Los intercambios de aminoácidos pueden ser conservadores y/o no conservadores. En modalidades preferidas, una variante utilizable en la presente descripción difiere de la proteína o el dominio del que se deriva en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 intercambios de aminoácidos, de preferencia cambios de aminoácidos conservadores. Las variantes pueden adicional o alternativamente comprender eliminaciones de aminoácidos, que pueden ser truncamientos N-terminales, truncamientos C-terminales o eliminaciones internas o cualquier combinación de estos. Estas variantes que comprenden truncamientos N-terminales, truncamientos C-terminales y/o eliminaciones internas se denominan "variantes de eliminación" o "fragmentos" en el contexto de la presente solicitud. Los términos "variante de eliminación" y "fragmento" se usan indistintamente en la presente. Una variante de eliminación se puede presentar de forma natural (por ejemplo, variantes de corte y empalme) o puede construirse artificialmente, de preferencia por medios tecnológicos genéticos. Normalmente, la proteína o el dominio proteico del que se deriva la variante de eliminación es una

proteína de tipo salvaje. Sin embargo, las variantes de eliminación de la presente descripción también pueden derivar de homólogos, ortólogos o parálogos del polipéptido original o de variantes construidas artificialmente, siempre que las variantes de eliminación exhiban por lo menos una actividad biológica del polipéptido original. De preferencia, una variante de eliminación (o fragmento) tiene una eliminación de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 aminoácidos en su extremo N-terminal y/o en su extremo C-terminal y/o internamente en comparación con el polipéptido original.

En determinadas modalidades, las variantes de la enzima SHC/HAC descritas en la presente solo incluyen sustituciones y no incluyen eliminaciones ni inserciones.

Una "variante", como se usa en la presente, puede caracterizarse alternativa o adicionalmente por un cierto grado de identidad de secuencia con el polipéptido original del que se deriva. Una variante del WT/referencia SHC/HAC o el Derivado de SHC/HAC de la presente descripción puede tener una identidad de secuencia de por lo menos 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos

88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con el respectivo polipéptido de referencia o al polinucleótido de referencia respectivo.

La expresión "por lo menos 30%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84% , por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia" se usa en toda la descripciones con respecto a las comparaciones de secuencias de polipéptidos y polinucleótidos. Un polinucleótido que pertenece a una familia de cualquiera de las enzimas descritas en la presente o una proteína puede identificarse en función de su similitud con el gen o la proteína relevante, respectivamente. Por ejemplo, la identificación puede basarse en la identidad de secuencia. En algunas modalidades preferidas, la descripción caracteriza moléculas de ácido nucleico aisladas que son por lo menos 30%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,

52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,
 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,
 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%,
 por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo
 5 menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos
 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por
 lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos
 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99%
 idéntica a (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el
 10 polipéptido de una enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo,
 SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13,
 SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.:
 28, SEC ID NO.: 29, o SEC ID NO.: 30) descrito en la presente,
 (b) la secuencia de nucleótidos SEC ID NO.: 15 y (c) una
 15 molécula de ácido nucleico que incluye un segmento de por lo
 menos 30 (por ejemplo, por lo menos 30, 40, 50, 60, 80, 100,
 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 850,
 900, 950, 1000 o 1010) nucleótidos de la SEC ID NO.: 15.

De preferencia, el polipéptido en cuestión y el
 20 polipéptido de referencia exhiben la identidad de secuencia
 indicada en un tramo continuo de 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70,
 80, 90, 100 o más aminoácidos. De preferencia, el
 polinucleótido en cuestión y el polinucleótido de referencia
 exhiben la identidad de secuencia indicada en un tramo continuo
 25 de 60, 90, 120, 135, 150, 180, 210, 240, 270, 300 o más

nucleótidos. En caso de que se comparen dos secuencias y no se especifique la secuencia de referencia en comparación con la cual se calculará el porcentaje de identidad de secuencia, la identidad de secuencia se calculará con referencia a la más
5 larga de las dos secuencias que se compararán, si no específicamente indicado de otra manera. Si se indica la secuencia de referencia, la identidad de la secuencia se determina sobre la base de la longitud total de la secuencia de referencia (por ejemplo, SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 10, SEC
10 ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30) si no se indica específicamente lo contrario.

Por ejemplo, una secuencia peptídica que consiste de 130
15 aminoácidos en comparación con los aminoácidos de longitud completa de AacSHC de tipo salvaje con 631 residuos de aminoácidos puede presentar un porcentaje máximo de identidad de secuencia de 20.6% ($130/631 \times 100$), mientras que una secuencia con una longitud de 300 aminoácidos puede presentar
20 un porcentaje máximo de identidad de secuencia de 47.5% ($300/631 \times 100$).

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia, se puede determinar mediante alineaciones de secuencias. Estos
25 alineamientos pueden llevarse a cabo con varios algoritmos

conocidos en la técnica, de preferencia con el algoritmo matemático de Karlin and Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmalign (paquete HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, por ejemplo, en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> o el programa GAP (algoritmo matemático de la Universidad de Iowa) o el algoritmo matemático de Myers y Miller (1989 - Cabios 4: 11-17) o Clone Manager 9. Los parámetros preferidos que se usan son los parámetros predeterminados tal como se establecen en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El grado de identidad de secuencia (coincidencia de secuencias) puede calcularse usando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Se incorpora un algoritmo similar en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se realizan con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de polinucleótidos que sean homólogas a los ácidos nucleicos que codifican la proteína relevante.

Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido SHC. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos,

se usa Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Al usar los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los respectivos programas. El análisis de coincidencia de
5 secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-162) o campos aleatorios de Markov. Cuando se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia en la presente solicitud, estos porcentajes se
10 calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, si no se indica específicamente lo contrario.

En modalidades particulares, el % de identidad entre dos secuencias se determina usando CLUSTAL O (versión 1.2.4).

Las enzimas SHC/HAC específicas y las variantes de enzimas
15 que se pueden usar en los métodos descritos en la presente se describen con más detalle a continuación.

VARIANTES DE Aac 215G2 SHC/HAC CON NUEVAS MUTACIONES

Sorprendentemente, se ha encontrado que las variantes de la enzima SHC/HAC derivan de una variante de la enzima Aac
20 SHC/HAC descrita en WO 2016/170099 (la variante de la enzima 215G2 SHC/HAC) proporciona una actividad enzimática mejorada para la conversión de EEH en (-)-Ambrox. Sorprendentemente, además, se ha encontrado que las variantes de la enzima SHC/HAC derivadas de 215G2 proporcionan una actividad enzimática
25 mejorada para la conversión de E,E-bishomofarnesol en óxido de

Ambra.

Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC tienen dos o tres alteraciones de aminoácidos además de las sustituciones de aminoácidos ya presentes en la variante de la enzima 215G2 SHC/HAC.

Por lo tanto, se proporciona en la presente un proceso para producir (-)-Ambrox mediante la conversión enzimática de EEH en (-)-Ambrox. También se proporciona en la presente un proceso para fabricar óxido de Ambra mediante la conversión enzimática de E,E-bishomofarnesol en óxido de Ambra. Estos procesos pueden usar cualquier enzima SHC/HAC de tipo salvaje o variante de enzima descrita en la presente, en particular las variantes de SHC/HAC Aac 215G2 descritas en la presente.

La variante de la enzima SHC/HAC de Aac 215G2 SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener por lo menos 75.0% o por lo menos aproximadamente 80.0% o por lo menos aproximadamente 85.0% o por lo menos aproximadamente 90.0% o por lo menos aproximadamente 95.0% o por lo menos aproximadamente 95.5% o por lo menos aproximadamente 96.0% o por lo menos aproximadamente 96.5% o por lo menos aproximadamente 97.0% o por lo menos aproximadamente 97.5% o por lo menos aproximadamente 98.0% o por lo menos aproximadamente 98.5% o por lo menos aproximadamente 99.0% de identidad con la SEC ID

NO.: 1.

La variante enzimática de Aac 215G2 SHC/HAC tiene menos de 100% de identidad con la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, la variante enzimática SHC/HAC puede tener 99.5% o menos o 99.0% o menos de identidad a la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante enzimática de Aac 215G2 SHC/HAC puede tener de aproximadamente 70.0% a aproximadamente 99.5% o de aproximadamente 80.0% a aproximadamente 99.0% o de aproximadamente 85.0% a aproximadamente 98.5% o de aproximadamente 90.0% a aproximadamente 98.0% de identidad a la SEC ID NO.: 1.

El "porcentaje (%) de identidad" con respecto a una secuencia polipeptídica o de nucleótidos se define respectivamente como el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia, después de alinear la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando elementos de programación ("software") de computadora disponibles públicamente. Los experimentados en la técnica pueden determinar los parámetros

apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente y
5 significan cualquier cadena de aminoácidos unida a péptido, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia,
10 se puede determinar mediante alineaciones de secuencias. Tales alineamientos pueden llevarse a cabo con varios algoritmos conocidos en la técnica, de preferencia con el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmalign (paquete
15 HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, por ejemplo, en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> o el programa GAP (algoritmo matemático de la Universidad de Iowa) o el algoritmo
20 matemático de Myers y Miller (1989 - Cabios 4: 11-17). Los parámetros preferidos que se usan son los parámetros predeterminados, ya que están configurados en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse
25 usando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Se

incorpora un algoritmo similar en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de polinucleótidos que sean homólogas a los ácidos nucleicos que codifican la proteína relevante. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido.

Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Al usar los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los respectivos programas. El análisis de coincidencia de secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-162) o campos aleatorios de Markov. Cuando en la presente solicitud se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, si no se indica específicamente lo contrario.

En modalidades particulares, el % de identidad entre dos secuencias se determina usando CLUSTAL O (versión 1.2.4).

En determinadas modalidades, la variante de la enzima

SHC/HAC puede tener alteraciones iguales o menores a 30 aminoácidos en comparación con la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones iguales o inferiores a 25 o iguales hasta o menos de 20 o igual o menos de 15 o igual o menos de 10 o igual o menos de 9 o igual o menos de 8 o igual o menos de 7 o igual o menos de aproximadamente 6 alteraciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener por lo menos aproximadamente 5 o por lo menos aproximadamente 6 alteraciones de aminoácidos en comparación con la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, inserciones, eliminaciones y/o sustituciones como se ha descrito anteriormente.

En algunas modalidades, las únicas alteraciones de aminoácidos en la variante de la enzima SHC/HAC en comparación con la SEC ID NO.: 1 son sustituciones (es decir, no hay inserciones ni eliminaciones).

Las alteraciones de aminoácidos se definen en relación con una secuencia de referencia. Una alteración de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia significa que la secuencia de aminoácidos de la secuencia variante es diferente a la secuencia de referencia.

A los aminoácidos en la secuencia de referencia y en la secuencia variante se les puede asignar un número, en donde la

numeración comienza con el aminoácido en el extremo N-terminal del polipéptido (es decir, el aminoácido en el extremo N-terminal del polipéptido se numera 1, el siguiente aminoácido tiene el número 2, etc.). La "posición" de una secuencia de referencia se refiere a un residuo de aminoácido específico presente en la secuencia de referencia identificada por la numeración específica de los aminoácidos en la secuencia de referencia. La "posición" de una secuencia variante se refiere a un residuo de aminoácido específico presente en la secuencia variante como se identifica por la numeración específica de los aminoácidos en la secuencia variante.

Dado que la secuencia variante puede incluir eliminaciones o inserciones en comparación con la secuencia de referencia, los aminoácidos de la secuencia variante pueden numerarse de forma diferente a los mismos aminoácidos de la secuencia de referencia. A modo de ejemplo, si se inserta un aminoácido entre los aminoácidos 131 y 132 de la SEC ID NO.: 1, el aminoácido que sigue a la inserción tendrá la numeración 133 en la secuencia variante mientras conserva la numeración 132 en la secuencia de referencia. En este ejemplo, la posición de la secuencia variante que corresponde a la posición 132 de la secuencia de referencia es la posición 133. Por lo tanto, los aminoácidos de la secuencia variante que se han retenido de la secuencia de referencia pueden definirse haciendo referencia a la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia.

En otras palabras, una "posición" en la secuencia variante puede definirse por referencia a una "posición correspondiente" en la secuencia de referencia. En particular, las sustituciones en la secuencia variante en comparación con la secuencia de referencia pueden definirse haciendo referencia a la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia a pesar de cualquier inserción y/o eliminación en la secuencia de referencia. Cuando se han eliminado los aminoácidos de una secuencia de referencia, no existe una "posición correspondiente" en la secuencia variante. Donde no hay inserciones o eliminaciones en comparación con la secuencia de referencia (es decir, solo hay sustituciones), la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia será la misma que la posición en la secuencia variante.

Las alteraciones de aminoácidos originales en la variante de enzima 215G2 SHC/HAC (en comparación con Aac SHC de tipo salvaje) se conservan en la nueva variante de enzima Aac 215G2 SHC/HAC descrita en la presente. Las alteraciones de aminoácidos originales en la variante de la enzima 215G2 SHC/HAC en comparación con Aac SHC de tipo salvaje fueron las sustituciones M132R, A224V e I432T (es decir, una sustitución del residuo M en la posición 132 por un residuo R, una sustitución del residuo A en la posición 224 por un residuo V, y una sustitución del residuo I en la posición 432 por un residuo T).

Por lo tanto, las nuevas variantes de la enzima Aac 215G2 SHC/HAC tienen alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1 que son M132R, A224V e I432T respectivamente. El número "132" en "M132R", "224" en "A224V" y "432" en "I432T" se refiere a la numeración de la SEC ID NO.: 1 y, como se mencionó anteriormente, no corresponde necesariamente a la numeración de la secuencia variante debido a inserciones y/o eliminaciones adicionales opcionales.

La nueva secuencia de aminoácidos variante de la enzima Aac 215G2 SHC/HAC también tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos con respecto a la SEC ID NO.: 1 en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos con respecto a la SEC ID NO.: 1 en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y dos posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y todas las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en las posiciones correspondientes a las posiciones 431 y 557 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. En algunas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC tiene la secuencia de la SEC ID NO.: 2.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1

en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. En algunas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC tiene la secuencia de la SEC ID NO.: 3.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en las posiciones correspondientes a las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden, por ejemplo, ser sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. En algunas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC tiene la secuencia de la SEC ID NO.: 4.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos en relación con la SEC ID NO.: 1 en las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431 y 557 de la SEC ID NO.: 1. Estas alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. En algunas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC tiene la secuencia de la SEC ID NO.: 5.

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, A557X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido A en la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 por

cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 557.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, A) por un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn o Gln). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, A) por treonina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 es A557T).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Y81X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido Y en la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración

del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 81.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, Y) por un aminoácido básico (es decir, His, Lys o Arg). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, Y) por histidina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 es Y81H).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, H431X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido H en la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se señaló anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 431.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a

la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, H) por un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, H) por leucina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 es H431L).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, R613X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido R en la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 613.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 631 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración

del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, R) por un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn o Gln). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, R) por serina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 es R613S).

En algunas modalidades, la nueva variante Aac 215G2 SHC es idéntica a la SEC ID NO.: 1 excepto por las siguientes sustituciones de aminoácidos:

(i) M132R, A224V, I432T, A557T y H431L (SEC ID NO.: 2); o

(ii) M132R, A224V, I432T, A557T y R613S (SEC ID NO.: 3);

o

(iii) M132R, A224V, I432T, A557T, Y81H y R613S (SEC ID NO.: 4); o

(iv) M132R, A224V, I432T, A557T, Y81H y H431L (SEC ID NO.: 5).

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en las posiciones correspondientes a las posiciones 90, 172 y/o 277 de la SEC ID NO.: 1. La alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 puede, por ejemplo, ser T90X. Esto se refiere a una sustitución

del aminoácido T en la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender además inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 90.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, T) por un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu, Ile). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, T) por alanina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 es T90A).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, A172X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido T en la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC

pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 172.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 172 de SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, A) por un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, A) por treonina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 es A172T).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, M277X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido M en la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se señaló anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 277.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, M) por un aminoácido básico (es decir, His, Lys, Arg). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, M) por lisina, es decir la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 es M277K).

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en las posiciones correspondientes a las posiciones 37, 174 y/o 601 de la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) en las posiciones correspondientes a las posiciones 37, 174 y/o 601 de la SEC ID NO.: 1.

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, L37X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido L en la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier

aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 37.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, L) por un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn o Gln). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, L) por glutamina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 de SEC ID NO.: 1 es L37Q).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, V174X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido V en la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o

eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 174.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Leu o Ile). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, V) por isoleucina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 es V174I).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, F601X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido F en la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 601.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo,

Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, un ácido aromático (es decir, Trp, Tyr, Phe). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, F) por tirosina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 es F601Y).

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en las posiciones correspondientes a las posiciones 77, 92, 129, 579, 601 y/o 605 de la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) en las posiciones correspondientes a las posiciones 77, 92, 129, 579, 601 y/o 605 de la SEC ID NO.: 1.

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, T77X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido T en la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración

del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 77.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, T) por un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de SEC ID NO.: 1 (es decir, T) por alanina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 es T77A).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, I92X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido I en la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 92.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a

la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, I) por un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, I) por valina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 es I92V).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, F129X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido F en la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 129.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. Por ejemplo, la alteración

del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, F) por un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, F) por leucina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de SEC ID NO.: 1 es F129L).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Q579X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido Q en la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 579.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, Q) por un aminoácido básico (es decir,

His, Lys o Arg). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, Q) por histidina (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 es Q579H).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, F601X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido F en la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 601.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede, por ejemplo, ser un ácido aromático (es decir, Trp, Tyr, Phe). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, F) por histidina (es decir, la alteración del aminoácido

en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 es F601Y).

La alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, F605X. Esto se refiere a una sustitución del aminoácido F en la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 por cualquier aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que las variantes de la enzima SHC/HAC pueden comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede no ser 605.

El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. El nuevo aminoácido (X) en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, un ácido aromático (es decir, Trp, Tyr, Phe). Por ejemplo, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 puede sustituir el aminoácido de la SEC ID NO.: 1 (es decir, F) por triptófano (es decir, la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 es F605W).

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en

las posiciones correspondientes a las posiciones 132 y 432 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una alteración de aminoácido (por ejemplo, sustitución) en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en las posiciones correspondientes a las posiciones 77, 92 y 129 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en las posiciones correspondientes a las posiciones 579 y 601 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en las posiciones correspondientes a las posiciones 129, 132 y 432 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 432 y 601 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en las posiciones correspondientes a las posiciones 129, 132, 432

y 601 de la SEC ID NO.: 1.

Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC pueden, por ejemplo, tener una mayor actividad enzimática para la conversión de EEH en (-)-Ambrox o la conversión de BisEEH en
5 óxido de Ambra en comparación con la enzima SHC/HAC de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante enzimática SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. El aumento de la actividad enzimática puede referirse a cualquier aspecto de la conversión enzimática de EEH en (-)-Ambrox o la conversión enzimática de BisEEH en óxido de Ambra,
10 incluido, por ejemplo, el aumento de la conversión total de EEH o BisEEH, aumento de la tasa de conversión de EEH o BisEEH (por ejemplo, en las primeras 6 horas o en las primeras 12 horas de reacción), aumento de la producción de (-)-Ambrox u óxido de Ambra y disminución de la producción de subproductos.
15 El aumento de la actividad enzimática puede definirse por el aumento de la productividad en general, que puede definirse en términos de (-)-Ambrox u óxido de Ambra producido por gramo de biocatalizador, por hora y por litro de reacción.

Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC pueden, por
20 ejemplo, proporcionar una mayor conversión de EEH o E,E-bishomofarnesol (BisEEH) en comparación con la enzima de tipo salvaje SHC/HAC de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante de enzima Aac 215G2 SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. Por lo tanto, el proceso descrito en la presente puede tener un mayor nivel de
25 conversión de EEH o BisEEH en comparación con el proceso que

usa la enzima de tipo salvaje SHC/HAC de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante de la enzima SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. Las nuevas variantes de enzima SHC/HAC pueden, por ejemplo, proporcionar una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante de la enzima SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. Por lo tanto, el proceso descrito en la presente puede tener una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH en comparación con la enzima de tipo salvaje SHC/HAC de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante de la enzima SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. Las nuevas variantes de enzima SHC/HAC pueden, por ejemplo, proporcionar una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH durante las primeras 4 horas o durante las primeras 6 horas o durante las primeras 8 horas o durante las primeras 12 horas o durante las primeras 24 horas de la reacción en comparación con la enzima de tipo salvaje SHC/HAC de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante de la enzima SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. Por lo tanto, el proceso descrito en la presente puede tener una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH durante las primeras 4 horas o durante las primeras 6 horas o durante las primeras 8 horas o durante las primeras 12 horas o durante el primeras 24 horas de la reacción en comparación con la enzima de tipo salvaje SHC/HAC de la SEC ID NO.: 1 y/o la variante de la enzima SHC/HAC de la SEC ID NO.: 10. Esto podría ser cuando se compara usando ambas enzimas (es decir, la nueva variante de la enzima Aac

215G2 SHC/HAC y la enzima de tipo salvaje de la SEC ID NO.: 1
o la enzima 215G2 de la SEC ID NO.: 10) en las mismas
condiciones de reacción (por ejemplo, mismo pH y temperatura)
o en comparación con el uso de cada enzima en sus respectivas
5 condiciones de reacción optimizadas (por ejemplo, pH y
temperatura optimizados) que pueden ser diferentes entre sí.

Por ejemplo, la nueva variante de la enzima SHC/HAC puede
proporcionar o el proceso puede tener por lo menos
aproximadamente 40% de conversión de EEH o BisEEH en las
10 primeras 12 horas de la reacción. Por ejemplo, la nueva
variante de enzima SHC/HAC puede proporcionar o el proceso
puede tener por lo menos 45% o por lo menos 50% o por lo menos
55% o por lo menos 60% de conversión de EEH o BisEEH en las
primeras 12 horas de la reacción. Por ejemplo, la nueva
15 variante de enzima SHC/HAC puede proporcionar o el proceso
puede tener por lo menos aproximadamente 30% de conversión de
EEH o BisEEH en las primeras 6 horas de la reacción. Por
ejemplo, la nueva variante de enzima SHC/HAC puede proporcionar
o el proceso puede tener por lo menos 35% o por lo menos 45% o
20 por lo menos 50% o por lo menos 55% de conversión de EEH o
BisEEH en las primeras 12 horas de la reacción. Esto puede ser
en comparación con el uso de ambas enzimas (es decir, la nueva
variante de la enzima SHC/HAC y la enzima de la SEC ID NO.: 1
o la SEC ID NO.: 10) en las mismas condiciones de reacción (por
25 ejemplo, el mismo pH y temperatura) o cuando se compara con

usando cada enzima en sus respectivas condiciones de reacción optimizadas (por ejemplo, pH y temperatura optimizados) que pueden ser diferentes entre sí.

La conversión de EEH en (-)-Ambrox o la conversión de
5 BisEEH en óxido de Ambra puede, por ejemplo, determinarse usando una prueba de actividad como se describió anteriormente y puede calcularse como gramo de producto recuperable por gramo de materia prima (que puede calcularse como tasa de conversión molar porcentual).

10 Como se usa en la presente, cualquier referencia en la presente a una tasa de conversión de 99%/100% para un sustrato de homofarnesol en (-)-Ambrox es una referencia a una conversión de 99%/100% del isómero de homofarnesol (es decir, EEH) capaz de convertirse en (-)-Ambrox usando una enzima
15 SHC/HAC o una variante de enzima.

Como se usa en la presente, cualquier referencia en la presente a una tasa de conversión de 99%/100% para un sustrato de bishomofarnesol en óxido de Ambra es una referencia a una conversión de 99%/100% del isómero de bishomofarnesol (es
20 decir, BisEEH) capaz de convertirse en óxido de Ambra usando una enzima SHC/HAC o variante de enzima.

La temperatura óptima para las variantes enzimáticas SHC/HAC de Aac 215G2 SHC/HAC puede, por ejemplo, ser igual o superior a aproximadamente 35°C. Por ejemplo, la temperatura
25 óptima para las variantes enzimáticas SHC/HAC de Aac 215G2

SHC/HAC puede variar desde aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 50°C, por ejemplo, de aproximadamente 42°C hasta aproximadamente 48°C o de aproximadamente 44°C a aproximadamente 46°C. Por ejemplo, la temperatura óptima de las variantes enzimáticas SHC/HAC de Aac 215G2 SHC/HAC puede ser de aproximadamente 45°C. Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo a la temperatura óptima de la variante de la enzima SHC/HAC.

El pH óptimo para las variantes enzimáticas SHC/HAC de Aac 215G2 SHC/HAC puede, por ejemplo, ser igual o superior a aproximadamente 5.4. Por ejemplo, el pH óptimo para las variantes enzimáticas SHC/HAC de Aac 215G2 SHC/HAC puede oscilar entre 5.2 y 6.0, por ejemplo entre 5.4 y 5.8, por ejemplo entre 5.6 y 5.8. Por ejemplo, el pH óptimo de las variantes de la enzima SHC/HAC de Aac 215G2 SHC/HAC puede ser de aproximadamente 5.6 o aproximadamente 5.8. Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo al pH óptimo de la variante de enzima SHC/HAC.

La concentración óptima de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el medio de reacción del proceso para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descrito en la presente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0.010% p/p a aproximadamente 0.10% p/p. Por ejemplo, la concentración óptima de SDS puede ser de

aproximadamente 0.040% p/p a aproximadamente 0.080% p/p, por ejemplo, aproximadamente 0.050% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 4 g/L con células a una OD_{650nm} de 10. La concentración óptima de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el medio de reacción de los procesos para fabricar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 1.0% p/p a aproximadamente 1.5% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 250 g/L de células. Por ejemplo, la concentración óptima de SDS puede ser de aproximadamente 1.2% p/p a aproximadamente 1.4% p/p, por ejemplo, aproximadamente 1.3% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 250 g/L de células.

Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo en el intervalo de temperatura óptimo o la temperatura óptima y/o el intervalo de pH óptimo o el pH óptimo y/o el intervalo de concentración óptimo de SDS o la concentración óptima de SDS para la enzima específica usada, como se establece en la Tabla 7 o 9 u 11 en los Ejemplos a continuación.

OTRAS VARIANTES CON NUEVAS MUTACIONES EN LAS POSICIONES CORRESPONDIENTES A LAS POSICIONES 81, 90, 172, 277, 431, 557 Y/O 613 DE LA SEC ID NO.: 1

Como se describió anteriormente, se ha encontrado sorprendentemente que las variantes de la enzima SHC/HAC

derivadas de una variante de la enzima Aac SHC/HAC descrita en WO 2016/170099 (la variante de la enzima 215G2 SHC/HAC) proporcionan una actividad enzimática mejorada para la conversión de EEH en (-)-Ambrox y para la conversión de BisEEH a óxido de Ambra. Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC tienen dos o tres alteraciones de aminoácidos además de las sustituciones de aminoácidos ya presentes en la variante de la enzima 215G2 SHC/HAC.

Se espera que otras variantes de la enzima SHC/HAC que tengan una o más de las nuevas mutaciones identificadas en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1 también proporcionen actividad enzimática (por ejemplo, actividad enzimática mejorada) para la conversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra.

En particular, se espera que las variantes de la enzima SHC/HAC deriven de otras especies distintas de Aac, pero que tengan una o más de las nuevas alteraciones de aminoácidos identificadas en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1 también proporcionará una actividad enzimática para la conversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra. En particular, se espera que las variantes enzimáticas derivadas de ZmoSHC1, ZmoSHC2, BjpSHC, GmoSHC, TelSHC, ApaSHC1, BmeSHC, SalSHC o ApaSHCA tengan una o más de las nuevas alteraciones de aminoácidos identificadas en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.:

1 también proporcionará una actividad enzimática para la
conversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra.

Por lo tanto, se proporciona en la presente un proceso
para producir (-)-Ambrox mediante la conversión enzimática de
5 EEH en (-)-Ambrox. También se proporciona en la presente un
proceso para elaborar óxido de Ambra mediante la conversión
enzimática de E,E-bishomofarnesol en óxido de Ambra. Estos
procesos pueden usar cualquier enzima SHC/HAC de tipo salvaje
o variante de enzima descrita en la presente.

10 Además, en la presente se proporciona una variante de la
enzima SHC/HAC que tiene por lo menos aproximadamente 70% de
identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC
de tipo salvaje, en la que la secuencia de aminoácidos de la
variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de
15 aminoácidos relativas a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en
una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a
las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID
NO.: 1.

En particular, se proporciona en la presente un proceso
20 para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox,
el proceso comprende convertir enzimáticamente EEH o una mezcla
que comprende EEH en (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-
) -Ambrox usando una variante de SHC/HAC que tiene por lo menos
aproximadamente 70.0% de identidad con una secuencia de
25 aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, en donde la

secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC
tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la
enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de
las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172,
5 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

En particular, se proporciona en la presente un proceso
para preparar óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido
de Ambra, el proceso comprende convertir enzimáticamente BisEEH
o una mezcla que comprende BisEEH en óxido de Ambra o una
10 mezcla que comprende óxido de Ambra usando una variante SHC/HAC
que tiene por lo menos aproximadamente 70.0% de identidad con
una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo
salvaje, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante
de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de
15 aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje
en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes
a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID
NO.: 1.

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener
20 una secuencia de aminoácidos que tenga por lo menos
aproximadamente 70.0% de identidad con una secuencia de
aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje. Por ejemplo,
la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de
aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 75.0% o por
25 lo menos aproximadamente 80.0% o por lo menos aproximadamente

85.0% o por lo menos aproximadamente 90.0% o por lo menos
aproximadamente 95.0% o por lo menos aproximadamente 95.5% o
por lo menos aproximadamente 96.5% o por lo menos
aproximadamente 97.0% o por lo menos aproximadamente 97.5% o
5 por lo menos aproximadamente 98.0% o por lo menos
aproximadamente 98.5% o por lo menos aproximadamente 99.0% de
identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC
de tipo salvaje.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede, por
10 ejemplo, tener una secuencia de aminoácidos que tenga menos de
100% de identidad, por ejemplo, igual o menos de 99.5% o igual
o menos de 99.0% de identidad con una secuencia de aminoácido
de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener
15 de aproximadamente 70.0% a aproximadamente 99.5% o de
aproximadamente 80.0% a aproximadamente 99.0% o de
aproximadamente 85.0% a aproximadamente 98.5% o de
aproximadamente 90.0% a aproximadamente 98.0% de identidad con
una secuencia de aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo
20 salvaje.

La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo
salvaje puede ser, por ejemplo, la de AacSHC (SEC ID NO.: 1),
ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12), BjpSHC (SEC
ID NO.: 13), GmoSHC (SEC ID NO.: 14), TelSHC (SEC ID NO.: 19)
25 o ApaSHC1 (SEC ID NO.: 20), BmeSHC (SEC ID NO.: 28), SalSHC

(SEC ID NO.: 29), o ApaSHCA (SEC ID NO.: 30). En particular, la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser la de AacSHC (SEC ID NO.: 1).

Por lo tanto, en algunas modalidades, la variante de la
5 enzima SHC/HAC puede tener una secuencia de aminoácidos que tenga por lo menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19 o SEC ID NO.: 20. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de
10 aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente de 75.0% o por lo menos aproximadamente 80.0% o por lo menos aproximadamente 85.0% o por lo menos aproximadamente 90.0% o por lo menos aproximadamente 95.0% o por lo menos aproximadamente 95.5% o por lo menos aproximadamente 96.5% o
15 por lo menos aproximadamente 97.0% o por lo menos aproximadamente 97.5% o por lo menos aproximadamente 98.0% o por lo menos aproximadamente 98.5% o por lo menos aproximadamente 99.0% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29
20 o la SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una secuencia de aminoácidos que tenga menos de 100% de identidad, por ejemplo, igual o menos de 99.5% o igual
25 o menos de 99.0% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.:

11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la variante de enzima SHC/HAC puede tener de
 5 aproximadamente 70.0% a aproximadamente 99.5% o de
 aproximadamente 80.0% a aproximadamente 99.0% o de
 aproximadamente 85.0% a aproximadamente 98.5% o de
 aproximadamente 90.0% a aproximadamente 98.0% de identidad con
 la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13,
 10 SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28,
 SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

El "porcentaje (%) de identidad" con respecto a una
 secuencia polipeptídica o de nucleótidos se define
 respectivamente como el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos
 15 en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos
 o nucleótidos en la secuencia de referencia, después de alinear
 la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para
 lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no
 considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la
 20 identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de
 determinar el porcentaje de identidad de secuencia, se puede
 lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en
 la técnica, por ejemplo, usando elementos de programación
 ("software") de computadora disponible públicamente. Los
 25 experimentados en la técnica pueden determinar los parámetros

apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente y
5 significan cualquier cadena de aminoácidos unida a péptido, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia,
10 se puede determinar mediante alineaciones de secuencias. Tales alineamientos pueden llevarse a cabo con varios algoritmos conocidos en la técnica, de preferencia con el algoritmo matemático de Karlin and Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmmalign
15 (paquete HMMER, <http://hmmerr.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, por ejemplo, en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> o el programa GAP (algoritmo matemático de la Universidad de Iowa) o el algoritmo
20 matemático de Myers y Miller (1989 - Cabios 4: 11-17). Los parámetros preferidos que se usan son los parámetros predeterminados, ya que están configurados en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse
25 usando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Se

incorpora un algoritmo similar en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de polinucleótidos que sean homólogas a los ácidos nucleicos que codifican la proteína relevante. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido.

Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Al usar los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los respectivos programas. El análisis de coincidencia de secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas, como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-162) o campos aleatorios de Markov. Cuando se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia en la presente solicitud, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, si no se indica específicamente lo contrario.

En modalidades particulares, el % de identidad entre dos secuencias se determina usando CLUSTAL O (versión 1.2.4).

En determinadas modalidades, la variante de la enzima

SHC/HAC puede tener alteraciones iguales o menores a aproximadamente 200 aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC. NO.: ID: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29, o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una cantidad igual o menor de aproximadamente 150 o igual o menor de aproximadamente 120 o igual o menor de aproximadamente 100 o igual o menor de aproximadamente 95 o igual o menor de aproximadamente 90 o igual o menor de aproximadamente 85 o igual o menor de aproximadamente 80 o igual o menor de aproximadamente 75 o igual o menor de aproximadamente 70 o igual o menor de aproximadamente 65 o igual o menor de aproximadamente 60 o igual o menor de aproximadamente 55 o igual o menor de aproximadamente 50 o igual o menor de aproximadamente 45 o igual o menor de aproximadamente 40 o igual o menor de aproximadamente 35 o igual o menor de aproximadamente 30 o igual o menor de aproximadamente de 25 o igual o menor de aproximadamente 20 o igual o menor de aproximadamente 15 o igual o menor de aproximadamente 10 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo comparada con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30.

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener por lo menos 1 o por lo menos 2 o por lo menos 3 o por lo menos 4 o por lo menos 5 o por lo menos 6 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19 o la SEC ID NO.: 20. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo comparada con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20 o SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC

ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 4 a aproximadamente 15 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, inserciones, eliminaciones y/o sustituciones como se describió anteriormente. Por ejemplo, las alteraciones de aminoácidos pueden ser sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras.

En algunas modalidades, las únicas alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30) son sustituciones (es decir, no hay

inserciones ni eliminaciones).

Las alteraciones de aminoácidos se definen en relación con una secuencia de referencia. Una alteración de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia significa que la
5 secuencia de aminoácidos de la secuencia variante es diferente a la secuencia de referencia.

A los aminoácidos en la secuencia de referencia y en la secuencia variante se les puede asignar un número, en donde la numeración comienza con el aminoácido en el extremo N-terminal
10 del polipéptido (es decir, el aminoácido en el extremo N-terminal del polipéptido se numera 1, el siguiente aminoácido tiene el número 2, etc.). La "posición" de una secuencia de referencia se refiere a un residuo de aminoácido específico presente en la secuencia de referencia identificada por la
15 numeración específica de los aminoácidos en la secuencia de referencia. La "posición" de una secuencia variante se refiere a un residuo de aminoácido específico presente en la secuencia variante como se identifica por la numeración específica de los aminoácidos en la secuencia variante.

20 Dado que la secuencia variante puede incluir eliminaciones o inserciones en comparación con la secuencia de referencia, los aminoácidos de la secuencia variante pueden numerarse de forma diferente a los mismos aminoácidos de la secuencia de referencia. A modo de ejemplo, si se inserta un aminoácido
25 entre los aminoácidos 131 y 132 de la SEC ID NO.: 1, el

aminoácido que sigue a la inserción tendrá la numeración 133 en la secuencia variante mientras conserva la numeración 132 en la secuencia de referencia. En este ejemplo, la posición de la secuencia variante que corresponde a la posición 132 de la secuencia de referencia es la posición 133. Por lo tanto, los aminoácidos en la secuencia variante que se han retenido de la secuencia de referencia pueden definirse haciendo referencia a la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia. En otras palabras, una "posición" en la secuencia variante puede definirse por referencia a una "posición correspondiente" en la secuencia de referencia. En particular, las sustituciones en la secuencia variante en comparación con la secuencia de referencia pueden definirse haciendo referencia a la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia a pesar de cualquier inserción y/o eliminación en la secuencia de referencia. Cuando se han eliminado los aminoácidos de una secuencia de referencia, no existe una "posición correspondiente" en la secuencia variante. Donde no hay inserciones o eliminaciones en comparación con la secuencia de referencia (es decir, solo hay sustituciones), la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia será la misma que la posición en la secuencia variante.

Las enzimas SHC/HAC de tipo salvaje de diferentes especies tienen diferentes longitudes de polipéptido. Las secuencias de tipo salvaje pueden alinearse usando algoritmos como se

describió anteriormente para identificar las "posiciones correspondientes" en dos enzimas SHC/HAC de tipo salvaje diferentes. Por lo tanto, el aminoácido en una posición de la secuencia variante correspondiente a una posición en una secuencia de referencia puede, por ejemplo, ser un residuo de aminoácido diferente y/o puede tener un número diferente al de la secuencia de referencia. A manera de ejemplo, el aminoácido M en la posición 132 de AacSHC (SEC ID NO.: 1) puede corresponder al aminoácido Y en la posición 185 de ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11).

Por lo tanto, la alteración de aminoácidos puede definirse en relación con dos secuencias de referencia diferentes. Por ejemplo, la alteración de aminoácidos puede ser un cambio en comparación con una primera secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de enzima SHC/HAC de tipo salvaje de la que se deriva la variante) y la posición de la alteración de aminoácidos en la secuencia de variante puede definirse por referencia a una segunda secuencia de referencia (por ejemplo, la AacSHC (SEC ID NO.: 1). Por lo tanto, la alteración de aminoácidos en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser relativa a una primera enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición definida por referencia a una segunda enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

La secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con

respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada entre las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Por ejemplo, las alteraciones de aminoácidos pueden estar en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden, por ejemplo, ser sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14,

SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una alteración de aminoácidos en relación con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y dos posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo sustituciones no

conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje
5 puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos de la enzima
10 SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y todas las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, sustituciones no
15 conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje
20 puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las
25 posiciones 90 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de

aminoácidos pueden, por ejemplo, ser sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 172 y 277 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden, por ejemplo, ser sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 431 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden, por ejemplo, ser sustituciones, por ejemplo

sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la
5 secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de
10 tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden, por ejemplo, ser sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la
15 SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante
20 de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por
25 ejemplo, sustituciones no conservadoras. La secuencia de

aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 431 y 557 de la SEC ID NO.: 1. Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la secuencia de tipo salvaje puede ser la SEC ID NO.: 1.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de

tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante podría no ser 557.

5 El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 puede, por ejemplo, ser Met, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo
10 aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn o Gln). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de enzima SHC/HAC puede ser treonina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia
15 de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de
20 tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) puede no ser 81.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos
25 variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente

a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido básico (es decir, His, Lys o Arg). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser histidina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 90.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu, Ile). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima

SHC/HAC puede ser alanina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 172.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de enzima SHC/HAC puede ser treonina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente

(X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 277.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido básico (es decir, His, Lys, Arg). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser lisina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) puede no ser 431.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos

variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser leucina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) puede no ser 613.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn

o Gln). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser serina.

Los aminoácidos y posiciones en las secuencias de tipo salvaje ZmoSHC1, ZmoSHC2, BjpSHC, GmoSHC, TelSHC y ApaSHC1 (SEC ID NO.: 11, 12, 13, 14, 19 y 20 respectivamente) que corresponden a los aminoácidos de AacSHC (SEC ID NO.: 1) (por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones 81, 431, 557 y 613 de AacSHC) se muestran en la Figura 9A. Los aminoácidos y las posiciones en las secuencias de tipo salvaje ZmoSHC1, ZmoSHC2, BjpSHC, GmoSHC, TelSHC, ApaSHC1, BmeSHC, SalSHC y ApaSHCA (SEC ID NO.: 11, 12, 13, 14, 19, 20, 28, 29 y 30 respectivamente) que corresponden a los aminoácidos de AacSHC (SEC ID NO.: 1) (por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones 81, 431, 557 y 613 de AacSHC) se muestran en la Figura 9B.

Las posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje están resaltadas con una letra blanca sobre un fondo negro. Los aminoácidos directamente encima o debajo del aminoácido resaltado son, por lo tanto, los aminoácidos y las posiciones en ZmoSHC2, BjaSHC, GmoSHC, ApaSHC1, ApaSHC1, ZmoSHC1 y TelSHC que corresponden a las posiciones 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 de AacSHC (SEC ID NO.: 1). Por ejemplo, el aminoácido en BjaSHC, GmoSHC, ApaSHC1 y ZmoSHC1 que corresponde al aminoácido Y en la posición 81 de AacSHC (SEC ID NO.: 1) es Y. El aminoácido en ZmoSHC2 y TelSHC que corresponde al aminoácido Y en la

posición 81 de AacSHC (SEC ID NO.: 1) es F. La posición 84 de TelSHC es la posición de TelSHC que corresponde a la posición 81 de AacSHC (SEC ID NO.: 1).

En algunas modalidades, una o más de las alteraciones de aminoácidos originales en la variante de enzima 215G2 SHC/HAC (en comparación con Aac SHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1)) pueden conservarse en las nuevas variantes de enzima SHC/HAC descritas en la presente. Las alteraciones de aminoácidos en la variante de la enzima 215G2 SHC/HAC en comparación con Aac SHC de tipo salvaje fueron las sustituciones M132R, A224V e I432T (es decir, una sustitución del residuo M en la posición 132 por un residuo R, una sustitución del residuo A en posición 224 por un residuo V, y una sustitución del residuo I en la posición 432 por un residuo T).

Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1. las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, sustituciones.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una, dos o tres alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones

seleccionadas para las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 132 y 432 de la SEC ID NO.: 1.

Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 132.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo,

Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido básico (es decir, His, Lys o Arg). Por ejemplo,
5 el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser arginina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1
10 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente
15 inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 224.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo,
20 Met, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima
25 SHC/HAC puede ser valina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 432.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn o Gln). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de enzima SHC/HAC puede ser treonina.

Los aminoácidos y posiciones en las secuencias de tipo salvaje ZmoSHC1, ZmoSHC2, BjpSHC, GmoSHC, TelSHC y ApaSHC1 (SEC ID NO.: 11, 12, 13, 14, 19 y 20 respectivamente) que corresponden a los aminoácidos de AacSHC (SEC ID NO.: 1) (por ejemplo, en las posiciones 132, 224 y 432 de AacSHC) se muestran en la Figura 9.

Las variantes de la enzima SHC/HAC descritas en la presente pueden, por ejemplo, tener además una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en las otras posiciones de AacSHC identificadas en WO 2016/170099.

5 Por lo tanto, las variantes de la enzima SHC/HAC descritas en la presente pueden tener una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 77, 92, 129, 579, 601 y/o 605 de la SEC ID NO.: 1.

10 Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una o más sustituciones de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) en las posiciones correspondientes a las posiciones 77, 92, 129, 579, 601 y/o

15 605 de SEC ID NO.: 1.

La alteración de aminoácidos en una posición relativa a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del

20 aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la

25 numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante

puede no ser 77.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser alanina.

La alteración de aminoácidos en una posición relativa a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 92.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His,

Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser valina.

La alteración de aminoácidos en una posición relativa a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 129.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser leucina.

La alteración de aminoácidos en una posición relativa a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 579.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido básico (es decir, His, Lys, Arg). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser histidina.

La alteración de aminoácidos en una posición relativa a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC

de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en la secuencia variante puede no ser 601.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido aromático (es decir, Trp, Tyr, Phe). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser tirosina.

La alteración de aminoácidos en una posición relativa a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) en

la secuencia variante puede no ser 605.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido aromático (es decir, Trp, Tyr, Phe). Por ejemplo, el nuevo aminoácido en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser triptófano.

Las posiciones de los aminoácidos en TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12), secuencias de BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13) y de GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14) que corresponden a las posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje se resaltan con una letra blanca sobre un fondo negro en AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) en la Figura 9A.

Las posiciones de aminoácidos en TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12), BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13), GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14), Bme SHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 28), SalSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 25

29) y ApaSHCA de tipo salvaje (SEC ID NO.: 30) que corresponden a las posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje se resaltan con una letra blanca sobre un fondo negro en AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) en la Figura 9B.

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una o más alteraciones de aminoácidos adicionales con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 37, 174 y/o 601 de la SEC ID NO.: 1 Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, conservadoras o no conservadoras) en relación con la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 37, 174 y/o 601 de la SEC ID NO.: 1.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) puede no ser 37.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Val, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (es decir, Cys, Ser, Thr, Asn o Gln), por ejemplo glutamina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) puede no ser 174.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Leu, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp, Tyr o Phe. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido hidrofóbico (es decir, Met, Ala, Val, Leu o Ile),

por ejemplo, isoleucina.

La alteración de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución del aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido diferente (X). Como se indicó anteriormente, dado que la secuencia de tipo salvaje puede tener una longitud diferente a la SEC ID NO.: 1 y dado que la variante puede comprender adicionalmente inserciones y/o eliminaciones, la numeración del nuevo aminoácido (X) puede no ser 601.

El nuevo aminoácido (X) en la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 puede ser, por ejemplo, Met, Ala, Leu, Val, Ile, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Gly, Pro, Trp o Tyr. Por ejemplo, el nuevo aminoácido (X) en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser un aminoácido aromático (es decir, Trp, Tyr, Phe), por ejemplo tirosina.

Las posiciones de los aminoácidos en TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12), BjpSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13) y GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14) que corresponden a las posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277,

431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje se resaltan con una letra blanca sobre un fondo negro en AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) en la Figura 9A.

Las posiciones de aminoácidos en TelSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 20), ZmoSHC1 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 de tipo salvaje (SEC ID NO.: 12), BjpsHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 13), GmoSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 14), Bme SHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 28), SalSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 29) y ApaSHCA de tipo salvaje (SEC ID NO.: 30) que corresponden a las posiciones de aminoácidos 81, 90, 132, 224, 172, 277, 431, 432, 557 y 613 en AacSHC de tipo salvaje se resaltan con una letra blanca en un fondo negro en AacSHC de tipo salvaje (SEC ID NO.: 1) en la Figura 9B.

Se prevé cualquier combinación de las alteraciones de aminoácidos descritas en la presente. En particular, se prevén combinaciones de alteraciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a las combinaciones de alteraciones de aminoácidos identificadas en AacSHC en la presente y en WO 2016/17009.

En algunas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC es idéntica a la SEC ID NO.: 1 excepto por las siguientes sustituciones de aminoácidos:

- (i) M132R, A224V, I432T, A557T y H4331L (SEC ID NO.: 2);
- (ii) M132R, A224V, I432T, A557T y R613S (SEC ID NO.: 3); o

(iii) M132R, A224V, I432T, A557T, Y81H y R613S (SEC ID NO.: 4); o

(iv) M132R, A224V, I432T, A557T, Y81H y H431L (SEC ID NO.: 5); o

5 (v) M132R, A224V, I432T, T90A y R613S (SEC ID NO.: 17); o

(vi) M132R, A224V, I432T, A172T y M277K (SEC ID NO.: 18).

Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC pueden, por ejemplo, tener una mayor actividad enzimática para la conversión de EEH en (-)-Ambrox o la conversión de BisEEH en
10 óxido de Ambra en comparación con la enzima 215G2 SHC. El aumento de la actividad enzimática puede referirse a cualquier aspecto de la conversión enzimática de EEH en (-)-Ambrox o la conversión enzimática de BisEEH en óxido de Ambra, incluyendo, por ejemplo, el aumento de la conversión total de EEH o BisEEH,
15 el aumento de la tasa de conversión de EEH o BisEEH (por ejemplo, en las primeras 6 horas o en las primeras 12 horas de reacción), aumento de la producción de (-)-Ambrox u óxido de Ambra y disminución de la producción de subproductos. El aumento de la actividad enzimática puede traducirse en un
20 aumento de la productividad en general, que puede definirse en términos de (-)-Ambrox u óxido de Ambra producido por litro de capacidad de reacción y por hora de tiempo de bioconversión, o (-)-Ambrox u óxido de Ambra producido por litros de capacidad de reacción por hora de tiempo de reacción (es decir, tiempo
25 después de añadir el sustrato) y por gramo de biocatalizador

usado en la reacción.

Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC pueden, por ejemplo, proporcionar una mayor conversión de EEH o BisEEH en comparación con la enzima 215G2 SHC. Por lo tanto, el proceso descrito en la presente puede tener un mayor nivel de conversión de EEH o BisEEH en comparación con el proceso que usa la enzima 215G2 SHC. Las nuevas variantes de la enzima SHC/HAC pueden, por ejemplo, proporcionar una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH en comparación con la enzima 215G2 SHC. Por lo tanto, el proceso descrito en la presente puede tener una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH en comparación con la enzima 215G2 SHC.

Las nuevas variantes de enzimas SHC/HAC pueden, por ejemplo, proporcionar una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH durante las primeras 4 horas o durante las primeras 6 horas o durante las primeras 8 horas o durante las primeras 12 horas o durante las primeras 24 horas de la reacción en comparación con la enzima 215G2 SHC. Por lo tanto, el proceso descrito en la presente puede tener una mayor tasa de conversión de EEH o BisEEH durante las primeras 4 horas o durante las primeras 6 horas o durante las primeras 8 horas o durante las primeras 12 horas o durante las primeras 24 horas de la reacción en comparación con la enzima 215G2 SHC. Esto puede ser en comparación con el uso de ambas enzimas (es decir, la nueva variante de enzima SHC/HAC y la enzima 215G2 SHC) en

las mismas condiciones de reacción (por ejemplo, el mismo pH y temperatura) o en comparación con el uso de cada enzima en sus condiciones de reacción optimizadas (por ejemplo, pH y temperatura optimizados) que pueden ser diferentes entre sí.

5 Por ejemplo, la nueva variante de enzima SHC/HAC puede convertirse o el proceso puede permitir por lo menos aproximadamente 40% de conversión de EEH o BisEEH en las primeras 12 horas de la reacción. Por ejemplo, la nueva variante de enzima SHC/HAC puede convertir o el proceso puede
10 permitir por lo menos 45% o por lo menos 50% o por lo menos 55% o por lo menos 60% de conversión de EEH o BisEEH en las primeras 12 horas de la reacción. Por ejemplo, la nueva variante de enzima SHC/HAC puede convertirse o el proceso puede permitir por lo menos aproximadamente 30% de conversión de EEH
15 o BisEEH en las primeras 6 horas de la reacción. Por ejemplo, la nueva variante de enzima SHC/HAC puede convertir o el proceso puede permitir por lo menos 35% o por lo menos 45% o por lo menos 50% o por lo menos 55% de conversión de EEH o BisEEH en las primeras 12 horas de la reacción. Esto puede ser
20 en comparación con el uso de ambas enzimas (es decir, la nueva variante de enzima SHC/HAC y la enzima 215G2 SHC) en las mismas condiciones de reacción (por ejemplo, el mismo pH y temperatura) o en comparación con el uso de cada enzima en sus condiciones de reacción optimizadas (por ejemplo, pH y
25 temperatura optimizados) que pueden ser diferentes entre sí.

La conversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra puede, por ejemplo, determinarse usando una prueba de actividad como se describió anteriormente y puede calcularse como gramo de producto recuperable por gramo de materia prima (que puede calcularse como un porcentaje tasa de conversión molar).

Como se usa en la presente, cualquier referencia en la presente a una tasa de conversión de 99%/100% para un sustrato de homofarnesol en (-)-Ambrox o sustrato de bishomofarnesol en óxido de Ambra es una referencia a una conversión de 99%/100% del isómero capaz de convertirse en (-)-Ambrox u óxido de Ambra usando una enzima SHC/HAC o una variante de enzima.

La temperatura óptima para la variante de enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, ser igual o mayor a aproximadamente 35°C. Por ejemplo, la temperatura óptima para la variante de enzima SHC/HAC puede oscilar entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C, por ejemplo, entre aproximadamente 42°C y aproximadamente 48°C o entre aproximadamente 44°C y aproximadamente 46°C. Por ejemplo, la temperatura óptima de la variante enzimática SHC/HAC puede ser de aproximadamente 45°C. Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo a la temperatura óptima de la variante de enzima SHC/HAC.

El pH óptimo para la variante enzimática SHC/HAC puede, por ejemplo, ser igual o mayor a aproximadamente 5.4. Por

ejemplo, el pH óptimo para la variante de la enzima SHC/HAC puede ser de aproximadamente 5.2 y 6.0, por ejemplo de aproximadamente 5.4 a aproximadamente 5.8, por ejemplo de aproximadamente 5.6 a aproximadamente 5.8. Por ejemplo, el pH
5 óptimo de la variante de enzima SHC/HAC puede ser de aproximadamente 5.6 a aproximadamente 5.8. Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo al pH óptimo de la variante de enzima SHC/HAC.

10 La concentración óptima de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el medio de reacción de los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0.010% p/p a aproximadamente 0.10% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se
15 usa a 4 g/L con células a una OD_{650nm} de 10. Por ejemplo, la concentración óptima de SDS puede ser de aproximadamente 0.040% p/p a aproximadamente 0.080% p/p, por ejemplo aproximadamente 0.050% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 4 g/L con células a una OD_{650nm} de 10. La concentración
20 óptima de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el medio de reacción de los procesos para hacer (-)-Ambrox o el óxido de Ambra descrito en la presente puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 1.0% p/p a aproximadamente 1.5% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 250
25 g/L de células. La concentración óptima de dodecil sulfato de

sodio (SDS) en el medio de reacción de los procesos para fabricar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0.45% p/p a aproximadamente 0.85% p/p. por ejemplo, aproximadamente 0.65% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 125 g/L de células. Por ejemplo, la concentración óptima de SDS puede ser de aproximadamente 1.2% p/p a aproximadamente 1.4% p/p, por ejemplo, aproximadamente 1.3% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 250 g/L de células.

Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo en el intervalo de temperatura óptimo o la temperatura óptima y/o el intervalo de pH óptimo o el pH óptimo y/o el intervalo de concentración óptimo de SDS o la concentración de SDS óptima para la enzima específica usada, como se establece en la Tabla 7 o 9 u 11 en los Ejemplos a continuación.

Los siguientes párrafos numerados definen aspectos adicionales de la presente descripción.

1. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, el proceso comprende convertir enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH en (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene

una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, y en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC
5 tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

2. Un proceso para preparar óxido de Ambra o una mezcla
10 que comprende óxido de Ambra, el proceso que comprende convertir enzimáticamente E,E-bishomofarnesol (BisEEH) o una mezcla de isómeros de bishomofarnesol que comprende BisEEH en óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra usando un SHC/ variante de la enzima HAC, en donde la variante de la
15 enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, y en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la
20 enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

3. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la enzima SHC/HAC de tipo salvaje es la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.:
25 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.:

19 o SEC. ID. NO.: 20.

4. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente de 90.0% o
5 por lo menos aproximadamente 95.0% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

5. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la enzima
10 SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 90 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

6. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la enzima
15 SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 172 y 277 de la SEC ID NO.: 1.

7. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC
20 de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1.

8. El proceso del párrafo 7, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene
25 alteraciones de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC

de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 431 de la SEC ID NO.: 1.

9. El proceso del párrafo 7, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

10. El proceso del párrafo 8 o 9, en donde la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1.

11. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde una o más, por ejemplo, todas las alteraciones de aminoácidos en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 son sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras.

12. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde:
la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, histidina; y/o la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, lisina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, serina.

13. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la

secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada entre:

- 5 una alteración de un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1;
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 224 de SEC ID NO.: 1; y
- una alteración de aminoácido en una posición
- 10 correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1.

14. El proceso del párrafo 13, en donde:

- la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima
- 15 SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, arginina; y/o

- la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima
- 20 SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

- la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima
- 25 SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro,

por ejemplo, treonina.

15. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada entre:

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1.

16. El proceso del párrafo 15, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición

correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

5 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

10 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo histidina; y/o

15 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo tirosina; y/o

20 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, triptófano.

25 17. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la

secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

- 5 una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- una alteración de aminoácido en una posición
- 10 correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1.

18. El proceso del párrafo 17, en donde:

- la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima
- 15 SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo glutamina; y/o

- la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima
- 20 SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, isoleucina; y/o

- la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima
- 25 SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por

ejemplo tirosina.

19. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 17 o la SEC ID NO.: 18.

20. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde el proceso comprende cultivar células hospederas recombinantes que producen la variante de la enzima SHC/HAC.

21. El proceso del párrafo 20, en donde la célula hospedera recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima SHC/HAC, por ejemplo seleccionada de la SEC ID NO.: 6, SEC ID NO.: 7, SEC ID NO.: 8, SEC ID NO.: 9, SEC ID NO.: 22 y la SEC ID NO.: 23.

22. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde (-)-Ambrox se produce mezclado con por lo menos uno o más de los subproductos (II), (III) o (IV).

23. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para preparar (-)-Ambrox o una mezcla de reacción que comprende (-)-Ambrox, comprendiendo el proceso convertir enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH a (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene

por lo menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19 o la SEC ID NO.: 20, y

5 en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1

10 en donde la mezcla de isómeros que comprende EEH se selecciona 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 24. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para preparar óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra, el proceso que comprende convertir enzimáticamente (E,E)-bishomofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de bishomofarnesol que comprende BisEEH en
20 óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra usando una variante de enzima SHC/HAC, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID
25 NO.: 14, SEC ID NO.: 19 o la SEC ID NO.: 20, y

en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.:
5
1

en donde la mezcla de isómeros que comprende BisEEH se selecciona de uno o más de los siguientes grupos que consisten de [(E,E) y [(Z,E)] y/o [(E,E) y (E,Z)] y/o [(Z,E), (E,E) y
10 (E,Z)] también designados como [EE:EZ], [EE:ZE] y [EE:EZ:ZE] respectivamente.

25. (-)-Ambrox obtenido u obtenible por el proceso de cualquier párrafo anterior, por ejemplo en forma amorfa o cristalina.

15 26. Óxido de Ambra obtenido u obtenible mediante el proceso de cualquier párrafo anterior, por ejemplo, en forma amorfa o cristalina.

27. Uso de (-)-Ambrox del párrafo 25 y/u óxido de Ambra del párrafo 26 como parte de una fragancia o un cosmético o un
20 producto de consumo.

28. Una fragancia o un cosmético o un producto de consumo que comprende (-)-Ambrox del párrafo 25 y/o óxido de Ambra del párrafo 26.

29. Una variante de la enzima SHC/HAC que tiene una
25 secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente

70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición seleccionada de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

30. La variante de la enzima SHC/HAC del párrafo 29, en donde la enzima SHC/HAC de tipo salvaje es la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19 o la SEC ID NO.: 20.

31. La variante de la enzima SHC/HAC del párrafo 29 o 30, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90.0% o por lo menos 95.0% de identidad con una secuencia de aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

32. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 31, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 90 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

33. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 31, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos

en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 172 y 277 de la SEC ID NO.: 1.

34. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 31, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1.

35. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 31, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 431 de la SEC ID NO.: 1.

36. La variante de enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 31, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácido relativa a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

37. La variante de la enzima SHC/HAC del párrafo 35 o 36, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación

con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1.

38. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 37, en donde una o más, por ejemplo todas, las alteraciones de aminoácidos en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 o 613 son sustituciones, por ejemplo sustituciones no conservadoras.

39. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 38, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, histidina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 sustituye

el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, lisina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
5 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
10 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
15 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, serina.

40. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 39, en donde la secuencia de aminoácidos de la
20 variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

una alteración de un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1;
25 una alteración de aminoácido en una posición

correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1; y

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1.

41. La variante de la enzima SHC/HAC del párrafo 40, en
5 donde:

la alteración del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo,
10 arginina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por
15 ejemplo, valina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro,
20 por ejemplo, treonina.

42. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 41, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de
25 aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

una alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1; y/o

5 una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1; y/o

10 una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1.

43. La variante de la enzima SHC/HAC del párrafo 42, en donde:

15 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o

20 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

25 la alteración de aminoácidos en una posición

correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

5 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo histidina; y/o

10 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, tirosina; y/o

15 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, triptófano.

20 44. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 43, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

25 una alteración de aminoácidos en una posición

correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1.

45. La variante de la enzima SHC/HAC del párrafo 44, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo glutamina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, isoleucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo tirosina.

46. La variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 45, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID

NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 17 y la SEC ID NO.: 18.

5 47. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante de la enzima SHC/HAC de cualquiera de los párrafos 29 a 46.

48. La secuencia de ácido nucleico del párrafo 47, en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona de la SEC ID NO.: 6, SEC ID NO.: 7, SEC ID NO.: 8, SEC ID NO.: 9, SEC ID NO.: 22 y la SEC ID NO.: 23.

10 49. Una construcción que comprende la secuencia de ácido nucleico del párrafo 47 o 48.

50. Un vector que comprende la construcción del párrafo 49.

15 51. Una célula hospedera recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico del párrafo 47 o 48, la construcción del párrafo 49 o el vector del párrafo 50.

52. La célula hospedera recombinante del párrafo 51, en donde la construcción se integra en el genoma de la célula hospedera.

20 53. La célula hospedera recombinante del párrafo 51 o 52, en donde la célula hospedera recombinante se selecciona de células hospederas procariotas, de levadura, vegetales y/o de insectos.

25 54. La célula hospedera recombinante de cualquiera de los párrafos 51 a 53, en donde la célula hospedera recombinante es

una bacteria que tiene un género seleccionado de *Escherichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, por ejemplo, en donde la célula hospedera recombinante es *E. coli*.

5 55. El proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-24 en donde la mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH comprende una mezcla de isómeros EE:EZ.

 56. El proceso de acuerdo con el párrafo 55 en donde la mezcla de isómeros EE:EZ está en una proporción en peso de:
10 EE:EZ 90:10; EE:EZ 80:20; EE:EZ 86:14; EE:EZ 70:30; EE:EZ 69:31; o EE:EZ 66:34 o la mezcla de isómeros EE:EZ se selecciona del grupo que consiste de: 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.

 57. El proceso de acuerdo con el párrafo 56 en donde la
15 mezcla de isómeros EE:EZ está en una proporción en peso de 80:20.

 58. El proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 24 o cualquiera de los párrafos 55 a 57, en donde la proporción en peso del biocatalizador SHC/HAC a EEH o una
20 mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH (de preferencia una mezcla de isómeros EE:EZ en una relación en peso de 80:20) está en el intervalo de aproximadamente 0.5-2:1 o aproximadamente de 0.25-2:1 o aproximadamente 0.1-2:1 o aproximadamente 1:1 o aproximadamente 0.5:1.

25 59. El proceso de acuerdo con el párrafo 58 en donde la

relación en peso del biocatalizador SHC/HAC a EEH o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH (de preferencia una mezcla de isómeros EE:EZ en una relación en peso de 80:20) está en el intervalo de aproximadamente 1:1 o aproximadamente 0.5:1 o aproximadamente 0.1:1.

OTRAS ENZIMAS SHC/HAC Y VARIANTES DE ENZIMAS

Además, se ha descubierto sorprendentemente que las variantes de la enzima SHC/HAC también actúan sobre otros sustratos, tal como E,E-bishomofarnesol para elaborar productos, tal como el óxido de Ambra.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que ciertas enzimas SHC de tipo salvaje proporcionan una selectividad mejorada (es decir, más alta) para EEH sobre otros isómeros de homofarnesol en comparación con WT AacSHC.

Por lo tanto, se espera que más enzimas SHC/HAC de tipo salvaje y otras variantes de enzimas SHC/HAC de tipo salvaje también proporcionen actividad enzimática (por ejemplo, actividad enzimática mejorada) para la conversión de EEH en (-)-Ambrox y/o para la conversión de BisEEH a óxido de Ambra.

Por lo tanto, se proporciona en la presente un proceso para producir (-)-Ambrox mediante la conversión enzimática de EEH en (-)-Ambrox. También se proporciona en la presente un proceso para fabricar óxido de Ambra mediante la conversión enzimática de E,E-bishomofarnesol en óxido de Ambra. Estos procesos pueden usar cualquier enzima SHC/HAC de tipo salvaje

o variante de enzima descrita en la presente.

Además, en la presente se proporciona una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

En particular, se proporciona en la presente un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, el proceso comprende convertir enzimáticamente EEH o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH en (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

En particular, se proporciona en la presente un proceso para preparar óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra, el proceso comprende convertir enzimáticamente BisEEH o una mezcla de isómeros de bishomofarnesol que comprende BisEEH en óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

La "selectividad" de una enzima o variante de enzima se refiere a la capacidad de la enzima o variante de enzima para reaccionar con un sustrato particular en comparación con otro

sustrato. Por ejemplo, una enzima WT SHC o una variante enzimática de WT SHC que es selectiva para EEH sobre otros isómeros de homofarnesol o selectiva para BisEEH sobre otros isómeros de bishomofarnesol significa que es más probable que la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC convierta EEH que otros isómeros del homofarnesol o para convertir BisEEH en otros isómeros de bishomofarnesol.

Por ejemplo, el % en peso del total de productos formados como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH puede ser de por lo menos aproximadamente 1 punto porcentual mayor que el % en peso del total de productos formados como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Por ejemplo, el % en peso de los productos totales formados como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH puede ser por lo menos aproximadamente de 2 o por lo menos aproximadamente de 3 o por lo menos aproximadamente de 4 puntos porcentuales mayor que el % en peso del total de productos formados como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Por ejemplo, el % en peso de los productos totales formados como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH puede ser de hasta aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 20 o hasta aproximadamente 15 o hasta aproximadamente 10 puntos porcentuales más que el % en peso de los productos totales

formados como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Por ejemplo, el % en peso de los productos totales formados como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH pueden ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 o de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 puntos porcentuales mayor que el % en peso de los productos totales formados como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Los productos totales formados como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o variante enzimática de WT SHC o WT AacSHC o variante de WT AacSHC pueden, por ejemplo, comprender, consistir esencialmente en compuestos de la fórmula (I) ((-)-Ambrox) y la fórmula (IV) descritos en la presente cuando se usa EEH como sustrato. Los productos totales formados como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o variante enzimática de WT SHC o WT AacSHC o la variante de WT AacSHC pueden, por ejemplo, comprender, consistir esencialmente de o consistir de compuestos de la fórmula (X) y/o la fórmula (XII) descrita en la presente cuando se usa bisEEH como sustrato.

Por ejemplo, el % en peso de (-)-Ambrox formado usando la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC puede, por ejemplo, ser de por lo menos aproximadamente 1 punto porcentual mayor que el % en peso de (-)-Ambrox formado como un resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Por ejemplo, el % en peso

de (-)-Ambrox formado como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH puede ser de por lo menos aproximadamente 2 o por lo menos aproximadamente 3 o por lo menos aproximadamente 4 puntos porcentuales mayor que el % en peso de (-)-Ambrox formado como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Por ejemplo, el % en peso de (-)-Ambrox formado como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH puede ser de hasta aproximadamente 40 o hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 20 o más hasta aproximadamente 15 o hasta aproximadamente 10 puntos porcentuales mayor que el % en peso de (-)-Ambrox formado como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH. Por ejemplo, el % en peso de (-)-Ambrox formado como resultado de la reacción de la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC con EEH puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 o de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 puntos porcentuales mayor que el % en peso de (-)-Ambrox formado como resultado de la reacción de WT AacSHC con EEH.

La selectividad de una enzima WT SHC o una variante enzimática de WT SHC también puede compararse con la selectividad de WT AacSHC o una variante de WT AacSHC comparando la relación de conversión EEH:EZH (es decir, % de conversión de EEH:% de conversión de EZH) o relación de

conversión de bisEEH:bisEZH (es decir, % de conversión de bisEEH:% de conversión de bisEZH) de las reacciones que usan cada enzima. Esto puede determinarse midiendo la cantidad de EEH y EZH o bisEEH y bisEZH que queda en la mezcla de reacción cuando se ha completado la reacción. Alternativamente, la selectividad de una enzima WT SHC o una variante enzimática de WT SHC también puede compararse con la selectividad de WT AacSHC o una variante de WT AacSHC comparando la relación de los productos que surgen de la conversión de EEH (compuestos de las fórmulas I y IV) y EZH (compuestos de las fórmulas II y III) respectivamente o la conversión de bisEEH (compuestos de la fórmula X y XII) y bisEZH (XI y XIII) respectivamente.

La enzima SHC o la variante enzimática de WT SHC puede, por ejemplo, proporcionar una relación de conversión EEH:EZH de por lo menos aproximadamente 2.0 en un proceso para fabricar (-)-Ambrox a partir de una mezcla que comprende EEH y EZH. Por ejemplo, la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC puede proporcionar una relación de conversión EEH:EZH de por lo menos aproximadamente 2.5 o por lo menos aproximadamente 3.0 o por lo menos aproximadamente 3.5 en un proceso para fabricar (-)-Ambrox a partir de una mezcla que comprende EEH y EZH. Por ejemplo, la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC puede proporcionar una relación de conversión EEH:EZH de hasta aproximadamente 5.0 o hasta aproximadamente 4.5 o hasta aproximadamente 4.0 en un proceso para fabricar (-)-

Ambrox a partir de una mezcla que comprende EEH y EZH. Por ejemplo, la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC puede proporcionar una relación de conversión EEH:EZH que varía de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 5.0 o de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 4.5 o de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 4.0 en un proceso para hacer (-)-Ambrox de una mezcla que comprende EEH y EZH. Esto puede, por ejemplo, contrastar con la relación de conversión proporcionada por AacSHC en un proceso para elaborar (-)-Ambrox a partir de una mezcla que comprende EEH y EZH, que puede, por ejemplo, ser menor de aproximadamente 2.0.

La enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, de la que puede derivarse la variante de la enzima SHC/HAC) puede ser, por ejemplo, una SHC obtenida de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac), *Zymomonas mobilis* (Zmo), *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp), *Gluconobacter morbifer* (Gmo), *Burkholderia ambifaria*, *Bacillus anthracis*, *Methylococcus capsulatus*, *Frankia alni*, *Acetobacter pasteurianus* (Apa), *Thermosynechococcus elongatus* (Tel), *Streptomyces coelicolor* (Sco), *Rhodopseudomonas palustris* (Rpa), *Teredinibacter tumerae* (Ttu), *Pelobacter carbinolicus* (Pca), *Tetrahymena pyriformis* (Tpy), *Bacillus megaterium* (Bme) o *Streptomyces albolongus* (Sal) (ver, por ejemplo, WO 2010/139719, US 2012/01345477, WO 2012/066059, cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia).

En particular, la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, de la que puede derivarse la variante de la enzima SHC/HAC) puede ser la enzima SHC/HAC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac), la enzima SHC/HAC de *Zymomonas mobilis* (Zmo), la enzima SHC/HAC de *Zymomonas mobilis* (Zmo), la enzima SHC/HAC de *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp/Bja), la enzima SHC/HAC de *Acetobacter pasteurianus* (Apa), la enzima SHC/HAC de *Bacillus megaterium* (Bme) o la enzima SHC/HAC de *Gluconobacter morbifer* (Gmo). En particular, la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, de la que puede derivarse la variante de la enzima SHC/HAC) puede ser la enzima SHC/HAC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac).

Cuando la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC tiene una selectividad más alta para EEH sobre otros isómeros de homofarnesol en comparación con AacSHC y/o variantes de AacSHC, la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, de la cual la variante de la enzima SHC/HAC puede derivarse) no es la enzima *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac) SHC/HAC. En particular, cuando la enzima WT SHC o la variante enzimática de WT SHC tiene una mayor selectividad por EEH que otros isómeros de homofarnesol en comparación con WT AacSHC y/o variantes de WT AacSHC, la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, variante de la enzima SHC/HAC) puede seleccionarse de TelSHC1, ApaSHC1, ZmoSHC1, ZmoSHC2, BjaSHC, GmoSHC BmeSHC, SalSHC, ApaSHCA. Por ejemplo, cuando la enzima

WT SHC o la variante enzimática de WT SHC tiene una mayor selectividad por EEH sobre otros isómeros de homofarnesol en comparación con WT AacSHC y/o variantes de WT AacSHC, la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, variante de la enzima SHC/HAC) puede seleccionarse de ZmoSHC1, BjaSHC, GmoSHC, ApaSHC1 y BmeSHC.

Para facilitar la referencia, la designación "AacSHC" puede usarse para referirse a la enzima SHC/HAC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac), "ZmoSHC" puede usarse para referirse a la enzima SHC/HAC de *Zymomonas mobilis* (Zmo), "BjpSHC" o "BjaSHC" puede usarse para referirse a la enzima *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp) SHC/HAC, "GmoSHC" puede usarse para referirse a la enzima *Gluconobacter morbifer* (Gmo) SHC/HAC, "BmeSHC" puede usarse para referirse a Enzima SHC/HAC de *Bacillus megaterium*.

La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje. Por ejemplo, la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 75.0% o por lo menos aproximadamente 80.0% o por lo menos aproximadamente 85.0% o por lo menos aproximadamente 90.0% o por lo menos aproximadamente 95.0% o por lo menos aproximadamente 95.5% o por lo menos

aproximadamente 96.5% o por lo menos aproximadamente 97.0% o por lo menos aproximadamente 97.5% o por lo menos aproximadamente 98.0% o por lo menos aproximadamente 98.5% o por lo menos aproximadamente 99.0% de identidad con una
5 secuencia de aminoácido de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

La enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 100% con una enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

La variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de
10 aminoácidos que tiene menos de 100% de identidad, por ejemplo, igual o menor de 99.5% o igual o menor de 99.0% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener
15 de aproximadamente 70.0% a aproximadamente 99.5% o de aproximadamente 80.0% a aproximadamente 99.0% o de aproximadamente 85.0% a aproximadamente 98.5% o de aproximadamente 90.0% a aproximadamente 98.0% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo
20 salvaje.

La secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser, por ejemplo, AacSHC (SEC ID NO.: 1), ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11), ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12), BjpSHC (SEC ID NO.: 13), GmoSHC (SEC ID NO.: 14), TelSHC (SEC ID NO.: 19), ApaSHC1
25 (SEC ID NO.: 20), BmeSHC (SEC ID NO.: 28), SalSHC (SEC ID NO.:

29) o ApaSHCA (SEC ID NO.: 30). Por ejemplo, la enzima SHC/HAC de tipo salvaje puede ser AacSHC (SEC ID NO.: 1).

Por lo tanto, en determinadas modalidades, la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una
5 secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima
10 SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 75.0% o por lo menos aproximadamente 80.0% o por lo menos aproximadamente 85.0% o por lo menos aproximadamente 90.0% o por lo menos aproximadamente 95.0% o por lo menos aproximadamente 95.5% o por lo menos
15 aproximadamente 96.5% o por lo menos aproximadamente 97.0% o por lo menos aproximadamente 97.5% o por lo menos aproximadamente 98.0% o por lo menos aproximadamente 98.5% o por lo menos aproximadamente 99.0% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la enzima SHC/HAC puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 100% con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13 SEC ID
25 NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC

ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una secuencia de aminoácidos que tiene menos de 100% de identidad, por ejemplo, igual o menor de 99.5% o igual o menor de 99.0% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13 SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 70.0% a aproximadamente 99.5% o de aproximadamente 80.0% a aproximadamente 99.0% o de aproximadamente 85.0% a aproximadamente 98.5% o de aproximadamente 90.0% a aproximadamente 98.0% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13 SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

El "porcentaje (%) de identidad" con respecto a una secuencia polipeptídica o de nucleótidos se define respectivamente como el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia, después de alinear la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de

determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando elementos de programación ("software") de computadora disponible públicamente. Los experimentados en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente y significan cualquier cadena de aminoácidos unida a péptido, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona1.

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia, se puede determinar mediante alineaciones de secuencias. Tales alineamientos pueden llevarse a cabo con varios algoritmos conocidos en la técnica, de preferencia con el algoritmo matemático de Karlin and Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmalign (paquete HMMER, <http://hmmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, por ejemplo, en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> o el programa GAP (algoritmo matemático de la Universidad de Iowa) o el algoritmo matemático de Myers y Miller (1989 - Cabios 4: 11-17). Los

parámetros preferidos que se usan son los parámetros predeterminados, ya que están configurados en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse usando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Se incorpora un algoritmo similar en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de polinucleótidos que sean homólogas a los ácidos nucleicos que codifican la proteína relevante. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido.

Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Al usar los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los respectivos programas. El análisis de coincidencia de secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-162) o campos aleatorios de Markov. Cuando se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia en la presente solicitud, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de

la secuencia más larga, si no se indica específicamente lo contrario.

En modalidades particulares, el % de identidad entre dos secuencias se determina usando CLUSTAL O (versión 1.2.4).

5 En determinadas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener alteraciones iguales o menores a aproximadamente 200 aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13,
10 SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener un valor igual o menor a aproximadamente 150 o igual o menor a aproximadamente 120 o igual o menor a aproximadamente 100 o igual o menor a
15 aproximadamente 95 o igual o menor a aproximadamente 90 o igual o menor de aproximadamente 85 o igual o menor de aproximadamente 80 o igual o menor de aproximadamente 75 o igual o menor de aproximadamente 70 o igual o menor de aproximadamente 65 o igual o menor de aproximadamente 60 o
20 igual o menor de aproximadamente 55 o igual o menor de aproximadamente 50 o igual o menor de aproximadamente 45 o igual o menor de aproximadamente 40 o igual o menor de aproximadamente 35 o igual o menor de aproximadamente 30 o igual o menor de aproximadamente 25 o igual 1 o menor de
25 aproximadamente 20 o igual o menor de aproximadamente 15 o

igual o menor de aproximadamente 10 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener por lo menos 1 o por lo menos 2 o por lo menos 3 o por lo menos 4 o por lo menos 5 o por lo menos 6 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 1,

SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener desde aproximadamente 4 a aproximadamente 15 alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30. Por ejemplo, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 amino alteraciones ácidas en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje, por ejemplo en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30.

Las alteraciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, inserciones, eliminaciones y/o sustituciones como se describió anteriormente. Por ejemplo, las alteraciones de aminoácidos pueden ser sustituciones, por ejemplo, sustituciones no

conservadoras.

En algunas modalidades, las únicas alteraciones de aminoácidos en comparación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje (por ejemplo, en comparación con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30) son sustituciones (es decir, no hay inserciones ni eliminaciones).

Las alteraciones de aminoácidos se definen en relación con una secuencia de referencia. Una alteración de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia significa que la secuencia de aminoácidos de la secuencia variante es diferente a la secuencia de referencia.

A los aminoácidos en la secuencia de referencia y en la secuencia variante se les puede asignar un número, en donde la numeración comienza con el aminoácido en el extremo N-terminal del polipéptido (es decir, el aminoácido en el extremo N-terminal del polipéptido se numera 1, el siguiente aminoácido tiene el número 2, etc.). La "posición" de una secuencia de referencia se refiere a un residuo de aminoácido específico presente en la secuencia de referencia identificada por la numeración específica de los aminoácidos en la secuencia de referencia. La "posición" de una secuencia variante se refiere a un residuo de aminoácido específico presente en la secuencia variante como se identifica por la numeración específica de

los aminoácidos en la secuencia variante.

Dado que la secuencia variante puede incluir eliminaciones o inserciones en comparación con la secuencia de referencia, los aminoácidos de la secuencia variante pueden numerarse de forma diferente a los mismos aminoácidos de la secuencia de referencia. A modo de ejemplo, si se inserta un aminoácido entre los aminoácidos 131 y 132 de la SEC ID NO.: 1, el aminoácido que sigue a la inserción tendrá la numeración 133 en la secuencia variante mientras conserva la numeración 132 en la secuencia de referencia. En este ejemplo, la posición de la secuencia variante que corresponde a la posición 132 de la secuencia de referencia es la posición 133. Por lo tanto, los aminoácidos en la secuencia variante que se han retenido de la secuencia de referencia pueden definirse haciendo referencia a la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia. En otras palabras, una "posición" en la secuencia variante puede definirse por referencia a una "posición correspondiente" en la secuencia de referencia. En particular, las sustituciones en la secuencia variante en comparación con la secuencia de referencia pueden definirse haciendo referencia a la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia a pesar de cualquier inserción y/o eliminación en la secuencia de referencia. Cuando se han eliminado los aminoácidos de una secuencia de referencia, no existe una "posición correspondiente" en la secuencia variante. Donde no hay

inserciones o eliminaciones en comparación con la secuencia de referencia (es decir, solo hay sustituciones), la "posición correspondiente" de la secuencia de referencia será la misma que la posición en la secuencia variante.

5 Las enzimas SHC/HAC de tipo salvaje de diferentes especies tienen diferentes longitudes de polipéptido. Las secuencias de tipo salvaje pueden alinearse usando algoritmos como se describió anteriormente para identificar "posiciones correspondientes" en dos enzimas SHC/HAC de tipo salvaje
10 diferentes. Por lo tanto, el aminoácido en una posición de la secuencia variante correspondiente a una posición en una secuencia de referencia puede, por ejemplo, ser un residuo de aminoácido diferente y/o puede tener un número diferente al de la secuencia de referencia. A modo de ejemplo, el aminoácido M
15 en la posición 132 de AacSHC (SEC ID NO.: 1) puede corresponder al aminoácido Y en la posición 185 de ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11).

Por lo tanto, la alteración de aminoácidos puede definirse en relación con dos secuencias de referencia diferentes. Por ejemplo, la alteración de aminoácidos puede ser un cambio en
20 comparación con una primera secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de enzima SHC/HAC de tipo salvaje de la que se deriva la variante) y la posición de la alteración de aminoácidos en la secuencia de variante puede definirse por referencia a una segunda secuencia de referencia (por ejemplo,
25 la AacSHC (SEC ID NO.: 1)). Por lo tanto, la alteración de

aminoácidos en la variante de la enzima SHC/HAC puede ser relativa a una primera enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición definida por referencia a una segunda enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

5 La variante de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, tener una o más de las sustituciones específicas, o combinaciones de sustituciones, definidas anteriormente con referencia a la SEC ID NO.: 1.

En particular, la variante de la enzima SHC/HAC puede
10 tener una o más de las sustituciones específicas, o combinaciones de sustituciones, en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 77, 81, 90, 92, 129, 132, 172, 224, 277, 431, 432, 557, 579, 601, 605 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

15 Cada una de estas sustituciones puede, por ejemplo, ser independientemente como se definió anteriormente en las subsecciones tituladas "Variantes de Aac 215G2" y "Otras variantes con nuevas mutaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y
20 613 de la SEC ID NO.: 1".

En particular, la variante de la enzima SHC/HAC puede tener una o más de las siguientes combinaciones de sustituciones:

(i) sustituciones en las posiciones correspondientes a
25 las posiciones 132, 224 y 432 de la SEC ID NO.: 1;

(ii) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 557 y 431 de la SEC ID NO.: 1;

(iii) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1;

5 (iv) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 557, 81 y 613 de la SEC ID NO.: 1;

(v) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 557, 81 y 431 de la SEC ID NO.: 1;

10 (vi) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 90 y 613 de la SEC ID NO.: 1;

(vii) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 172 y 277 de la SEC ID NO.: 1;

15 (viii) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432 y 37 de la SEC ID NO.: 1;

(ix) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432 y 174 de la SEC ID NO.: 1;

(x) sustituciones en las posiciones correspondientes a 20 las posiciones 132, 224, 432, 174 y 601 de la SEC ID NO.: 1;

(xi) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 132, 224, 432, 37, 174 y 601 de la SEC ID NO.: 1.

En algunas modalidades, la variante de la enzima SHC/HAC 25 es idéntica a la SEC ID NO.: 1 excepto por las siguientes

sustituciones de aminoácidos:

- (i) M132R, A224V, I432T, A557T y H431L (SEC ID NO.: 2); o
- (ii) M132R, A224V, I432T, A557T y R613S (SEC ID NO.: 3);
- o
- 5 (iii) M132R, A224V, I432T, A557T, Y81H y R613S (SEC ID NO.: 4); o
- (iv) M132R, A224V, I432T, A557T, Y81H y H431L (SEC ID NO.: 5); o
- (v) M132R, A224V, I432T, T90A y R613S (SEC ID NO.: 17); o
- 10 (vi) M132R, A224V, I432T, A172T y M277K (SEC ID NO.: 18);
- o
- (vii) M132R, A224V, I432T y L37Q (SEC ID NO.: 24); o
- (viii) M132R, A224V, I432T, V174I (SEC ID NO.: 25); o
- (ix) M132R, A224V, I432T, V174I y F601Y (SEC ID NO.: 26);
- 15 o
- (x) M132R, A224V, I432T, L37Q, V174I y F601Y (SEC ID NO.: 27).

Los siguientes párrafos numerados definen aspectos adicionales de la presente descripción:

- 20 1. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, el proceso comprende convertir enzimáticamente (3E,7E)-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH en (-)- Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una enzima SHC/HAC
- 25 o una variante de la enzima SHC/HAC,

en donde la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje,

5 en donde la enzima WT SHC/HAC tiene una mayor selectividad por EEH sobre otros isómeros de homofarnesol.

2. Un proceso para preparar óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra, el proceso que comprende convertir enzimáticamente E,E-bishomofarnesol (BisEEH) o una
10 mezcla de isómeros de bishomofarnesol que comprende BisEEH en óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC, en donde la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos
15 aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

3. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, el proceso comprende convertir enzimáticamente 3E,7E-homofarnesol (EEH) o una mezcla de
20 isómeros de homofarnesol que comprende EEH en (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC,

en donde la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo
25 menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1,

SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12. SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30; y

5 en donde la mezcla de isómeros que comprende EEH se selecciona 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.

4. Un proceso para preparar óxido de Ambra o una mezcla
10 que comprende óxido de Ambra, el proceso que comprende convertir enzimáticamente E,E-bishomofarnesol (BisEEH) o una mezcla de isómeros de bishomofarnesol que comprende BisEEH en óxido de Ambra o una mezcla que comprende óxido de Ambra usando una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC, en
15 donde la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12. SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o
20 la SEC ID NO.: 30; y

en donde la mezcla de isómeros que comprende EEH se selecciona de uno o más de los siguientes grupos que consisten de [(E,E) y [(Z,E)] y/o [(E,E) y (E,Z)] y/o [(Z,E), (E,E) y (E,Z)] también designados como [EE:EZ], [EE:ZE] y [EE:EZ:ZE]
25 respectivamente.

5. El proceso del párrafo 1 o 3, en donde la enzima SHC/HAC tiene una mayor selectividad por EEH sobre otros isómeros de homofarnesol en comparación con la de WT AacSHC.

6. El proceso de cualquiera de los párrafos 1, 3 o 5, en donde % en peso de los productos totales formados como resultado de la reacción de la enzima SHC/HAC o la variante de enzima con EEH es por lo menos aproximadamente 1 punto porcentual, por ejemplo en por lo menos aproximadamente 2 puntos porcentuales o por lo menos aproximadamente 3 puntos porcentuales superior al % en peso de los productos totales formados como resultado de la reacción de AacSHC con EEH.

7. El proceso de cualquiera de los párrafos 1, 3, 5 o 6, en donde la relación de conversión EEH:EZH es por lo menos aproximadamente 2.0, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 2.5 o por lo menos aproximadamente 3.0.

8. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 7, en donde la enzima SHC/HAC de tipo salvaje se obtiene de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac), *Zymomonas mobilis* (Zmo), *Bradyrhizobium japonicum* (Bjp), *Gluconobacter morbifer* (Gmo), *Burkholderia ambifaria*, *Bacillus anthracis*, *Methylococcus capsulatus*, *Frankia alni*, *Acetobacter pasteurianus* (Apa), *Thermosynechococcus elongatus* (Tel), *Streptomyces coelicolor* (Sco), *Rhodopseudomonas palustris* (Rpa), *Teredinibacter turnerae* (Ttu), *Pelobacter carbinolicus* (Pca), *Tetrahymena pyriformis*, *Bacillus megaterium* o

Streptomyces albolongus.

9. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 8, en donde la enzima SHC/HAC de tipo salvaje es la SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o la SEC ID NO.: 30, por ejemplo, en donde la enzima SHC/HAC de tipo salvaje es la SEC ID NO.: 1.

10. El proceso del párrafo 1, en donde la mezcla de isómeros de homofarnesol se selecciona de una o más de las siguientes mezclas: [(3Z,7Z), (3E,7Z), (3Z,7E) y (3E,7E)], [(3Z,7E), (3E,7E) y (3E,7Z)], [(3Z,7E) y (3E,7E)], [(3Z,7E), (3E,7Z)] y/o [(3E,7E) y (3E,7Z)].

11. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde el proceso usa un agente solubilizante seleccionado de Triton X-100, Tween 80, taurodesoxicolato, taurodesoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS) y/o lauril sulfato de sodio (SLS).

12. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 11, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90.0% o por lo menos 95.0% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

13. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la enzima

SHC/HAC de tipo salvaje en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

14. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 13, en
5 donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 90 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

15. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 13, en
10 donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 172 y 277 de la SEC ID NO.: 1.

16. El proceso de cualquiera de los párrafos 1 a 13, en
15 donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácido con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC
20 ID NO.: 1.

17. El proceso del párrafo 16, en donde la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 431
25 de la SEC ID NO.: 1.

18. El proceso del párrafo 16, en donde la secuencia de aminoácidos variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

19. El proceso del párrafo 17 o 18, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos con respecto a la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1.

20. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde una o más, por ejemplo todas, las alteraciones de aminoácidos en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 o 613 son sustituciones, por ejemplo, sustituciones no conservadoras.

21. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde:
la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, histidina; y/o
la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición

correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

5 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, lisina; y/o

 la alteración de aminoácidos en una posición
10 correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

 la alteración de aminoácidos en una posición
15 correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

 la alteración de aminoácidos en una posición
20 correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, serina.

22. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la
25 secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC

tiene una o más alteraciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

una alteración de un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1;

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1; y

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1.

23. El proceso del párrafo 22, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, arginina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina.

24. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje
5 seleccionada de:

- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- 10 una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- una alteración de aminoácido en una posición
15 correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1; y/o
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1.

25. El proceso del párrafo 24, en donde:

- la alteración de aminoácidos en una posición
20 correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o
- la alteración del aminoácido en una posición
25 correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 sustituye

el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje para un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición
5 correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición
10 correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo histidina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición
15 correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, tirosina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición
20 correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, triptófano.

26. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la
25 secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC

tiene una o más alteraciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

una alteración de aminoácido en una posición
5 correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1.

10 27. El proceso del párrafo 26, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro,
15 por ejemplo glutamina; y/o la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, isoleucina; y/o

20 la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo tirosina.

25 28. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde la

variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 17, SEC ID NO.: 18, SEC ID NO.: 24, SEC ID NO.: 25, SEC ID NO.: 26 y la SEC ID NO.: 27.

29. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde el proceso comprende cultivar células hospederas recombinantes que producen la variante de la enzima SHC/HAC.

30. El proceso del párrafo 29, en donde la célula hospedera recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima SHC/HAC, por ejemplo seleccionada de la SEC ID NO.: 6, SEC ID NO.: 7, SEC ID NO.: 8, SEC ID NO.: 9, SEC ID NO.: 22 o la SEC ID NO.: 23.

31. El proceso de cualquier párrafo anterior, en donde (-)-Ambrox se produce mezclado con por lo menos uno o más de los subproductos (II), (III) o (IV).

32. (-)-Ambrox obtenido u obtenible mediante el proceso de cualquiera de los párrafos anteriores, por ejemplo, en forma amorfa o cristalina.

33. Óxido de Ambra obtenido u obtenible mediante el proceso de cualquier párrafo anterior, por ejemplo, en forma amorfa o cristalina.

34. Uso de (-)-Ambrox del párrafo 32 y/u óxido de Ambra del párrafo 33 como parte de una fragancia o un cosmético o un producto de consumo.

35. Una fragancia o un cosmético o un producto de consumo que comprende (-)-Ambrox del párrafo 32 y/u óxido de Ambra del párrafo 33.

5 36. Una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 70% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

37. La enzima SHC/HAC o variante de enzima del párrafo 36, en donde la enzima SHC/HAC de tipo salvaje es la SEC ID
10 NO.: 1, SEC ID NO.: 11, SEC ID NO.: 12, SEC ID NO.: 13, SEC ID NO.: 14, SEC ID NO.: 19, SEC ID NO.: 20, SEC ID NO.: 28, SEC ID NO.: 29 o SEC ID NO.: 30, por ejemplo, la SEC ID NO.: 1.

38. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima del párrafo 36 o 37, en donde la variante de la enzima SHC/HAC
15 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 90.0% o por lo menos aproximadamente 95.0% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje.

39. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de
20 cualquiera de los párrafos 36 a 38, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 90, 172, 277,
25 431, 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

40. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 39, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 90 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

41. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 39, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene alteraciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 172 y 277 de la SEC ID NO.: 1.

42. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 39, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 y por lo menos una posición correspondiente a la posición 81, 431 o 613 de la SEC ID NO.: 1.

43. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 39, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 431 de la SEC ID NO.: 1.

44. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 39, en donde la secuencia de

aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en las posiciones correspondientes a las posiciones 557 y 613 de la SEC ID NO.: 1.

5 45. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima del párrafo 43 o 44, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una alteración de aminoácidos en relación con la enzima SHC/HAC de tipo salvaje en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID
10 NO.: 1.

46. La enzima SHC/HAC o variante de enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 45, en donde una o más, por ejemplo todas, las alteraciones de aminoácidos en las posiciones 81, 90, 172, 277, 431, 557 o 613 son sustituciones, por ejemplo
15 sustituciones no conservadoras.

47. La enzima SHC/HAC o variante de enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 46, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 81 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
20 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, histidina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 90 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo
25 salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina;

y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 172 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 277 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, lisina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 431 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 557 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 613 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, serina.

48. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 47, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

- una alteración de un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1;
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1; y
- una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1.

49. La enzima SHC/HAC o variante de enzima del párrafo 48, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 132 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo, arginina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 224 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 432 de la SEC ID NO.: 1 sustituye

el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo, treonina.

50. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 49, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1; y/o

15 una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1; y/o

20 una alteración de un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1.

51. La enzima SHC/HAC o variante de enzima del párrafo 50, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 77 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima

SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, alanina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 92 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
5 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, valina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 129 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
10 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo leucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 579 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
15 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido básico, por ejemplo histidina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
20 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, tirosina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 605 de la SEC ID NO.: 1 sustituye
25 el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima

SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo, triptófano.

52. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 51, en donde la secuencia de aminoácidos de la variante de la enzima SHC/HAC tiene una o más alteraciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SHC/HAC de tipo salvaje seleccionada de:

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1; y/o

10 una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1; y/o

una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1.

53. La enzima SHC/HAC o variante de enzima del párrafo 52, en donde:

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 37 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofílico neutro, por ejemplo glutamina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 174 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido hidrofóbico, por ejemplo, isoleucina; y/o

la alteración de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 601 de la SEC ID NO.: 1 sustituye el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la enzima SHC/HAC de tipo salvaje por un aminoácido aromático, por ejemplo tirosina.

54. La enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 53, en donde la variante de la enzima SHC/HAC tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 17, SEC ID NO.: 18, SEC ID NO.: 24, SEC ID NO.: 25, SEC ID NO.: 26 y la SEC ID NO.: 27.

55. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima de cualquiera de los párrafos 36 a 54.

56. La secuencia de ácido nucleico del párrafo 55, en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona de la SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 22 o la SEC ID NO.: 23.

57. Una construcción que comprende la secuencia de ácido nucleico del párrafo 55 o 56.

58. Un vector que comprende la construcción del párrafo 57.

59. Una célula hospedera recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico del párrafo 52 o 53, la construcción del párrafo 57 o el vector del párrafo 58.

60. La célula hospedera recombinante del párrafo 59, en donde la construcción se integra en el genoma de la célula hospedera.

5 61. La célula hospedera recombinante del párrafo 59 o 60, en donde la célula hospedera recombinante se selecciona de células hospederas procariotas, de levadura, vegetales y/o de insectos.

62. La célula hospedera recombinante de cualquiera de los párrafos 59 a 61, en donde la célula hospedera recombinante es
10 una bacteria que tiene un género seleccionado de *Escherichia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, por ejemplo, en los que la célula hospedera recombinante es *E. coli*.

63. El proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos
15 1-31 en donde la mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH comprende una mezcla de isómeros EE:EZ.

64. El proceso de acuerdo con el párrafo 63 en donde la mezcla de isómeros EE:EZ se selecciona del grupo que consiste de: EE:EZ 90:10; EE:EZ 80:20; EE:EZ 86:14; EE:EZ 70:30; EE:EZ
20 69:31; y EE:EZ 66:34 o en donde la mezcla de isómeros EE:EZ es EE:EZ 90:10; EE:EZ 80:20; EE:EZ 86:14; EE:EZ 70:30; EE:EZ 69:31; o EE:EZ 66:34.

65. El proceso de acuerdo con el párrafo 64 en donde la mezcla de isómeros EE:EZ está en una proporción en peso de
25 80:20.

66. El proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-31 o los párrafos 63-65 en donde la proporción en peso de la enzima SHC/HAC a EEH o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH (de preferencia una mezcla de isómeros EE:EZ en una proporción en peso de 80:20) está en el intervalo de aproximadamente 0.5-2:1 o aproximadamente 0.25-2:1 o aproximadamente 0.1-2:1 o aproximadamente 1:1 o aproximadamente 0.5:1.

67. El proceso de acuerdo con el párrafo 66 en donde la relación en peso de la enzima SHC/HAC a EEH o una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende EEH (de preferencia una mezcla de isómeros EE:EZ en una relación en peso de 80:20) está en el intervalo de aproximadamente 1:1 o aproximadamente 0.5:1 o aproximadamente 0.1:1.

Los siguientes párrafos numerados definen aspectos adicionales de la presente descripción

1. Un proceso para preparar (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox, en donde EE-homofarnesol (EEH) o una mezcla de isómeros que comprende EE-homofarnesol (EEH) se convierte enzimáticamente en (-)-Ambrox o una mezcla que comprende (-)-Ambrox en la que la conversión enzimática se lleva a cabo usando un biocatalizador de escualeno hopeno ciclasa/homofarnesol Ambrox ciclasa (SHC/HAC) que tiene una secuencia polipeptídica con por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo

menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% de identidad con la SEC ID NO.: 20 (ApaSHC1), SEC ID NO.: 19 (TelSHC), SEC ID NO.: 14 (GmoSHC),
5 SEC ID NO.: 28 (BmeSHC), SEC ID NO.: 29 (SalSHC) y/o la SEC ID NO.: 30 (ApaSHCA) en condiciones de reacción adecuadas para la producción de (-)-Ambrox y en donde la mezcla de isómeros que comprende EEH se selecciona de uno o más de los siguientes grupos que consisten de [(3E,7E) y [(3Z,7E)] y/o [(3E,7E) y
10 (3E,7Z)] y/o [(3Z,7E), (3E, 7E) y (3E,7Z)] también designados como [EE:EZ] y/o [EE:ZE] y/o [EE:EZ:ZE] respectivamente.

2. El proceso de acuerdo con el párrafo 1 en donde el proceso se lleva a cabo usando un biocatalizador SHC/HAC con por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo
15 menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99% de identidad con la SEC ID NO.:20 (ApaSHC1) o la SEC ID NO.: 28 (BmeSHC).

20 3. El proceso de acuerdo con el párrafo 2, en donde la conversión de EEH o una mezcla de isómeros que comprende EEH en (-)-Ambrox tiene lugar a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C, por ejemplo, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 50°C a un pH en el
25 intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 7.

4. El proceso de acuerdo con el párrafo 1 o el párrafo 2 en donde el proceso se lleva a cabo en presencia de un agente solubilizante, por ejemplo, SDS.

5 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-4, en donde el proceso comprende (a) cultivar una o más células hospederas recombinantes que expresan la enzima SHC/HAC en condiciones que permiten la producción del biocatalizador WT SHC/HAC antes de la conversión de EEH o una mezcla de isómeros que comprende EEH a (-)-Ambrox o una mezcla que
10 comprende (-)-Ambrox.

6. El proceso de acuerdo con el párrafo 5 en donde la etapa de cultivo y la etapa de conversión subsiguiente tienen lugar opcionalmente en el mismo recipiente de reacción bajo diferentes condiciones de reacción.

15 7. El proceso de acuerdo con el párrafo 6, en donde la etapa de cultivo tiene un intervalo de pH de 6 a 7 y la etapa de EEH a (-)-Ambrox tiene un intervalo de pH de 4.8 a 5.5.

8. El proceso de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-7, en donde la mezcla de isómeros que comprende EEH comprende
20 una mezcla de isómeros EE:EZ.

9. El proceso de acuerdo con el párrafo 8, en donde la mezcla de isómeros EE:EZ está en una proporción en peso seleccionada del grupo que consiste de: 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 o la
25 mezcla de isómeros EE:EZ en una relación en peso de: 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.

10. El proceso del párrafo 9 en donde la mezcla de isómeros
EE:EZ está en una proporción en peso de 80:20.

5 11. El proceso de cualquiera de los párrafos 1-10 en donde
la proporción en peso del biocatalizador SHC/HAC a EEH o una
mezcla de isómeros que comprende EEH (de preferencia una mezcla
de isómeros EE:EZ en una proporción en peso de 80:20) está en
el intervalo de aproximadamente 0.5-2:1 o aproximadamente de
10 0.25-2:1 o aproximadamente de 0.1-2:1 o aproximadamente de 1:1
o aproximadamente de 0.5:1.

12. El proceso de acuerdo con el párrafo 11 en donde la
relación en peso de la enzima SHC/HAC a EEH o una mezcla de
isómeros que comprende EEH (de preferencia una mezcla de
15 isómeros EE:EZ en una relación en peso de 80:20) es de
aproximadamente 1:1 o aproximadamente 0.5:1 o aproximadamente
0.1:1.

13. El proceso de cualquiera de los párrafos 1-12 en donde
(-)-Ambrox se produce mezclado con uno o más de los
20 subproductos (II), (IV) y/o (III).

14. El proceso del párrafo 13 en donde (-)-Ambrox se
separa del medio de reacción.

15. El proceso del párrafo 14 en donde (-)-Ambrox se
separa del medio de reacción usando una etapa de filtración,
25 una etapa de decantación o una combinación de una etapa de

filtración y decantación.

16. El proceso del párrafo 15 en donde la etapa de filtración es una etapa de filtración de banda o una etapa de filtración rotatoria.

5 17. El proceso de cualquiera de los párrafos 13-16 en donde antes de la etapa de separación, el (-)-Ambrox se calienta a una temperatura máxima de 55°C.

18. El proceso del párrafo 17 en donde el (-)-Ambrox recuperado se solubiliza en un solvente.

10 19. El proceso del párrafo 18 en donde el (-)-Ambrox solubilizado se filtra.

20. El proceso del párrafo 18 o 19 en donde el (-)-Ambrox se recupera en forma sólida eliminando el solvente por evaporación.

15 21. El proceso de cualquiera de los párrafos 14-20 en donde (-)-Ambrox está sustancialmente libre de subproductos (II), (IV) y/o (III).

22. Un producto de reacción que comprende (-)-Ambrox obtenible por el proceso de cualquiera de los párrafos 1-21.

20 23. El producto de reacción del párrafo 22 en donde el (-)-Ambrox está en forma sólida.

24. El producto de reacción del párrafo 23 en donde el (-)-Ambrox está en forma amorfa o cristalina.

25 25. Un método para hacer un producto que contiene (-)-Ambrox que comprende incorporar el producto de reacción de

cualquiera de los párrafos 22-24 en el producto.

26. El método del párrafo 25 en donde el producto es un producto de fragancia, un producto cosmético, un producto de limpieza, un producto detergente y/o un producto de jabón.

5 27. Una fragancia o cosmético o un producto para el cuidado del consumidor que comprende el producto de reacción de cualquiera de los párrafos 22-24.

28. Una fragancia o composición cosmética o para el cuidado del consumidor que comprende el producto de reacción
10 de cualquiera de los párrafos 22-24 y un componente adicional.

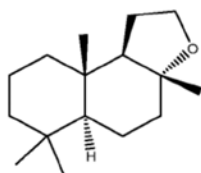
29. El uso del producto de reacción de cualquiera de los párrafos 22-24 como parte de una fragancia o producto cosmético para el cuidado del consumidor.

AMBROX Y SUS USOS

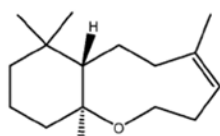
15 Además, se proporcionan en la presente los productos de reacción elaborados mediante los procesos descritos en este documento. Los productos de reacción pueden comprender, por ejemplo, consistir esencialmente de (-)-Ambrox y uno o más compuestos adicionales, por ejemplo uno o más de un compuesto
20 de la fórmula (II), un compuesto de la fórmula (III) y un compuesto de la fórmula (IV).

Como se usa en la presente, el término "Ambrox" incluye (-)-Ambrox de la fórmula (I) a continuación, así como (-)-Ambrox en forma isoméricamente pura o en una mezcla con una o
25 más de las siguientes moléculas de la fórmula (II) , (III),

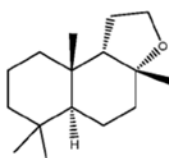
y/o (IV),



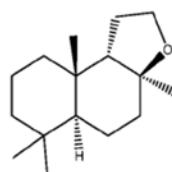
(I)



(II)



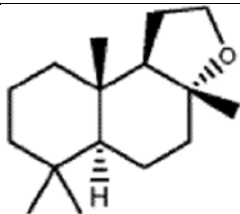
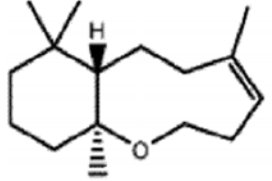
(III)



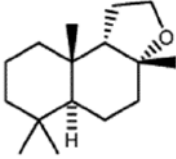
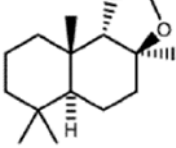
(IV).

La nomenclatura de los productos de reacción de las fórmulas (I), (II), (III) y (IV) se establece a continuación.

Tabla 2. Nomenclatura para los productos de reacción de las fórmulas (I), (II), (III) y (IV).

Compuesto	Descripción	Nombre y Estructura
(I)	(-)-Ambrox	 (3aR,5aS,9aS,9bR)-3a,6,6,9a-tetrametildodecahidronafto[2,1-b]furano
(II)	Macrociclo	 (7aS,11aS,Z)-5,8,8,11a-tetrametil-2,3,6,7,7a,8,9,10,11,11a-decahidrobenzo[<i>b</i>]oxonina

5

(III)	9b-epi-Ambrox	 (3aR,5aS,9aS,9bS)-3a,6,6,9a-tetrametildodeca-hidronafto[2,1-b]furano
(IV)	Escher <i>et al.</i> , (1990)	 (3aS,5aS,9aS,9bS)-3a,6,6,9a-tetrametildodeca-hidronafto[2,1-b]furano

10

(-)-Ambrox se conoce comercialmente como Ambrox (Firmenich), Ambroxan (Henkel), Ambrofix (Givaudan), Amberlyn (Quest), CetaloX Laevo (Firmenich), Ambermor (Aromor) y/o Norambrenolide Ether (Pacific).

15

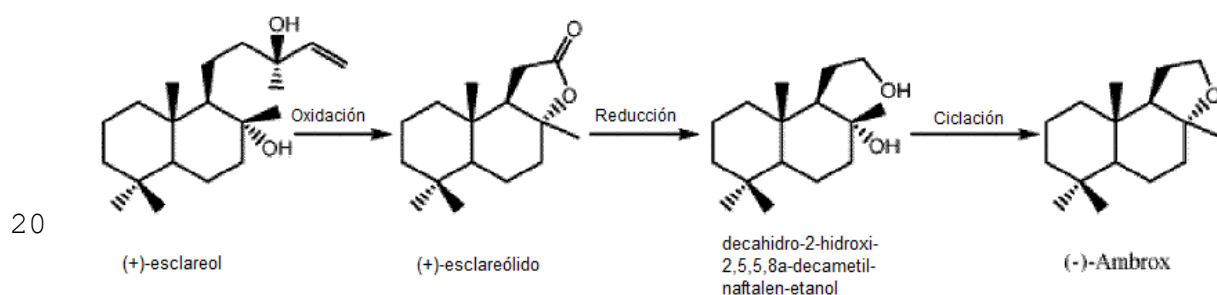
20

25

(-)-Ambrox es un compuesto aromático de importancia industrial y se ha usado en la industria de las fragancias durante mucho tiempo. Los beneficios sensoriales deseables especiales del (-)-Ambrox provienen del isómero (-) en lugar del (+). El olor del isómero (-) se describe como almizclado, amaderado, cálido o ambarino, mientras que el enantiómero (+)-Ambrox tiene una nota de olor relativamente débil. Los umbrales de olor y olor para productos similares a Ambrox también son diferentes. Mientras que varios materiales enriquecidos con (-)-Ambrox están disponibles comercialmente, es deseable producir materiales de (-)-Ambrox altamente enriquecidos,

idealmente (-)-Ambrox puro. Los procesos descritos en la presente pueden producir (-)-Ambrox de la fórmula (I) solo o en una mezcla con subproductos, tales como los compuestos mostrados en las fórmulas (II), (III) y/o (IV) anteriores.

5 (-)- Ambrox se puede producir a partir de esclareólido de acuerdo con el proceso de producción que se describe a continuación. Esclareol es un producto extraído de la salvia vegetal natural. Sin embargo, debido a que en este proceso se usa un material de partida natural, existen problemas
10 potenciales ya que implica una reacción de múltiples etapas, su operación es tortuosa, la cantidad y la estabilidad del suministro del material de partida pueden no ser siempre satisfactorias y la reacción puede no ser ambientalmente
15 crómico o un permanganato en la etapa de degradación oxidativa de (+)-esclareol.



(-)-Ambrox también se puede sintetizar a partir de homofarnesol usando diferentes rutas. A modo de ejemplo, el homofarnesol puede obtenerse mediante bromación, cianación e
25 hidrólisis de nerolidol para dar ácido homofarnesílico, seguido

de reducción. Alternativamente, el homofarnesol se puede obtener a partir de farnesol, cloruro de farnesilo, beta-farneseno u otros sustratos.

Los procesos descritos en la presente pueden producir (-)-Ambrox de la fórmula (I) solo o en una mezcla con subproductos, tales como el compuesto que se muestra en las fórmulas (II), (III) y/o (IV). Por ejemplo, se pueden preparar otros estereoisómeros de la fórmula (I) mediante los procesos descritos en la presente.

Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un compuesto de la fórmula (I) o una composición que comprende un compuesto de la fórmula (I) obtenido u obtenible mediante los procesos descritos en la presente, incluyendo todas sus modalidades.

En determinadas modalidades, no todo el homofarnesol (por ejemplo, EEH) se convierte en (-)-Ambrox o en un subproducto de la reacción. Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente, por ejemplo, las composiciones obtenidas mediante los procesos descritos en la presente, pueden comprender homofarnesol (por ejemplo, EEH, por ejemplo, además del compuesto de la fórmula (I) y/o compuestos de la fórmula (II), (III) y/o (IV)). Cualquier homofarnesol restante puede separarse de los otros productos de reacción de manera que el producto (-)-Ambrox no comprenda homofarnesol. En otras modalidades, todo el material de partida de homofarnesol se

convierte en (-)-Ambrox de la fórmula (I) o un subproducto de la reacción mediante los procesos descritos en la presente.

Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente pueden comprender, consistir esencialmente de uno o más de un compuesto de la fórmula (I), un compuesto de la fórmula (II), un compuesto de la fórmula (III), un compuesto de la fórmula (IV), un material de partida de homofarnesol (por ejemplo, EEH) y otros estereoisómeros del compuesto de la fórmula (I). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender, consistir esencialmente de un compuesto de la fórmula (I) y uno o más de un compuesto de la fórmula (II), un compuesto de la fórmula (III) y un compuesto de la fórmula (IV).

Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente pueden comprender igual o mayor que aproximadamente igual o mayor que aproximadamente 50% en peso del compuesto de la fórmula (I) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (I), el compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender igual o mayor de aproximadamente 55% en peso o igual o mayor de aproximadamente 60% en peso o igual o mayor de aproximadamente 65% en peso o igual o mayor de aproximadamente 70% en peso o igual o mayor de aproximadamente 75% en peso o igual o mayor de aproximadamente 80% en peso o igual o mayor de

aproximadamente 85% en peso o igual o mayor de aproximadamente 90% en peso o igual o mayor de aproximadamente 95% en peso del compuesto de la fórmula (I) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (I), el compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV). Las composiciones descritas en la presente pueden, por ejemplo, comprender igual o menor de aproximadamente 100% en peso del compuesto de la fórmula (I) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (I), el compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV). Por ejemplo, la mezcla puede comprender igual o menor de aproximadamente 99% en peso o igual o menor de aproximadamente 98% en peso o igual o menor de aproximadamente 97% en peso del compuesto de la fórmula (I) basado en el peso total de compuesto de la fórmula (I), el compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender de aproximadamente 50% en peso a aproximadamente 100% en peso o de aproximadamente 60% en peso a aproximadamente 99% en peso o de aproximadamente 70% en peso a aproximadamente 98% en peso o de aproximadamente 80% en peso a aproximadamente 97% en peso o de aproximadamente 90% en peso a aproximadamente 97% en peso del compuesto de la fórmula (I) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (I), el compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III)

y el compuesto de la fórmula (IV).

La relación en peso del compuesto de la fórmula (I) al peso total del compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV) en las composiciones descritas en la presente puede, por ejemplo, variar de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 99:1. Por ejemplo, la relación en peso del compuesto de la fórmula (I) al peso total del compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV) puede oscilar entre aproximadamente 65:35 y 99:1 o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 99:1 o de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 99:1 o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 99:1 o de aproximadamente 85:15 a aproximadamente 99:1 o de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 99:1 o de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 99:1. Por ejemplo, la relación en peso del compuesto de la fórmula (I) al peso total del compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV) puede oscilar entre aproximadamente 65:35 y aproximadamente 98:2 o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 97:3 o de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 96:4 o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 95:5 o de aproximadamente 85:15 a aproximadamente 90:10.

La relación en peso del compuesto de la fórmula (I) a

homofarnesol (por ejemplo, EEH) en las composiciones descritas en la presente puede, por ejemplo, oscilar entre aproximadamente 90:10 y aproximadamente 100:0. Por ejemplo, la relación en peso del compuesto de la fórmula (I) al homofarnesol (por ejemplo, EEH) en las composiciones descritas en la presente puede variar de aproximadamente 92:8 a aproximadamente 100:0 o de aproximadamente 94:6 a aproximadamente 100:0 o de aproximadamente de 95:5 a aproximadamente 100:0 o de aproximadamente 96:4 a aproximadamente 99.5:0.5 o de aproximadamente 97:3 a aproximadamente 99.0:1.0 o de aproximadamente 98:2 a 99.0:1.0.

La cantidad del compuesto de la fórmula (I), el compuesto de la fórmula (II), el compuesto de la fórmula (III) y el compuesto de la fórmula (IV) en una mezcla de estereoisómeros puede, por ejemplo, cuantificarse mediante cromatografía de gases e/o identificarse por espectroscopia de RMN.

(-)-Ambrox tal como se sintetiza mediante los procesos descritos en la presente (por ejemplo, usando enzimas SHC/HAC o variantes de las mismas y opcionalmente células hospederas recombinantes) puede, por ejemplo, estar en forma amorfa o en forma cristalina.

El (-)-Ambrox producido por los métodos descritos en la presente (por ejemplo, usando enzimas SHC/HAC o variantes de las mismas y, opcionalmente, células hospederas recombinantes) puede aislarse mediante extracción/destilación con vapor o

extracción con solventes orgánicos usando un solvente no miscible en agua (para separar los productos de reacción y el sustrato sin reaccionar del biocatalizador que permanece en la fase acuosa) seguido de la posterior evaporación del solvente para obtener un producto de reacción crudo como se determina por análisis de cromatografía de gases (GC). Los métodos de extracción/destilación con vapor y extracción con solventes orgánicos son conocidos por los experimentados en la técnica.

A modo de ejemplo, el (-)-Ambrox resultante se puede extraer de la mezcla de reacción completa usando un solvente orgánico, tal como un solvente no miscible en agua (por ejemplo, tolueno). Alternativamente, el (-)-Ambrox resultante puede extraerse de la fase sólida de la mezcla de reacción (obtenida, por ejemplo, por centrifugación o filtración) usando un solvente miscible con agua (por ejemplo, etanol) o un solvente no miscible con agua (por ejemplo, tolueno). Alternativamente, (-)-Ambrox resultante puede extraerse de la fase sólida de la mezcla de reacción usando una mezcla de solventes. A modo de ejemplo adicional, (-)-Ambrox está presente en la fase sólida como cristales o en forma amorfa y puede separarse de la fase sólida restante (material celular o restos del mismo) y la fase líquida también mediante filtración. A modo de ejemplo adicional, a una temperatura por encima del punto de fusión de (-)-Ambrox (aproximadamente 75°C), el (-)-Ambrox puede formar una capa de aceite sobre la

fase acuosa, la capa de aceite se puede eliminar y colectarse. Para garantizar una recuperación completa de (-)-Ambrox después de eliminar la capa de aceite, se puede adicionar un solvente orgánico a la fase acuosa que contiene la biomasa para extraer cualquier residuo de (-)-Ambrox contenido en, o sobre o encima de la biomasa. La capa orgánica se puede combinar con la capa de aceite, antes de que el conjunto se procese más para aislar y purificar (-)-Ambrox. El (-)-Ambrox puede cristalizarse más selectivamente para eliminar los subproductos (II), (IV) y (III) y cualquier sustrato de homofarnesol sin reaccionar del producto final de (-)-Ambrox. El término "cristalización selectiva" se refiere a una etapa del proceso en el que se hace cristalizar (-)-Ambrox a partir de un solvente mientras los compuestos (II), (III) y (IV) permanecen disueltos en el solvente que cristaliza a tal grado que el material cristalino aislado contiene solo el producto (-)-Ambrox, o si contiene cualquiera de los otros compuestos (II), (III) o (IV), entonces están presentes solo en cantidades olfativamente aceptables. El (-)-Ambrox puede, por ejemplo, estar libre o sustancialmente libre de subproductos (II), (III) y (IV). La etapa de cristalización selectiva puede usar un solvente miscible en agua como etanol o similar. La cristalización selectiva de (-)-Ambrox puede verse influida por la presencia de sustrato de homofarnesol sin reaccionar y también por la relación de (-)-Ambrox con respecto a los demás subproductos detectables (II),

(III) y/o (IV). Incluso si solo se obtiene una conversión del 10% del sustrato de homofarnesol en (-)-Ambrox, la cristalización selectiva de (-)-Ambrox sigue siendo posible.

La pureza olfativa del producto final de (-)-Ambrox se puede determinar usando un extracto de etanol al 10% en agua o analizando el material cristalino. El producto final (-)-Ambrox se prueba frente a una referencia comercialmente disponible de producto (-)-Ambrox para determinar su pureza olfativa, calidad y perfil sensorial. El material (-)-Ambrox también se prueba en estudios de aplicación realizados por experimentados para determinar si el material cumple con las especificaciones con respecto a su perfil organoléptico.

Los ejemplos de solventes orgánicos miscibles en agua y no miscibles en agua adecuados para su uso en la extracción y/o cristalización selectiva de (-)-Ambrox incluyen, entre otros, hidrocarburos alifáticos, de preferencia los que tienen de 5 a 8 átomos de carbono, tal como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, hidrocarburos alifáticos halogenados, de preferencia los que tienen uno o dos átomos de carbono, tal como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos, tal como benceno, tolueno, los xilenos, clorobenceno o diclorobenceno, éteres o alcoholes alifáticos acíclicos y cíclicos, de preferencia los que tienen de 4 a 8 átomos de carbono, tales como etanol,

isopropanol, éter dietílico, metil terc-butil éter, etil terc-butil éter, dipropiléter, diisopropiléter, dibutiléter, tetrahidrofurano o ésteres, tales como acetato de etilo o acetato de n-butilo o cetonas, tal como metil isobutil cetona o dioxano o mezclas de los mismos. Los solventes que se usan con especial preferencia son el heptano mencionado anteriormente, metil terc-butil éter (también conocido como MTBE, terc-butil metil éter, terc-butil metil éter y tBME), éter diisopropílico, tetrahidrofurano, acetato de etilo y/o mezclas de los mismos. De preferencia, se usa un solvente miscible en agua, tal como etanol para la extracción de (-)-Ambrox de la fase sólida de la mezcla de reacción. El uso de etanol es ventajoso porque es fácil de manejar, no es tóxico y es amigable con el medio ambiente.

El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a un producto de bioconversión, tal como (-)-Ambrox que ha sido separado o purificado de los componentes que lo acompañan. Una entidad que se produce en un sistema celular diferente de la fuente de la que naturalmente se origina está "aislada", porque necesariamente estará libre de los componentes que la acompañan naturalmente. El grado de aislamiento o pureza se puede medir por cualquier método apropiado, por ejemplo, análisis de cromatografía de gases (GC), HPLC o RMN.

En algunas modalidades, el producto final ((-)-Ambrox) se

aísala y se purifica hasta la homogeneidad (por ejemplo, 89% u 89.5% puro o 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99.5% puro).

De manera deseable, la cantidad de (-)-Ambrox producido
5 puede ser de aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 20.000 mg/L (20 g/L) o mayor, tal como de aproximadamente 20 g/L a aproximadamente 200 g/L o de 100-200 g/L, de preferencia aproximadamente 125 g/L o 150 g/L o aproximadamente 188 g/L.

Se pueden producir por lo menos 125 g/L de (-)-Ambrox en
10 una reacción de bioconversión usando una célula hospedera de *E. coli* recombinante que produce una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima durante aproximadamente 2 días. Es posible realizar bioconversiones a 188 g/L de EEH o más, siempre que se logre una mezcla eficiente, ya que la eficiencia
15 de la agitación puede ser la única limitación del sistema. Además, un biocatalizador con actividad mejorada (por ejemplo, en términos de variantes de SHC con actividad mejorada adicional o en términos de mayor producción de enzimas SHC) puede mejorar o mantener la productividad usando menos biomasa
20 o aumentando la concentración de sustrato, lo que es ventajoso con respecto a las eficiencias de mezcla. Por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/L, de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 mg/L, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/L, de
25 aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg/L, de

aproximadamente 100 a aproximadamente 1,000 mg/L, de
aproximadamente 250 a aproximadamente 5,000 mg/L,
aproximadamente 1,000 (1 g/L) a aproximadamente 15,000 mg/L
(15 g/L), o aproximadamente 2,000 (2 g/L) a aproximadamente
5 10,000 mg/L (10 g/L) o aproximadamente 2,000 (2 g/L) a
aproximadamente 25,000 mg/L (25 g/L) o aproximadamente 2,000
(2 g/L) a aproximadamente 25,000 mg/L (25 g/L), 26,000 mg/L
(26 g/L), 27,000 mg/L (27 g/L), 28,000 mg/L (28 g/L), 29,000
mg/L (29 g/L), 30,000 mg/L (30 g/L), 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L,
10 70 g/L, 80 g /l, 90 g/L, 100 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 125 g/L,
130 g/L, 140 g/L, 150 g/L, 160 g/L, 170 g/L, 180 g/L, 190 g/L
o 200 g/L o 300 g/L o 400 g/L o 500 g/L de (-)-Ambrox.

De preferencia, se produce (-)-Ambrox a una concentración
de por lo menos 100 g/L en un período de tiempo de 48 a 72
15 horas.

De preferencia, se produce (-)-Ambrox a una concentración
de aproximadamente 150 g/L en un período de tiempo de
aproximadamente 48 a 72 horas. De preferencia, se produce (-)-
Ambrox a una concentración de aproximadamente 200 g/L en un
20 período de tiempo de aproximadamente 48 a 72 horas.

De preferencia, se produce (-)-Ambrox a una concentración
de aproximadamente 250 g/L en un período de tiempo de
aproximadamente 48 a 72 horas.

La bioconversión de homofarnesol en (-)-Ambrox de acuerdo
25 con la presente descripción produce (-)-Ambrox como compuesto

predominante pero también puede producir compuestos distintos de (-)-Ambrox que pueden o no impartir notas olfativas agradables a la mezcla de bioconversión y así puede contribuir de manera positiva o negativa al carácter sensorial del producto final (-)-Ambrox. En consecuencia, se lleva a cabo un análisis sensorial usando pruebas sensoriales bien establecidas usadas por los experimentados capacitados (por ejemplo, perfumistas) para que las pruebas puedan ayudar a determinar si un producto químicamente relevante es también un producto final olfativamente relevante en relación con un producto de referencia. La eliminación de uno o más compuestos de subproductos de (-)-Ambrox puede mejorar el olor de la mezcla de productos de reacción que comprende (-)-Ambrox incluso si los compuestos eliminados son en realidad compuestos inodoros *per se*. Es decir, se puede observar un aumento del olor de (-)-Ambrox en ausencia de los compuestos II, III y IV.

Varias aplicaciones para (-)-Ambrox incluyen, entre otras, una fragancia fina o un producto de consumo como el cuidado de telas, artículos de tocador, cuidado de la belleza y productos de limpieza, productos detergentes y productos de jabón, incluidos esencialmente todos los productos en donde los ingredientes de Ambrox actualmente disponibles se usan comercialmente, que incluyen, pero no se limitan a: Ambrox (Firmenich), Ambroxan (Henkel), Ambrofix (Givaudan), Amberlyn (Quest), CetaloX Laevo (Firmenich), Ambermor (Aromor) y

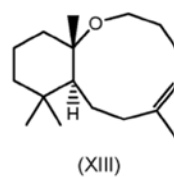
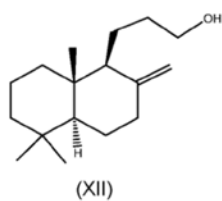
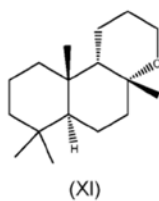
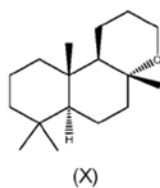
Norambrenolide Ether (Pacific).

De esta manera, en la presente también se proporciona un uso de (-)-Ambrox obtenido u obtenible mediante un proceso descrito en la presente como parte de una fragancia o un cosmético o un producto de consumo. También se proporciona en la presente un producto que comprende (-)-Ambrox obtenido u obtenible mediante un proceso descrito en la presente. El producto puede ser, por ejemplo, una fragancia o un cosmético o un producto de consumo.

10 ÓXIDO DE AMBRA Y SUS USOS

Además, se proporcionan en la presente los productos de reacción elaborados mediante los procesos descritos en la presente. Los productos de reacción pueden comprender, por ejemplo, consistir esencialmente de óxido de Ambra y uno o más compuestos adicionales, por ejemplo, uno o más de un compuesto de la fórmula (XI), un compuesto de la fórmula (XII) y un compuesto de la fórmula (XIII).

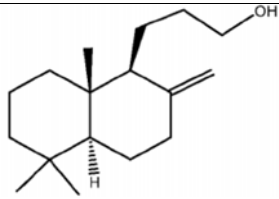
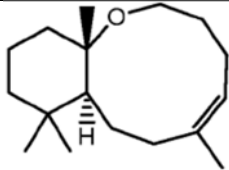
Como se usa en la presente, el término "óxido de Ambra" incluye óxido de Ambra de la fórmula (X) a continuación, así como óxido de Ambra de la fórmula (X) en forma isoméricamente pura o en una mezcla con una o más de las siguientes moléculas de la fórmula (XI), (XII) y/o (XIII),



La nomenclatura de los productos de reacción de las fórmulas (X), (XI), (XII) y (XIII) se establece a continuación.

Tabla 3. Nomenclatura para los productos de reacción de las fórmulas (X), (XI), (XII) y (XIII).

Compuesto	Nombre y Estructura
(X)	(4aR,6aS,10aS,10bR)-4a,7,7,10a-tetrametildodecahidro-1H-benzo[f]cromen] (Óxido de Ambra)
(XI)	[(4aR,6aS,10aS,10bS)-4a,7,7,10a-tetrametildodecahidro-1H-benzo[f]cromeno]

5	(XII)  [3-((1S,4aS,8aS)-5,5,8a-trimetil-2-metilendecahidronaftalen-1-il)propan-1-ol]
10	(XIII)  [(8aS,12aS,Z)-6,9,9,12a-tetrametil-3,4,7,8,8a,9,10,11,12,12a-decahidro-2H-benzo[b]oxecina]

El óxido de Ambra se puede producir a partir de (+)-Larixol como se describe en Bolster *et al.*, Tetrahedron, 2002, 58(26), páginas 5275-5285. Sin embargo, es deseable proporcionar métodos alternativos o mejorados para producir óxido de Ambra.

Los procesos descritos en la presente pueden producir óxido de Ambra de la fórmula (X) solo o en una mezcla con subproductos, tal como el compuesto que se muestra en las fórmulas (XI), (XII) y/o (XIII). Por ejemplo, se pueden preparar otros estereoisómeros de la fórmula (X) mediante los procesos descritos en la presente.

Por lo tanto, se proporciona en la presente un compuesto de la fórmula (X) o una composición que comprende un compuesto de la fórmula (X) obtenido u obtenible mediante los procesos

descritos en la presente, incluyendo todas sus modalidades.

En determinadas modalidades, no todo el bishomofarnesol (por ejemplo, BisEEH) se convierte en óxido de Ambra o en un subproducto de la reacción. Por lo tanto, las composiciones
5 descritas en la presente, por ejemplo, las composiciones obtenidas mediante los procesos descritos en la presente, pueden comprender bishomofarnesol (por ejemplo, bisEEH, por ejemplo, además del compuesto de la fórmula (X) y/o compuestos de la fórmula (XI), (XII) y/o (XIII)). Cualquier homofarnesol
10 restante se puede separar de los otros productos de reacción, de modo que el producto de óxido de Ambra no contenga bishomofarnesol. En otras modalidades, todo el material de partida de bishomofarnesol se convierte en óxido de Ambra de la fórmula (X) o en un subproducto de la reacción mediante los
15 procesos descritos en la presente.

Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente pueden comprender, consistir esencialmente de uno o más de un compuesto de la fórmula (X), un compuesto de la fórmula (XI), un compuesto de la fórmula (XII), un compuesto de la fórmula
20 (XIII), un material de partida de bishomofarnesol (por ejemplo, bisEEH) y otros estereoisómeros del compuesto de la fórmula (X). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender, consistir esencialmente de un compuesto de la fórmula (X) y uno o más de un compuesto de la fórmula (XI),
25 un compuesto de la fórmula (XII) y un compuesto de la fórmula

(XIII).

Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente pueden comprender igual o mayor que aproximadamente igual o mayor que aproximadamente 50% en peso del compuesto de la fórmula (X) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (X), el compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender igual o superior a 55% en peso o igual o superior a 60% en peso o igual o superior a 65% en peso o igual o superior a 70% en peso o igual o superior a 75% en peso o igual o superior a 80% en peso o igual o superior a 85% en peso o igual o superior a 90% en peso o igual o superior a 95% en peso del compuesto de la fórmula (X) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (X), el compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII). Las composiciones descritas en la presente pueden, por ejemplo, comprender igual o menos de 100% en peso del compuesto de la fórmula (X) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (X), el compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII). Por ejemplo, la mezcla puede comprender igual o menos de 99% en peso o igual o menos de 98% en peso o igual o menos de 97% en peso del compuesto de la fórmula (X) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (X), el compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula

(XII) y el compuesto de la fórmula (XIII). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender de aproximadamente 50% en peso a aproximadamente 100% en peso o de aproximadamente 60% en peso a aproximadamente 99% en peso o de aproximadamente 70% en peso a aproximadamente 98% en peso o de aproximadamente 80% en peso a aproximadamente 97% en peso, o de aproximadamente 90% en peso a aproximadamente 97% en peso del compuesto de la fórmula (X) basado en el peso total del compuesto de la fórmula (X), el compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII).

La relación en peso del compuesto de la fórmula (X) al peso total del compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII) en las composiciones descritas en la presente puede, por ejemplo, variar de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 99:1. Por ejemplo, la relación en peso del compuesto de la fórmula (X) al peso total del compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII) puede oscilar entre aproximadamente 65:35 y 99:1 o de 70:30 a 99:1 o de 75:25 a 99:1 o de 80:20 a 99:1 o de 85:15 a 99:1 o de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 99:1 o de aproximadamente 95:5 a aproximadamente 99:1.

Por ejemplo, la relación en peso del compuesto de la fórmula (X) al peso total del compuesto de la fórmula (XI), el

compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII) puede oscilar entre aproximadamente 65:35 y aproximadamente 98:2 o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 97:3 o de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 96:4 o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 95:5 o de aproximadamente 85:15 a aproximadamente 90:10.

La relación en peso del compuesto de la fórmula (X) a bishomofarnesol (por ejemplo, bisEEH) en las composiciones descritas en la presente puede, por ejemplo, oscilar entre aproximadamente 90:10 y aproximadamente 100:0. Por ejemplo, la proporción en peso del compuesto de la fórmula (X) a bishomofarnesol (por ejemplo, bisEEH) en las composiciones descritas en la presente puede oscilar entre 92:8 y 100:0 o entre 94:6 y 100:0 o entre de 95:5 a 100:0 o de 96:4 a 99.5:0.5 o de 97:3 a 99.0:1.0 o de 98:2 a 99.0:1.0.

La cantidad del compuesto de la fórmula (X), el compuesto de la fórmula (XI), el compuesto de la fórmula (XII) y el compuesto de la fórmula (XIII) en una mezcla de estereoisómeros puede, por ejemplo, cuantificarse mediante cromatografía de gases e/o identificarse por espectroscopia de RMN.

El óxido de Ambra sintetizado mediante los procesos descritos en la presente (por ejemplo, usando enzimas SHC/HAC o variantes de las mismas y, opcionalmente, células hospederas recombinantes) puede, por ejemplo, estar en forma amorfa o en

forma cristalina.

El óxido de Ambra producido por los métodos descritos en la presente (por ejemplo, usando enzimas SHC/HAC o variantes de las mismas y células hospederas recombinantes) puede
5 aislarse mediante extracción/destilación con vapor o extracción con solventes orgánicos usando un solvente no miscible en agua (para separar los productos de reacción y sustrato sin reaccionar del biocatalizador que permanece en la fase acuosa) seguido de la posterior evaporación del solvente
10 para obtener un producto de reacción crudo como se determina por análisis de cromatografía de gases (GC). Los métodos de extracción/destilación con vapor y extracción con solventes orgánicos son conocidos por los experimentados en la técnica.

A manera de ejemplo, el óxido de Ambra resultante se puede
15 extraer de la mezcla de reacción completa usando un solvente orgánico, tal como un solvente no miscible en agua (por ejemplo, tolueno). Alternativamente, el óxido de Ambra resultante se puede extraer de la fase sólida de la mezcla de reacción (obtenida, por ejemplo, por centrifugación o
20 filtración) usando un solvente miscible con agua (por ejemplo, etanol) o un solvente no miscible con agua (por ejemplo, tolueno). A modo de ejemplo adicional, el óxido de Ambra está presente en la fase sólida como cristales o en forma amorfa y puede separarse de la fase sólida restante (material celular o
25 restos del mismo) y la fase líquida también por medio de

filtración.

A modo de ejemplo adicional, a una temperatura por encima del punto de fusión del óxido de Ambra, el óxido de Ambra puede formar una capa de aceite encima de la fase acuosa, la capa de
5 aceite que puede eliminarse y colectarse. Para asegurar una recuperación completa del óxido de Ambra después de eliminar la capa de aceite, se puede agregar un solvente orgánico a la fase acuosa que contiene la biomasa para extraer cualquier
10 óxido de Ambra residual contenido en, sobre o encima de la biomasa. La capa orgánica se puede combinar con la capa de aceite, antes de que el conjunto se procese más para aislar y purificar el óxido de Ambra. El óxido de Ambra se puede
15 cristalizar adicionalmente de forma selectiva para eliminar los subproductos (XI), (XII) y (XIII) y cualquier sustrato de bishomofarnesol sin reaccionar del producto de óxido de Ambra final. El término "cristalización selectiva" se refiere a una
etapa del proceso en el que se hace que el óxido de Ambra cristalice a partir de un solvente mientras que los compuestos (XI), (XII) y (XIII) permanecen disueltos en el solvente que
20 cristaliza hasta tal punto que el material cristalino aislado contiene solo el producto de óxido de Ambra, o si contiene cualquiera de los otros compuestos (X), (XII) o (XIII), entonces están presentes solo en cantidades aceptables desde el punto de vista olfativo. El óxido de Ambra puede, por
25 ejemplo, estar libre o sustancialmente libre de subproductos

(XI), (XII) y (XIII). La etapa de cristalización selectiva puede usar un solvente miscible en agua, tal como etanol o similar. La cristalización selectiva del óxido de Ambra puede estar influida por la presencia de sustrato de homofarnesol sin reaccionar y también por la proporción de óxido de Ambra con respecto a los demás subproductos detectables (XI), (XII) y/o (XIII). Incluso si solo se obtiene una conversión de 10% del sustrato de homofarnesol en óxido de Ambra, todavía es posible la cristalización selectiva de óxido de Ambra.

La pureza olfativa del producto final de óxido de Ambra puede determinarse usando un extracto de etanol al 10% en agua o probando el material cristalino. El producto final de óxido de Ambra se prueba contra una referencia comercialmente disponible del producto de óxido de Ambra para su pureza olfativa, calidad y perfil sensorial. El material de óxido de Ambra también se prueba en estudios de aplicación realizados por experimentados para determinar si el material cumple con las especificaciones con respecto a su perfil organoléptico.

Ejemplos de solventes orgánicos miscibles en agua y no miscibles en agua adecuados para el uso en la extracción y/o cristalización selectiva de óxido de Ambra incluyen, pero no se limitan a hidrocarburos alifáticos, de preferencia aquellos que tienen de 5 a 8 átomos de carbono, tales como pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, heptano, octano o ciclooctano, alifáticos halogenados hidrocarburos, de

preferencia los que tienen uno o dos átomos de carbono, tales como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloroetano o tetracloroetano, hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno, los xilenos, clorobenceno o 5 diclorobenceno, éteres o alcoholes alifáticos acíclicos y cíclicos, de preferencia aquellos que tienen de 4 a 8 átomos de carbono, tal como etanol, isopropanol, éter dietílico, metil terc-butil éter, etil terc-butil éter, éter dipropílico, éter diisopropílico, éter dibutílico, tetrahidrofurano o ésteres, 10 tal como acetato de etilo o acetato de n-butilo o cetonas, tales como metil isobutil cetona o dioxano o mezclas de estos. Los solventes que se usan con especial preferencia son el heptano mencionado anteriormente, metil terc-butil éter (también conocido como MTBE, terc-butil metil éter, terc-butil 15 metil éter y tBME), diisopropil éter, tetrahidrofurano, acetato de etilo y/o mezclas de los mismos. De preferencia, se usa un solvente miscible en agua, tal como etanol para la extracción de óxido de Ambra de la fase sólida de la mezcla de reacción. El uso de etanol es ventajoso porque es fácil de manejar, no 20 es tóxico y es amigable con el medio ambiente.

El término "aislado", como se usa en la presente, se refiere a un producto de bioconversión como el óxido de Ambra que se ha separado o purificado de los componentes que lo acompañan. Una entidad que se produce en un sistema celular 25 diferente de la fuente de la que naturalmente se origina está

"aislada", porque necesariamente estará libre de los componentes que la acompañan naturalmente. El grado de aislamiento o pureza se puede medir por cualquier método apropiado, por ejemplo, análisis de cromatografía de gases (GC), HPLC o RMN. En algunas modalidades, el producto final (óxido de Ambra) se aísla y se purifica hasta la homogeneidad (por ejemplo, por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% u 89.5% puro o 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99.5% puro).

10 Deseablemente, la cantidad de óxido de Ambra producido puede ser de aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 20,000 mg/L (20 g/L) o superior, tal como de aproximadamente 20 g/L a aproximadamente 200 g/L o de 100-200 g/L, de preferencia de aproximadamente 125 g/L o 150 g/L o aproximadamente 188 g/L.

15 Por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/L, de aproximadamente 30 a aproximadamente 100 mg/L, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/L, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg/L, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1,000 mg/L, de
20 aproximadamente 250 a aproximadamente 5,000 mg/L, aproximadamente 1,000 (1 g/L) a aproximadamente 15,000 mg/L (15 g/L), o aproximadamente 2,000 (2 g/L) a aproximadamente 10,000 mg/L (10 g/L) o aproximadamente 2,000 (2 g/L) a aproximadamente 25,000 mg/L (25 g/L) o aproximadamente 2,000
25 (2 g/L) a aproximadamente 25,000 mg/L (25 g/L), 26,000 mg/L

(26 g/L), 27,000 mg/L (27 g/L), 28,000 mg/L (28 g/L), 29,000 mg/L (29 g/L), 30,000 mg/L (30 g/L), 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L, 90 g/L, 100 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 125 g/L, 130 g/L, 140 g/L, 150 g/L, 160 g/L, 170 g/L, 180 g/L, 190 g/L o se producen 200 g/L o 300 g/L o 400 g/L o 500 g/L de óxido de Ambra. De preferencia, el óxido de Ambra a una concentración de por lo menos 100 g/L se produce en un período de tiempo de 48 a 72 horas.

De preferencia, el óxido de Ambra a una concentración de aproximadamente 150 g/L se produce en un período de tiempo de aproximadamente 48 a 72 horas. De preferencia, el óxido de Ambra a una concentración de aproximadamente 200 g/L se produce en un período de tiempo de aproximadamente 48 a 72 horas.

De preferencia, el óxido de Ambra a una concentración de aproximadamente 250 g/L se produce en un período de tiempo de aproximadamente 48 a 72 horas.

La bioconversión de bishomofarnesol en óxido de Ambra de acuerdo con la presente descripción produce óxido de Ambra como compuesto predominante, pero también puede producir compuestos distintos del óxido de Ambra que pueden o no impartir notas olfativas agradables a la mezcla de bioconversión y, por lo tanto, pueden contribuir de forma positiva o negativa al carácter sensorial del producto final de óxido de Ambra. En consecuencia, se lleva a cabo un análisis sensorial usando pruebas sensoriales bien

establecidas usadas por experimentados capacitados (por ejemplo, perfumistas) para que la prueba pueda ayudar a determinar si un producto químicamente relevante es también un producto final olfativamente relevante en relación con un producto de referencia. La remoción de uno o más compuestos derivados del óxido de Ambra puede mejorar el olor del compuesto restante (óxido de Ambra) incluso si los compuestos eliminados son en realidad compuestos inodoros *per se*. Es decir, se puede observar un aumento del olor del óxido de Ambra en ausencia de los compuestos XI, XII y XIII.

Las diversas aplicaciones del óxido de Ambra incluyen, entre otras, una fragancia fina o un producto de consumo, tal como cuidado de telas, artículos de tocador, productos de limpieza y cuidado de la belleza, productos detergentes y productos de jabón, incluidos esencialmente todos los productos en los que los ingredientes de óxido de Ambra actualmente disponibles se usan comercialmente.

Por lo tanto, se proporciona además en la presente un uso de óxido de Ambra obtenido u obtenible mediante un proceso descrito en la presente como parte de una fragancia o un cosmético o un producto de consumo. También se proporciona en la presente un producto que comprende óxido de Ambra obtenido u obtenible mediante un proceso descrito en la presente. El producto puede ser, por ejemplo, una fragancia o un cosmético o un producto de consumo.

COMPOSICIONES DE FRAGANCIA

Además, se proporciona en la presente el uso de los compuestos y composiciones descritos en la presente como o en una composición de fragancia.

5 Por lo tanto, también se proporciona en la presente una composición de fragancia que comprende uno o más compuestos de la fórmula (I) o (X). Una "composición de fragancia" puede ser, por ejemplo, cualquier composición que comprenda uno o más compuestos de la fórmula (I) o (X) y un material base.

10 Como se usa en la presente, el "material base" incluye todos los ingredientes de fragancia conocidos seleccionados de la amplia gama de productos naturales y moléculas sintéticas actualmente disponibles, tal como aceites esenciales, alcoholes, aldehídos y cetonas, éteres y acetales, ésteres y
15 lactonas, macrociclos y heterociclos, y/o mezclado con uno o más ingredientes o excipientes usados convencionalmente junto con odorantes en composiciones de fragancias, por ejemplo, materiales portadores, diluyentes y otros agentes auxiliares comúnmente usados en la técnica.

20 Los ingredientes de fragancia conocidos en la técnica están fácilmente disponibles comercialmente de los principales fabricantes de fragancias. Los ejemplos no limitantes de tales ingredientes incluyen:

 - aceites esenciales y extractos, por ejemplo, castóreo,
25 aceite de raíz de costus, absoluto de musgo de roble, aceite

de geranio, absoluto de musgo de árbol, aceite de albahaca, aceites de frutas, tal como aceite de bergamota y aceite de mandarina, aceite de mirto, aceite de palmarrosa, aceite de pachulí, aceite de pepitas, aceite de jazmín, aceite de rosa,
 5 aceite de sándalo, aceite de ajeno, aceite de lavanda y/o aceite de ylang-ylang;

- alcoholes, por ejemplo, alcohol cinámico ((E)-3-fenilprop-2-en-1-ol); cis-3-hexenol ((Z)-hex-3-en-1-ol); citronelol (3,7-dimetiloct-6-en-1-ol); dihidromircenol (2,6-
 10 dimetiloct-7-en-2-ol); Ebanol™ ((E)-3-metil-5-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pent-4-en-2-ol); eugenol (4-alil-2-metoxifenol); etil linalol ((E)-3,7-dimetilnona-1,6-dien-3-ol); farnesol ((2E,6Z)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-ol); geraniol ((E)-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol); Super
 15 Muguet™ ((E)-6-etil-3-metiloct-6-en-1-ol); linalool (3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol); mentol (2-isopropil-5-metilciclohexanol); Nerol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol); alcohol fenil etílico (2-feniletanol); Rhodinol™ (3,7-dimetiloct-6-en-1-ol); Sandalore™ (3-metil-5-(2,2,3-
 20 trimetilciclopent-3-en-1-il)pentan-2-ol); terpineol (2-(4-metilciclohex-3-en-1-il)propan-2-ol); o Timberol™ (1-(2,2,6-trimetilciclohexil)hexan-3-ol); 2,4,7-trimetilocta-2,6-dien-1-ol y/o [1-metil-2(5-metilhex-4-en-2-il)ciclopropil]-metanol;

25 - aldehídos y cetonas, por ejemplo, anisaldehído (4-

- metoxibenzaldehído); aldehído alfa amil cinámico (2-bencilidenoheptanal); Georgywood™ (1-(1,2,8,8-tetrametil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidronaftalen-2-il)etanona); hidroxicitronelal (7-hidroxi-3,7-dimetiloctanal); Iso E Super® (1-(2,3,8,8-tetrametil-1,2,3,4,5,6,7,8-octahidronaftalen-2-il)etanona); Isoraldeine® ((E)-3-metil-4-(2,6,6-trimetilciclohex-2-en-1-il)but-3-en-2-ona); 3-(4-isobutil-2-metilfenil)propanal; maltol; metil cedril cetona; metilionona; verbenona; y/o vainillina;
- 10 - éter y acetales, por ejemplo, Ambrox® (3a,6,6,9a-tetrametil-2,4,5,5a,7,8,9,9b-octahidro-1H-benzo[e][1]benzofurano); geranil metil éter ((2E)-1-metoxi-3,7-dimetilocta-2,6-dieno); óxido de rosa (4-metil-2-(2-metilprop-1-en-1-il)tetrahidro-2H-pirano); y/o Spirambrene® (2',2',3,7,7-pentametilespiro[biciclo[4.1.0]heptano-2,5'-[1,3]dioxano]);
- 15 - macrociclos, por ejemplo, Amrettolide ((Z)-oxacicloheptadec-10-en-2-ona); brasilato de etileno (1,4-dioxacicloheptadecan-5,17-diona); y/o Exaltolide® (16-oxaciclohexadecan-1-ona); y
- 20 - heterociclos, por ejemplo, isobutilquinolina (2-isobutilquinolina).

Tal como se usa en la presente, "material portador" significa un material que es prácticamente neutro desde el punto de vista del olor, es decir, un material que no altera

25

significativamente las propiedades organolépticas de los olores.

Por "diluyentes" se entiende cualquier diluyente usado convencionalmente junto con odorantes, como ftalato de dietilo (DEP), dipropilenglicol (DPG), miristato de isopropilo (IPM),
5 citrato de trietilo (TEC) y alcohol (por ejemplo, etanol).

El término "agente auxiliar" se refiere a los ingredientes que pueden emplearse en una composición de fragancia por razones no relacionadas específicamente con el desempeño
10 olfativo de tal composición. Por ejemplo, un agente auxiliar puede ser un ingrediente que actúa como auxiliar para procesar un ingrediente o ingredientes de fragancia, o una composición que contenga tal(es) ingrediente(s), o puede mejorar la manipulación o almacenamiento de un ingrediente de fragancia o
15 composición que lo contenga, tal como adyuvante antioxidante. Tal antioxidante puede seleccionarse, por ejemplo, de Tinogard® TT (BASF), Tinogard® Q (BASF), Tocoferol (incluyendo sus isómeros, CAS 59-02-9; 364-49-8; 18920-62-2; 121854-78-2), 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT, CAS 128-37-0) y
20 fenoles relacionados, hidroquinonas (CAS 121-31-9).

También podría ser un ingrediente que proporciona beneficios adicionales, tal como impartir color o textura. También podría ser un ingrediente que confiera resistencia a la luz o estabilidad química a uno o más ingredientes
25 contenidos en una composición de fragancia.

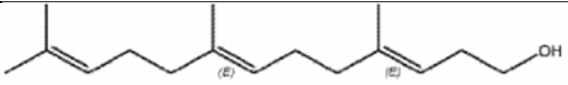
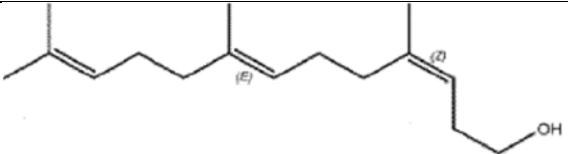
Una descripción detallada de la naturaleza y tipo de agente auxiliar comúnmente usado en las composiciones de fragancia que lo contienen no puede ser exhaustiva, pero debe mencionarse que tales ingredientes son bien conocidos por un experimentado en la técnica.

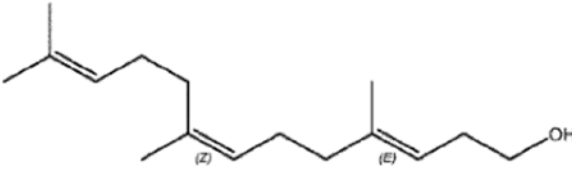
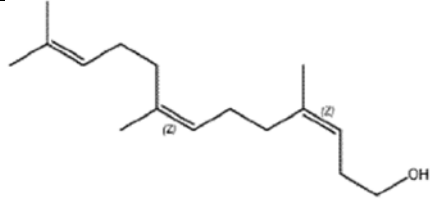
También se proporciona en la presente un producto de consumo que comprende un compuesto o una composición o una composición de fragancia como se describe en la presente, incluyendo cualquier modalidad del mismo. El producto de consumo puede ser, por ejemplo, un producto cosmético (por ejemplo, agua de perfume o agua de tocador), un producto de limpieza, un producto detergente o un producto de jabón.

HOMOFARNESOL

El homofarnesol puede tener isomerismo como se muestra a continuación.

Tabla 4. Isómeros de homofarnesol.

Compuesto	Abreviación	Nombre y Estructura
E, E- homofarnesol	EEH	 (3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-ol
E, Z- homofarnesol	EZH	 (3Z,7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-ol

Z, E- homofarnesol	ZEH	 (3E,7Z)-4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trien-1-ol
Z, Z- homofarnesol	ZZH	 (3Z,7Z)-4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trien-1-ol

El beta-farneseno se puede convertir directamente en E,E-homofarnesol (EEH) o indirectamente en EEH a través de E,E-homofarnesato que luego se convierte en EEH. Se puede encontrar una descripción general de la producción de (-)-Ambrox a partir de diferentes sustratos en US2012/0135477A1, WO 2010/139719, US2013.0273619A1, WO 2013/156398A1 y la tesis doctoral de Seitz (2012 como se citó anteriormente) y Schaefer 2011 (Chemie Unserer Zeit 45, 374-388), cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia.

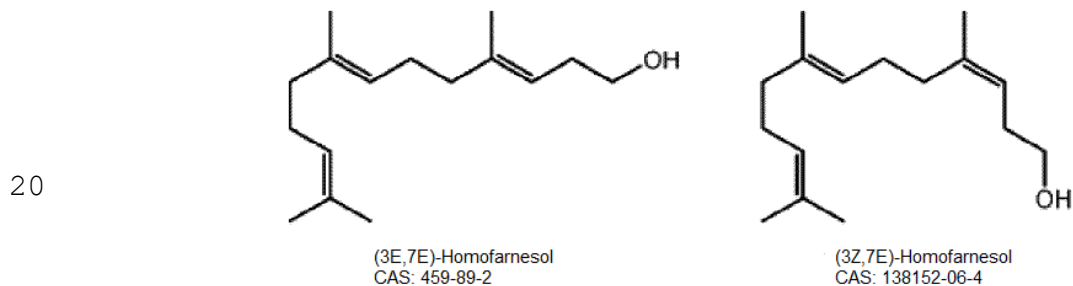
US2012/0135477A1 reporta sobre la conversión de (3Z,7E) a (-)-Ambrox usando ZmoSHC, pero de acuerdo con la descripción en Schaefer (2011) (como se citó anteriormente), (7E,3Z) solo se convierte en 9b-epi- Ambrox (es decir, el compuesto (III) como se describe anteriormente) y no a (-)-Ambrox. Como se usa en la presente, una referencia a (3Z,7E) homofarnesol es una

referencia a E,Z-homofarnesol que también se designa como EZH.

Si bien el homofarnesol puede ser una mezcla de cuatro isómeros, los isómeros (3Z,7Z), (3E,7Z), (3Z,7E) y (3E,7E), parece de la literatura que (-)-Ambrox solo se obtiene de (3E,7E) homofarnesol (ver Neumann and Simon (1986) citado
5 anteriormente). Como se usa en la presente, una referencia a (3E,7E)-homofarnesol es una referencia a E,E-homofarnesol que también se designa como EEH.

Los materiales de partida para los procesos descritos en la presente para preparar (-)-Ambrox pueden ser, por ejemplo,
10 (3E,7E)-homofarnesol o una mezcla que comprende (3E,7E)-homofarnesol, por ejemplo, una mezcla de isómeros de homofarnesol que comprende (3E,7E)-homofarnesol.

De preferencia, el material de partida de homofarnesol
15 comprende una mezcla de (3E,7E) y (3Z,7E), denominada en la presente una mezcla isomérica EE:EZ. Una mezcla isomérica EE:EZ de homofarnesol tiene el número CAS de 35826-67-6.



Mezcla E/Z CAS: 35826-67-6

La materia prima/material de partida de homofarnesol puede ser una mezcla de isómeros. Por consiguiente, el material de
25 partida de homofarnesol también puede comprender una mezcla de

los cuatro isómeros EE:EZ:ZZ:ZE que corresponde con (3E,7E), (3Z,7E), (3Z,7Z) y (3E,7Z). De preferencia, el material de partida de homofarnesol se selecciona de uno o más de la siguiente mezcla: [(3Z,7Z), (3E,7Z), (3Z,7E) y (3E,7E)],
 5 [(3Z,7E) y (3E,7E)], [(3Z,7E), (3E,7Z)] y/o [(3E,7E) y (3E,7Z)].

De preferencia, el material de partida de homofarnesol se selecciona de una o más de las siguientes mezclas: [(3E,7E), (3Z,7E)] y/o [(3Z,7E), (3E,7E) y (3E,7Z)], también designados
 10 [EE:EZ] y [EE:EZ:ZE] respectivamente.

En consecuencia, en algunas modalidades, la relación de EEH:EZH es de aproximadamente 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;
 15 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; 60:40; 59:41; 58:42; 57:43; 56:44; 55:45; 54:46; 53:47; 52:48; 51:49; o aproximadamente 50:50. Por ejemplo, la relación de EEH:EZH puede variar de 50:50 a 100:00 o de 50:50 a 99:01 o de
 20 60:40 a 99:1 o de 70:30 a aproximadamente 95:5 o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 95:5.

En algunas modalidades, de preferencia, el material de partida de homofarnesol comprende >90% de E,E-homofarnesol (EEH).

25 En otras modalidades, el material de partida homofarnesol

comprende una relación en peso EE:EZ de 86:14.

En algunas modalidades, el material de partida de homofarnesol comprende una relación en peso EE:EZ de 80:20.

En determinadas modalidades, el material de partida de homofarnesol comprende una relación en peso EE:EZ de 70:30.

En modalidades adicionales, el material de partida de homofarnesol comprende una relación en peso EE:EZ de 69:31.

El número de isómeros de homofarnesol presentes puede influir en la velocidad de la reacción. Una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima puede ser capaz de convertir E,E-homofarnesol en (-)-Ambrox a partir de una mezcla compleja de isómeros de homofarnesol (por ejemplo, EE:EZ:ZE:ZZ). Sin embargo, se puede observar una tasa de conversión más baja, lo que es consistente con la opinión de que los isómeros de homofarnesol distintos de EEH pueden competir con EEH por el acceso a las enzimas derivadas de SHC/HAC y, por lo tanto, pueden actuar como inhibidores competitivos para la conversión de EEH a (-)-Ambrox y/o también actúan como sustratos alternativos (ver, por ejemplo, Eichhorn *et al.*, (2018) Adv. Synth. Catal. 360: 2339-2351, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia). Por consiguiente, el sustrato de homofarnesol puede comprender una mezcla isomérica de 2 a 4 isómeros, de preferencia dos isómeros.

Por consiguiente, el sustrato de homofarnesol puede consistir o consistir esencialmente de una mezcla isomérica de

2-4 isómeros, de preferencia dos isómeros.

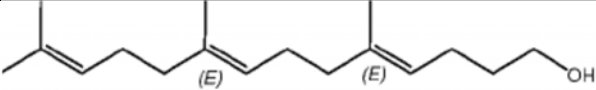
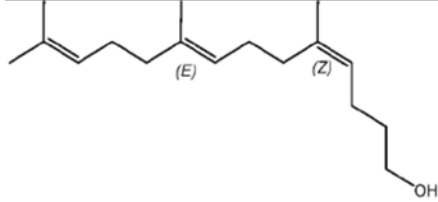
De preferencia, el sustrato de homofarnesol comprende una mezcla de isómeros EE:EZ. De preferencia, el sustrato de homofarnesol consiste o consiste esencialmente de una mezcla de isómeros EE:EZ.

Si, por ejemplo, se usa una mezcla de isómeros EE:EZ, entonces los compuestos (por ejemplo, los compuestos II, III y IV como se establece en la Tabla 2) distintos del (-)-Ambrox están en una forma "aceitosa" (en lugar de una forma sólida) que facilita la agitación de la mezcla de reacción y el proceso de bioconversión resultante.

BISHOMOFARNESOL

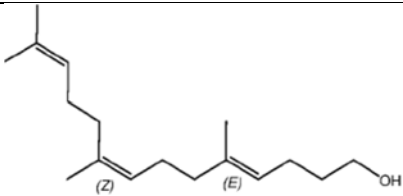
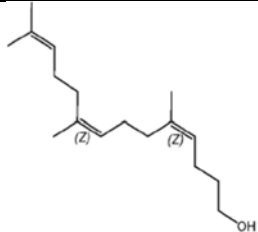
El bishomofarnesol puede tener isomerismo como se muestra en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Isómeros de bishomofarnesol.

Compuesto	Abreviación	Nombre y Estructura
E,E- bishomofarnesol	BisEEH	 (4E,8E)-5,9,13-trimetiltrideca-4,8,12- trien-1-ol
E,Z- bishomofarnesol	BisEZH	 (4Z,8E)-5,9,13-trimetiltrideca-4,8,12-

5

10

		trien-1-ol
Z,E- bishomofarnesol	BisZEH	 (4E,8Z)-5,9,13-trimetiltrideca-4,8,12- trien-1-ol
Z,Z- bishomofarnesol	BisZZH	 (4Z,8Z)-5,9,13-trimetiltrideca-4,8,12- trien-1-ol

15

20

El bishomofarnesol se puede producir a partir de E-Nerolidol como se describe en los ejemplos siguientes. Por ejemplo, el bishomofarnesol se puede producir como una mezcla de dos o más isómeros (por ejemplo, una mezcla de E,E-bishomofarnesol y E,Z-bishomofarnesol). Si bien el bishomofarnesol puede presentarse como una mezcla de cuatro isómeros (los isómeros (Z,Z), (E,Z), (Z,E) y (E,E)), parece que el óxido de Ambra solo se obtiene a partir de E,E-bishomofarnesol.

25

Los materiales de partida para los procesos descritos en la presente para preparar óxido de Ambra pueden ser, por ejemplo, E,E-bishomofarnesol o una mezcla que comprende E,E-bishomofarnesol, por ejemplo, una mezcla de isómeros de

bishomofarnesol que comprende E,E-bishomofarnesol.

De preferencia, el material de partida de bishomofarnesol comprende una mezcla de (BisEEH) y (BisEZH), denominada en la presente una mezcla isomérica EE:EZ.

5 El material de partida/materia prima de bishomofarnesol puede ser una mezcla de isómeros. Por consiguiente, el material de partida de bishomofarnesol también puede comprender una mezcla de los cuatro isómeros EE:EZ:ZZ:ZE.

En consecuencia, en algunas modalidades, la relación de
10 BisEEH:BisEZH es de aproximadamente 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;
15 61:39; 60:40; 59:41; 58:42; 57:43; 56:44; 55:45; 54:46; 53:47; 52:48; 51:49; o aproximadamente 50:50. Por ejemplo, la relación de BisEEH:BisEZH puede variar de 50:50 a 100:00 o de 50:50 a 99:01 o de 60:40 a 99:1 o de 70:30 a aproximadamente 95:5 o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 95:5. En algunas
20 modalidades, de preferencia, el material de partida de bishomofarnesol comprende >90% de E,E-bishomofarnesol (EEH).

En otras modalidades, el material de partida de bishomofarnesol comprende una relación en peso BisEEH:BisEZH de 86:14. En algunas modalidades, el material de partida de
25 bishomofarnesol comprende una relación en peso de BisEEH:BisEZH

de 80:20.

En algunas modalidades, el material de partida de bishomofarnesol comprende una relación en peso de BisEEH:BisEZH de 70:30.

5 En modalidades adicionales, el material de partida de bishomofarnesol comprende una relación en peso de BisEEH:BisEZH de 69:31.

El número de isómeros de bishomofarnesol presentes puede influir en la velocidad de la reacción. Una enzima SHC/HAC o
10 una variante de la enzima puede ser capaz de convertir E,E-bishomofarnesol en óxido de Ambra a partir de una mezcla compleja de isómeros de bishomofarnesol (por ejemplo, EE:EZ:ZE:ZZ). Sin embargo, se puede observar una tasa de conversión más baja, lo que es coherente con la opinión de que
15 los isómeros de bishomofarnesol distintos de BisEEH pueden competir con BisEEH por el acceso a la enzima SHC/HAC o a la variante enzimática y, por lo tanto, pueden actuar como inhibidores competitivos para la conversión de BisEEH en óxido de Ambra y/o también actúan como sustratos alternativos. Por
20 consiguiente, el sustrato de bishomofarnesol puede comprender una mezcla isomérica de 2 a 4 isómeros, de preferencia dos isómeros.

Por consiguiente, el sustrato de bishomofarnesol puede consistir o consistir esencialmente de una mezcla isomérica de
25 2-4 isómeros, de preferencia dos isómeros.

De preferencia, el sustrato de bishomofarnesol comprende una mezcla de isómeros EE:EZ.

De preferencia, el sustrato de bishomofarnesol consiste o consiste esencialmente de una mezcla de isómeros EE:EZ.

5 ÁCIDOS NUCLEICOS Y MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Además, en la presente se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima SHC/HAC como se describe en la presente. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico aislado.

10 En particular, en la presente se proporciona una construcción que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima SHC/HAC o una variante de enzima como se describe en la presente. Como se usa en la presente, una "construcción" es un segmento de ácido nucleico creado
15 artificialmente que se va a transfectar en una célula blanco. La construcción puede comprender el ácido nucleico que codifica la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima y un controlador de la expresión (por ejemplo, un promotor).

Además, se proporciona en la presente un vector que
20 comprende una construcción como se describe en la presente. Como se usa en la presente, un "vector" es una molécula de ADN que se usa como vehículo para transportar artificialmente material genético extraño a una célula en donde se puede replicar y/o expresar. El vector puede ser, por ejemplo, un
25 plásmido, un vector viral, un cósmido o un cromosoma

artificial.

Los términos "construcción" y "vector" pueden superponerse, por ejemplo, cuando la construcción es un plásmido.

5 En particular, se proporciona en la presente un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, SEC ID NO.: 4, SEC ID NO.: 5, SEC ID NO.: 17, SEC ID NO.: 18, SEC ID NO.: 24, SEC ID NO.: 25, SEC ID NO.: 26 y SEC ID NO.: 27.

10 En particular, se proporciona en la presente un ácido nucleico que tiene la secuencia de la SEC ID NO.: 6, SEC ID NO.: 7, SEC ID NO.: 8, SEC ID NO.: 9, SEC ID NO.: 22 y la SEC ID NO.: 23 que puede, por ejemplo, estar comprendido en una construcción o un vector como se describe en la presente.

15 El término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", tal como se usa en la presente, se referirá específicamente a los polinucleótidos de la descripción que pueden ser ADN, ADNc, ADN genómico, ADN sintético o ARN, y pueden ser de hebra doble o simple, la hebra sentido y/o
20 antisentido. El término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se aplicará en particular al(los) polinucleótido(s) tal como se usa en la presente, por ejemplo, como secuencia de nucleótidos de longitud completa o fragmentos o partes de los mismos, que codifican un polipéptido con actividad enzimática,
25 por ejemplo, una enzima de una vía metabólica, o fragmentos o

partes de la misma, respectivamente.

El término también incluye una molécula separada tal como un ADNc en donde el ADN genómico correspondiente tiene intrones y, por lo tanto, una secuencia diferente; un fragmento genómico
5 que carece de por lo menos uno de los genes laterales; un fragmento de ADNc o ADN genómico producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que carece de por lo menos uno de los genes flanqueantes; un fragmento de restricción que carece de por lo menos uno de los genes flanqueantes; un ADN
10 que codifica una proteína de origen no natural, como una proteína de fusión (por ejemplo, una etiqueta His), una muteína o un fragmento de una proteína dada; y un ácido nucleico que es una variante degenerada de un ADNc o un ácido nucleico natural. Además, incluye una secuencia de nucleótidos
15 recombinantes que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión no natural. Las proteínas de fusión pueden adicionar uno o más aminoácidos (tales como, entre otros, histidina (His)) a una proteína, generalmente en el extremo N-terminal de la proteína, pero
20 también en el extremo C-terminal o fusionados dentro de las regiones de la proteína. Tales proteínas de fusión o vectores de fusión que codifican tales proteínas normalmente cumplen tres propósitos: (i) aumentar la producción de proteínas recombinantes; (ii) aumentar la solubilidad de la proteína
25 recombinante; y (iii) ayudar en la purificación de la proteína

recombinante proporcionando un ligando para la purificación por afinidad.

El término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" también incluye secuencias de codones optimizados adecuadas para la expresión en una célula hospedera microbiana particular (por ejemplo, célula hospedera de *E. coli*). Como se usa en la presente, el término "codón optimizado" significa una secuencia codificante de proteína de ácido nucleico que se ha adaptado para la expresión en una célula hospedera procariota o eucariota, en particular células hospederas bacterianas, tales como células hospederas de *E. coli* por sustitución de uno o más o de preferencia, un número significativo de codones con codones que se usan más frecuentemente en genes de células hospederas bacterianas (por ejemplo, *E. coli*).

En este sentido, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de referencia (SEC ID NO.: 1 o SEC ID NO.: 10) y sus variantes/derivados pueden ser la original que se encuentra en la fuente (por ejemplo, SEC ID NO.: 1 que se encuentra en AacSHC) o el gen se puede optimizar por codones para los organismos hospederos seleccionados, tal como por ejemplo, *E. coli*.

Una molécula de ácido ribonucleico (ARN) se puede producir mediante transcripción *in vitro*. Los segmentos de moléculas de ADN también se consideran dentro del alcance de la descripción y pueden producirse, por ejemplo, mediante la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) o generarse mediante el tratamiento con una o más endonucleasas de restricción. Los segmentos de una molécula de ácido nucleico pueden denominarse fragmentos de ADN de un gen, en particular aquellos que son genes parciales. Un fragmento también puede contener varios marcos de lectura abiertos (ORF), ya sea repeticiones del mismo ORF o diferentes ORF. El término se referirá específicamente a secuencias de nucleótidos codificantes, pero también incluirá secuencias de nucleótidos que no sean codificantes, por ejemplo, secuencias no transcritas o no traducidas, o polipéptidos codificantes, en su totalidad o en parte. Los genes, tal como se usan en la presente, por ejemplo, para el ensamblaje, la diversificación o la recombinación pueden ser secuencias no codificantes o secuencias que codifican polipéptidos o secuencias que codifican proteínas o partes o fragmentos de las mismas que tienen suficiente longitud de secuencia para eventos de recombinación exitosos. Más específicamente, tales genes tienen una longitud mínima de 3 pb, de preferencia de por lo menos 100 pb, más preferentemente por lo menos 300 pb. Será evidente de lo anterior que una referencia a un ADN aislado no significa un ADN presente entre cientos o millones de otras moléculas de ADN dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o ADN genómico o digestiones de restricción de ADN genómico en, por ejemplo, una mezcla de reacción de digestión de restricción o una rebanada de gel

electroforético. Una molécula de ácido nucleico aislada de la presente descripción abarca segmentos que no se encuentran como tales en el estado natural.

Tal como se usa en la presente, el término "ADN aislado" puede hacer referencia a (1) un ADN que contiene una secuencia que no es idéntica a la de cualquier secuencia natural, un polinucleótido o ácido nucleico que no es natural (por ejemplo, está hecho mediante la combinación artificial (por ejemplo, manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética) de dos segmentos de secuencias separados por intervención humana) o (2), en el contexto de un ADN con una secuencia natural (por ejemplo, un ADNc o ADN genómico), un ADN libre de por lo menos uno de los genes que flanquean el gen que contiene el ADN de interés en el genoma del organismo en el que se encuentra naturalmente el gen que contiene el ADN de interés.

El término "ADN aislado", como se usa en la presente, específicamente con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos, también puede referirse a ácidos nucleicos o polinucleótidos producidos mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, una construcción de ADN que comprende un polinucleótido heterólogo para una célula hospedera, que opcionalmente se incorpora a la célula hospedera. Una secuencia de nucleótidos quimérica se puede

producir específicamente como una molécula recombinante. El término "recombinación" se aplicará específicamente al ensamblaje de polinucleótidos, uniendo tales polinucleótidos o partes de los mismos, con o sin recombinación para lograr un entrecruzamiento o un mosaico de genes. Por ejemplo, se realiza para unir segmentos de ácido nucleico de funciones deseadas para generar una combinación deseada de funciones. Un gen recombinante que codifica un polipéptido descrito en la presente puede incluir la secuencia codificante de tal polipéptido, unida operativamente, en orientación con sentido, a una o más regiones reguladoras adecuadas para expresar el polipéptido. Debido a que muchos microorganismos son capaces de expresar múltiples productos génicos a partir de un ARNm policistrónico, si se desea, se pueden expresar múltiples polipéptidos bajo el control de una sola región reguladora para estos microorganismos. Se considera que una secuencia codificante y una región reguladora están unidas operativamente cuando la región reguladora y la secuencia codificante se colocan de modo que la región reguladora sea eficaz para regular la transcripción o traducción de la secuencia.

El término "recombinante", como se usa en la presente, específicamente con respecto a las enzimas, se referirá a las enzimas producidas por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas por una construcción de ADN exógeno que codifica la enzima deseada.

Las enzimas "sintéticas" son aquellas preparadas por síntesis química. Una enzima quimérica se puede producir específicamente como molécula recombinante. Por lo tanto, el término "ADN recombinante" incluye un ADN recombinante incorporado en un vector en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma, o en el ADN genómico de una procariota o eucariota (o el genoma de una célula homóloga, en una posición distinta de la ubicación cromosómica natural).

En otro aspecto, la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la presente descripción está(n) unida(s) operativamente a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células hospederas procariotas y/o eucariotas. Como se usa en la presente, "ligado operativamente" significa incorporado en una construcción genética para que las secuencias de control de expresión controlen de manera efectiva la expresión de una secuencia codificante de interés. Los elementos reguladores de la transcripción/traducción mencionados anteriormente incluyen, entre otros, promotores, mejoradores, operadores, silenciadores, represores inducibles y no inducibles, constitutivos, regulados por el ciclo celular, regulados metabólicamente y otros elementos que son conocidos por los experimentados en la técnica y que impulsan o regulan de otro modo la expresión génica. Tales elementos reguladores incluyen, entre otros, elementos reguladores que dirigen la expresión constitutiva o que permiten la expresión inducible como, por

ejemplo, el promotor CUP-1, el represor tet como se emplea, por ejemplo, en los sistemas tet-on o tet-off, el sistema lac, los elementos reguladores del sistema trp. A modo de ejemplo, el isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es un inductor eficaz de la expresión génica en el intervalo de concentración de 100 μ M a 1.0 mM. Este compuesto es un imitador molecular de la alolactosa, un metabolito de la lactosa que desencadena la transcripción del operón lac y, por lo tanto, se usa para inducir la expresión génica cuando el gen está bajo el control del operador lac. Otro ejemplo de elemento regulador que induce la expresión génica es la lactosa. De manera similar, la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la presente descripción pueden formar parte de un gen híbrido que codifica secuencias polipeptídicas adicionales, por ejemplo, una secuencia que funciona como marcador o reportero. Ejemplos de genes marcadores y reporteros que incluyen beta-lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina deaminasa (ADA), aminoglucósido fosfotransferasa dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina cinasa (TK), lacZ (que codifica beta-galactosidasa) y xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Al igual que con muchos de los procedimientos estándares asociados con la práctica de la descripción, los experimentados en la técnica conocerán reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden cumplir la función de un marcador o

reportero.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polinucleótido recombinante que codifica la enzima SHC/HAC o una variante de la misma, que puede insertarse en un vector para expresión y purificación opcional. Un tipo de vector es un plásmido que representa una espira circular de ADN de doble hebra en la que se ligan segmentos de ADN adicionales. Ciertos vectores pueden controlar la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Estos vectores se denominan "vectores de expresión". Habitualmente, los vectores de expresión adecuados para las técnicas de recombinación de ADN son del tipo plásmido. Normalmente, un vector de expresión comprende un gen, tal como la enzima SHC/HAC o una variante de la misma como se describe en la presente. En la presente descripción, los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es el tipo de vector que se usa con mayor frecuencia. Tales vectores pueden incluir secuencias de ADN que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ADN que no están naturalmente presentes en la célula hospedera, secuencias de ADN que normalmente no se transcriben en ARN ni se traducen en una proteína ("expresadas") y otros genes o secuencias de ADN que se desea introducir en el hospedero no recombinante. Se apreciará que normalmente el genoma de un hospedero recombinante descrito en la presente se aumenta a través de la

introducción estable de uno o más genes recombinantes. Sin embargo, también pueden usarse plásmidos o vectores autónomos o replicativos dentro del alcance de esta descripción. Además, la presente descripción se puede practicar usando un número de copias bajo, por ejemplo, una sola copia, o un alto número de copias (como se ejemplifica en la presente) plásmido o vector.

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

Se prefiere que las proteínas codificadas por el polinucleótido introducido se expresen dentro de la célula tras la introducción del vector. Los diversos sustratos génicos pueden incorporarse en plásmidos. Los plásmidos son a menudo vectores de clonación estándares, por ejemplo, plásmidos multicopia bacterianos. Los sustratos se pueden incorporar en los mismos o diferentes plásmidos. A menudo, se usan por lo menos dos tipos diferentes de plásmido que tienen diferentes tipos de marcadores seleccionables para permitir la selección de células que contienen por lo menos dos tipos de vectores.

Típicamente, las células bacterianas o de levadura se pueden transformar con una cualquiera o más secuencias de nucleótidos como es bien conocido en la técnica. Para la recombinación *in vivo*, el gen que se va a recombinar con el
5 genoma u otros genes se usa para transformar el hospedero usando técnicas de transformación estándares. En una modalidad adecuada, el ADN que proporciona un origen de replicación se incluye en la construcción. El origen de la replicación puede ser seleccionado adecuadamente por el experimentado en la
10 técnica. Dependiendo de la naturaleza de los genes, es posible que no se requiera un origen de replicación suplementario si las secuencias ya están presentes con los genes o el genoma que funcionan como orígenes de replicación ellos mismos.

CÉLULAS HOSPEDERAS, MÉTODOS PARA PREPARAR CÉLULAS HOSPEDERAS Y
15 MÉTODOS PARA PREPARAR AMBROX Y ÓXIDO DE AMBRA USANDO CÉLULAS
HOSPEDERAS

Además, se proporciona en la presente una célula hospedera recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico o una construcción o un vector como se describe en la presente.
20 Además, se proporciona en la presente una célula hospedera recombinante que produce una enzima SHC/HAC o una variante de enzima como se describe en la presente.

Los procesos descritos en la presente para producir (-)-Ambrox u óxido de Ambra pueden, por ejemplo, comprender el
25 cultivo de una célula hospedera recombinante como se describe

en la presente. Como se usa en la presente, el término "cultivo" se refiere a un proceso de producción de células vivas de modo que produzcan una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima como se describe en la presente que se puede usar en un proceso para producir (-)-Ambrox u óxido de Ambra, como se describe en la presente. No es necesario que las células se dividan y repliquen, aunque esto no está excluido.

Una célula bacteriana o de levadura puede transformarse mediante ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN se ha introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede o no estar integrado, es decir, enlazado covalentemente en el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transfectada de forma estable es una en la que el ADN transfectado se ha integrado en un cromosoma para que las células hijas lo hereden a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante.

En general, el ADN introducido no reside originalmente en el hospedero que es el receptor del ADN, pero está dentro del alcance de la descripción aislar un segmento de ADN de un hospedero determinado y, posteriormente, introducir una o más

copias adicionales de ese ADN en el mismo hospedero, por ejemplo, para mejorar la producción del producto de un gen o alterar el patrón de expresión de un gen. En algunos casos, el ADN introducido modificará o incluso reemplazará un gen endógeno o una secuencia de ADN, por ejemplo, por recombinación homóloga o mutagénesis de sitio dirigido. Los hospederos recombinantes adecuados incluyen microorganismos, células vegetales y plantas.

La presente descripción también presenta hospederos recombinantes. El término "hospedero recombinante", también denominado "célula hospedera modificada genéticamente" o "célula transgénica" indica una célula hospedera que comprende un ácido nucleico heterólogo o cuyo genoma se ha aumentado con por lo menos una secuencia de ADN incorporada. Una célula hospedera de la presente descripción se puede diseñar genéticamente con el polinucleótido o el vector como se describió anteriormente.

Las células hospederas que pueden usarse para los fines de la descripción incluyen, entre otras, células procariotas, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*), que pueden, por ejemplo, transformarse con, por ejemplo, células recombinantes vectores de expresión de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido, cromosoma artificial bacteriano o ADN de cósmido que contienen las moléculas polinucleotídicas de la descripción; células eucariotas simples, tal como la levadura

(por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*), que pueden, por ejemplo, transformarse con, por ejemplo, vectores de expresión de levadura recombinante que contienen la molécula de polinucleótido de la descripción. Dependiendo de la célula
5 hospedera y el vector respectivo usado para introducir el polinucleótido de la descripción, el polinucleótido puede integrarse, por ejemplo, en el cromosoma o el ADN mitocondrial o puede mantenerse extracromosómicamente como, por ejemplo, episomalmente o puede estar comprendido solo transitoriamente
10 en las células.

El término "célula", como se usa en la presente, en particular con referencia a la ingeniería genética y la introducción de uno o más genes o un conjunto de genes ensamblados en una célula, o una célula de producción, se
15 entiende que se refiere a cualquier célula procariota o eucariota. Tanto las células hospederas procariotas como las eucariotas se contemplan para su uso de acuerdo con la descripción, incluyendo las células hospederas bacterianas, tales como *E. coli* o *Bacillus sp*, las células hospederas de
20 levadura, tal como *S. cerevisiae*, las células hospederas de insectos, tal como *Spodoptora frugiperda* o las células hospederas humanas, tal como HeLa y Jurkat.

Específicamente, la célula es una célula eucariota, de preferencia una célula fúngica, de mamífero o vegetal, o una
25 célula procariota. Las células eucariotas adecuadas incluyen,

por ejemplo, sin limitación, células de mamífero, células de levadura o células de insecto (incluyendo Sf9), células anfibias (incluyendo células de melanóforo) o células de gusanos incluyendo células de *Caenorhabditis* (incluyendo

5 *Caenorhabditis elegans*). Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, sin limitación, células COS (incluyendo Cos-1 y Cos-7), células CHO, células HEK293, células HEK293T, células HEK293 T-Rex™ u otras líneas de células eucariotas transfectables. Las células bacterianas adecuadas incluyen,

10 sin limitación, *E. coli*.

De preferencia, pueden usarse células procariotas, tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, o células de mamífero, tal como células HeLa o células Jurkat, o células vegetales, tal como *Arabidopsis*.

15 La célula puede, por ejemplo, seleccionarse de células hospederas procariotas, de levadura, de plantas y/o de insectos.

De preferencia, la célula es un *Aspergillus sp.* o una célula fúngica, de preferencia, puede seleccionarse del grupo

20 que consiste de los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Aspergillus*.

De preferencia, la célula es una célula bacteriana, por ejemplo, que tiene un género seleccionado de *Escherichia*,

25 *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y

Lactococcus. Por ejemplo, la bacteria puede ser *E. coli*.

De preferencia, la célula hospedera de *E. coli* es una célula hospedera de *E. coli* reconocida por la industria y las autoridades reguladoras (que incluye, entre otras, una célula
5 hospedera de *E. coli* K12 o una célula hospedera de *E. coli* BL21).

Una célula hospedera preferida para usar con la presente descripción es *E. coli*, que se puede preparar de forma recombinante como se describe en la presente. Por lo tanto, el
10 hospedero recombinante puede ser una célula hospedera de *E. coli* recombinante. Hay bibliotecas de mutantes, plásmidos, modelos de computadora detallados del metabolismo y otra información disponible para *E. coli*, lo que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el rendimiento del
15 producto. Se pueden usar métodos similares a los descritos anteriormente para *Saccharomyces* para producir microorganismos de *E. coli* recombinantes.

En una modalidad, el microorganismo de *E. coli* recombinante comprende secuencias de nucleótidos que codifican
20 enzimas SHC/HAC o genes variantes de enzimas.

De preferencia, el microorganismo de *E. coli* recombinante comprende una construcción de vector como se describe en la presente. En otra modalidad preferida, el microorganismo de *E. coli* recombinante comprende secuencias de nucleótidos que
25 codifican las enzimas SHC/HAC y las variantes de enzimas

descritas en la presente.

Otra célula hospedera preferida para usar con la presente descripción es *S. cerevisiae*, que es un organismo de chasis ampliamente usado en biología sintética. Por lo tanto, el
5 hospedero recombinante puede ser *S. cerevisiae*. Hay bibliotecas de mutantes, plásmidos, modelos de computadora detallados del metabolismo y otra información disponible para *S. cerevisiae*, lo que permite el diseño racional de varios módulos para mejorar el rendimiento del producto. Se conocen métodos para
10 fabricar microorganismos de *S. cerevisiae* recombinantes.

El cultivo de células se puede realizar de manera convencional. El medio de cultivo puede contener una fuente de carbono, por lo menos una fuente de nitrógeno y se adicionan sales inorgánicas y vitaminas. Los constituyentes de este medio
15 pueden ser los que se usan convencionalmente para el cultivo de la especie de microorganismo en cuestión. Las fuentes de carbono de uso en el presente método incluyen cualquier molécula que pueda ser metabolizada por la célula hospedera recombinante para facilitar el crecimiento y/o la producción
20 de (-)-Ambrox u óxido de Ambra. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sacarosa (por ejemplo, como se encuentra en la melaza), fructosa, xilosa, glicerol, glucosa, celulosa, almidón, celobiosa u otro polímero que contiene glucosa.

25 En modalidades que emplean levadura como hospedero, por

ejemplo, son adecuadas fuentes de carbono, tales como sacarosa, fructosa, xilosa, etanol, glicerol y glucosa. La fuente de carbono se puede proporcionar al organismo hospedero durante todo el período de cultivo o, alternativamente, el organismo se puede cultivar durante un período de tiempo en presencia de otra fuente de energía, por ejemplo, proteína, y luego se proporciona una fuente de carbono solo durante la fase de alimentación por lotes.

La disponibilidad de un microorganismo de célula hospedera recombinante para su uso en los métodos de la presente descripción puede determinarse mediante procedimientos de prueba sencillos usando métodos bien conocidos. Por ejemplo, el microorganismo a probar puede propagarse en un medio rico (por ejemplo, medio LB, medio de extracto de levadura Bactotripton, medio nutritivo y similares) a un pH, temperatura y bajo condiciones de reacción comúnmente usadas para la propagación del microorganismo. Una vez que se seleccionan los microorganismos recombinantes (es decir, las células hospederas recombinantes) que producen los productos de bioconversión deseados, los productos se producen típicamente mediante una línea de células hospederas de producción a gran escala mediante fermentaciones y sistemas de expresión adecuados, por ejemplo, por producción microbiana en cultivo celular. En una modalidad de la presente descripción, se usa un medio mínimo definido, tal como M9A para el cultivo celular.

Los componentes del medio M9A comprenden: 14 g/L de KH_2PO_4 , 16 g/L de K_2HPO_4 , 1 g/L de $\text{Na}_3\text{Citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L de glucosa y 1.25 g/L de extracto de levadura).

5 En otra modalidad de la presente descripción, se usó un medio rico en nutrientes como LB. Los componentes del medio LB comprenden: 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl. Otros ejemplos de Mineral Medium y M9 Mineral Medium se describen, por ejemplo, en US 6524831B2 y US
10 2003/0092143A1.

Se puede preparar otro ejemplo de medio mínimo de la siguiente manera: para 350 mL de cultivo: a 35 mL de solución madre de ácido cítrico/fosfato (133 g/L de KH_2PO_4 , 40 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 17 g/L de ácido cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$ con pH ajustado a 6.3)
15 se adicionaron 307 mL de H_2O , el pH se ajustó a 6.8 con NaOH al 32% conforme se requiriera. Después de esterilizar en autoclave, se adicionaron 0.850 mL de solución de MgSO_4 al 50%, 0.035 mL de solución de elementos traza (ver a continuación), 0.035 mL de solución de tiamina y 7 mL de glucosa al 20%.

20 Solución de elementos traza: 50 g/L de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L de H_3BO_3 , 0.9 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1 g/L de CoCl_2 , 80 g/L de CuCl_2 , 240 g/L de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de KI, 1.4 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en agua desionizada.

25 Solución de tiamina: 2.25 g/L de Tiamina.HCl en agua

desionizada.

Solución de MgSO_4 : 50% (p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada. El microorganismo recombinante puede cultivarse en un proceso por lotes, por lotes alimentados o continuo o combinaciones de los mismos. Normalmente, el microorganismo recombinante se cultiva en un fermentador a una temperatura o temperaturas definidas en presencia de una fuente de nutrientes adecuada, por ejemplo, una fuente de carbono, durante un período de tiempo deseado para producir suficiente enzima para convertir homofarnesol en Ambrox o para convertir bishomofarnesol en óxido de Ambra y para producir una cantidad deseada de Ambrox que incluye (-)-Ambrox o una cantidad deseada de óxido de Ambra de la fórmula (X). Las células hospederas recombinantes pueden cultivarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante cultivo discontinuo o cultivo discontinuo alimentado. Como se usa en la presente, el término "cultivo por lotes" es un método de cultivo en el que el medio de cultivo y/o los nutrientes no se adicionan ni se retiran durante el cultivo.

Como se usa en la presente, el término "alimentado por lotes" significa un método de cultivo en el que se adiciona un medio de cultivo y/o nutrientes durante el cultivo pero no se retira el medio de cultivo.

Una modalidad de la presente descripción proporciona un método para producir óxido de Ambrox o Ambra en un sistema

celular que comprende producir enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas bajo condiciones adecuadas en un sistema celular, adicionar homofarnesol o bishomofarnesol al sistema celular, convertir homofarnesol en Ambrox o convertir bishomofarnesol en óxido de Ambra usando las enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas producidas usando el sistema celular, colectando Ambrox u óxido de Ambra de células y opcionalmente aislar los materiales (-)-Ambrox u óxido Ambra de la fórmula (X) del sistema. La expresión de otras secuencias de nucleótidos puede servir para mejorar el método. El método de bioconversión puede incluir la expresión adicional de otras secuencias de nucleótidos en el sistema celular. La expresión de otras secuencias de nucleótidos puede mejorar la ruta de bioconversión para producir (-)-Ambrox u óxido de Ambra. Una modalidad adicional de la presente descripción es un método de bioconversión para producir (-)-Ambrox u óxido de Ambra que comprende el cultivo de células hospederas que comprenden la enzima SHC/HAC o genes de variantes de enzimas, la producción de enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas en las células hospederas, la alimentación de homofarnesol (por ejemplo, EEH) o bishomofarnesol (por ejemplo, bisEEH) a las células hospederas, incubando las células hospederas en condiciones de pH, temperatura y agente solubilizante adecuados para promover la conversión de homofarnesol en Ambrox o la conversión de bishomofarnesol en óxido de Ambra y recolectando (-)- Ambrox u

óxido de Ambra de la fórmula (X). La producción de enzimas SHC/HAC o variantes enzimáticas en las células hospederas proporciona un método para producir (-)-Ambrox u óxido de Ambra de la fórmula (X) cuando se adiciona homofarnesol o bishomofarnesol a las células hospederas en condiciones de reacción adecuadas. La conversión lograda puede mejorarse agregando más biocatalizador y SDS a la mezcla de reacción.

El microorganismo de la célula hospedera recombinante puede cultivarse de varias maneras para proporcionar células en cantidades adecuadas que produzcan las enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas para la etapa de bioconversión posterior. Dado que los microorganismos aplicables para la etapa de bioconversión varían ampliamente (por ejemplo, levaduras, bacterias y hongos), las condiciones de cultivo, por supuesto, se ajustan a los requisitos específicos de cada especie y estas condiciones son bien conocidas y documentadas. Cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para hacer crecer células de microorganismos de células hospederas recombinantes puede usarse para producir las células utilizables en la etapa de bioconversión posterior de la presente descripción. Normalmente, las células se cultivan hasta una densidad particular (medible como densidad óptica (OD)) para producir una biomasa suficiente para la reacción de bioconversión.

Las condiciones de cultivo elegidas influyen no solo en la cantidad de células obtenidas (la biomasa), sino que la

calidad de las condiciones de cultivo también influye en cómo la biomasa se convierte en un biocatalizador. El microorganismo de la célula hospedera recombinante que expresa la enzima SHC/HAC o el gen variante de la enzima y que produce la enzima SHC/HAC o variante de enzima se denomina biocatalizador que es adecuado para su uso en una reacción de bioconversión. En algunas modalidades, el biocatalizador es una célula completa recombinante que produce enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas o puede estar en suspensión o en un formato inmovilizado. En otras modalidades, el biocatalizador es una fracción de membrana o una fracción líquida preparada a partir de la célula completa recombinante que produce la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima (como se describe, por ejemplo, en Seitz *et al.*, 2012, citado anteriormente). El biocatalizador recombinante que produce enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas incluye células enteras recolectadas del fermentador (para la reacción de bioconversión) o las células en el fermentador (que luego se usan en una reacción de un solo recipiente). El biocatalizador recombinante que produce enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas puede incluir células enteras recombinantes intactas y/o residuos celulares. De cualquier forma, la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima está asociada con una membrana (tal como una membrana celular) de alguna manera para recibir e/o interactuar con un sustrato (por ejemplo, homofarnesol o bishomofarnesol), cuya membrana (como

un membrana celular) puede ser parte de una célula completa o comprenderla (por ejemplo, una célula completa recombinante). Las enzimas SHC/HAC o las variantes de enzimas también pueden estar en una forma inmovilizada (por ejemplo, asociadas con un
5 vehículo enzimático) que permite que las enzimas SHC/HAC o las variantes enzimáticas interactúen con un sustrato (por ejemplo, homofarnesol o bishomofarnesol). Las enzimas SHC/HAC o variantes de enzimas también se pueden usar en una forma soluble.

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

15 En una modalidad adicional, las células se producen en cantidades suficientes (para crear un biocatalizador suficiente) y luego se ajustan las condiciones de reacción sin necesidad de cosechar y lavar el biocatalizador para la reacción de bioconversión. Este método de una sola etapa (o
20 "un recipiente") es ventajoso ya que simplifica el proceso y posiblemente reduce los costos. El medio de cultivo usado para hacer crecer las células también es adecuado para usar en la reacción de bioconversión siempre que las condiciones de reacción se ajusten para facilitar la reacción de
25 bioconversión.

El pH óptimo para el crecimiento de las células está en el intervalo de 6.0 a 7.0. El pH óptimo para la reacción de bioconversión depende del tipo de enzima o variante de la enzima SHC/HAC usada en la reacción de bioconversión. El pH se regula usando técnicas bien conocidas por el experimentado en la técnica.

Si bien los términos "mezcla" o "mezcla de reacción" se pueden usar indistintamente con el término "medio" en la presente descripción (especialmente en lo que se refiere a una reacción de "un solo recipiente"), debe tenerse en cuenta que cultivar las células para crear una biomasa suficiente requiere un medio de fermentación/cultivo celular, pero no se requiere un medio para la etapa de bioconversión ya que un amortiguador de reacción será suficiente a un pH adecuado.

Los métodos de bioconversión de la presente descripción se llevan a cabo en condiciones de tiempo, temperatura, pH y agente solubilizante para proporcionar la conversión de la materia prima de homofarnesol o bishomofarnesol (por ejemplo, que comprende EEH o bisEEH) en (-)-Ambrox u óxido de Ambra.

El pH de la mezcla de reacción puede estar en el intervalo de 4 a 8, de preferencia de 5 a 6.5, más preferentemente de 4.8 a 6.0 para las variantes de la enzima SHC/HAC y en el intervalo de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0 para las enzimas SHC/HAC de tipo salvaje y se pueden mantener mediante la adición de amortiguadores a la mezcla de reacción.

Los amortiguadores ejemplares para este propósito incluyen, pero no se limitan a, un amortiguador de ácido cítrico, un amortiguador de fosfato, un amortiguador de ácido acético y/o un amortiguador de ácido succínico.

5 La temperatura preferida es entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 60°C, por ejemplo, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 50°C o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 45°C o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C o de aproximadamente 40°C a
10 aproximadamente 50°C. La temperatura se puede mantener constante o se puede alterar durante el proceso de bioconversión.

El solicitante ha demostrado que puede ser útil incluir un agente solubilizante (por ejemplo, un tensioactivo, un
15 detergente, un mejorador de la solubilidad, un solvente orgánico miscible en agua y similares) en la reacción de bioconversión.

Como se usa en la presente, el término "tensioactivo" significa un componente que reduce la tensión superficial (o
20 tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Los tensioactivos pueden actuar como detergentes, agentes humectantes, emulsificantes, agentes espumantes y dispersantes. Los ejemplos de tensioactivos incluyen, entre otros, Triton X-100, Tween 80, taurodesoxicolato,
25 taurodesoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS) y/o

lauril sulfato de sodio (SLS).

Si bien Triton X-100 se puede usar para purificar parcialmente la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima (en forma soluble o de suspensión/fracción de membrana), también se puede usar en la reacción de bioconversión (ver, por ejemplo, la descripción en Seitz (tesis doctoral 2012, como se citó anteriormente), así como la descripción en Neumann and Simon (1986 - como se citó anteriormente) y JP2009060799. Sin embargo, sorprendentemente, el Solicitante seleccionó e identificó SDS como un agente solubilizante particularmente útil de una larga lista de otros agentes solubilizantes menos útiles. En particular, el solicitante identificó SDS como un agente solubilizante notablemente mejor que, por ejemplo, Triton X-100 en términos de velocidad de reacción y rendimiento para la reacción de bioconversión de homofarnesol a (-)-Ambrox (cuando EEH se usa a 4 g/L y 125 g/L. Para al menos una enzima derivada de SHC/HAC, tal actividad máxima de bioconversión de homofarnesol a (-)-Ambrox con Triton X-100 (en un intervalo de concentración de aproximadamente 0.005% a 0.48%) en la reacción puede ser solo aproximadamente de 20% de la actividad obtenida con SDS (a una concentración de aproximadamente 0.07%) con EEH a 4 g/L y células a una OD_{650nm} de 10.

Sin desear limitarse a la teoría, el uso de SDS con células hospederas microbianas recombinantes puede ser ventajoso ya que el SDS puede interactuar ventajosamente con la membrana de

la célula hospedera para hacer que la enzima SHC/HAC o la variante de la enzima (que es una enzima unida a la membrana) más accesible al sustrato de homofarnesol. Además, la inclusión de SDS en un nivel adecuado en la mezcla de reacción puede
5 mejorar las propiedades de la emulsión (homofarnesol en agua) y/o mejorar el acceso del sustrato de homofarnesol a la enzima SHC dentro de la célula hospedera mientras que al mismo tiempo prevenir la alteración (por ejemplo, desnaturalización de la enzima SHC (variante WT o SHC/HAC)). La concentración del
10 agente solubilizante (por ejemplo, SDS) usado en la reacción de bioconversión está influenciada por la cantidad de biomasa y la concentración de sustrato (EEH). Es decir, existe un grado de interdependencia entre la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS), la cantidad de biomasa y la
15 concentración del sustrato (EEH). A modo de ejemplo, a medida que aumenta la concentración de sustrato de homofarnesol, cantidades suficientes de biocatalizador y agente solubilizante (por ejemplo, SDS) se requieren para que se lleve a cabo una reacción de bioconversión eficiente. Si, por
20 ejemplo, la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS) es demasiado baja, se puede observar una conversión de homofarnesol subóptima. Por otro lado, si, por ejemplo, la concentración del agente solubilizante (por ejemplo, SDS) es demasiado alta, entonces puede existir el
25 riesgo de que el biocatalizador se vea afectado por la

alteración de la célula microbiana intacta y/o la desnaturalización/inactivación de la enzima SHC/HAC o variante de enzima. 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 experimentada. A modo de ejemplo, la persona experimentada puede desarrollar un modelo predictivo para determinar las concentraciones adecuadas de SDS, sustrato (EEH) y biomasa. SDS en el intervalo de 0.010-0.075% puede ser apropiado cuando se usan 4 g/L de EEH y biocatalizador a una OD de 10.0 (650 nm). Cuando se usan 125 g/L de EEH con 2 veces el peso húmedo de la biomasa, puede ser adecuada una concentración ajustada de SDS (1.3%). Sin embargo, una investigación del porcentaje de conversión de EEH a (-)-Ambrox usando diferentes valores de relación SDS/células indicó que la selección correcta de la relación de biocatalizador, sustrato de homofarnesol y agente solubilizante (por ejemplo, SDS) facilita el desarrollo de un sistema de reacción de bioconversión robusta que demuestra un grado de tolerancia a un intervalo de concentraciones de SDS e intervalos de pH.

La temperatura de la reacción de bioconversión para una enzima WT SHC (por ejemplo, AacSHC) puede ser de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo

aproximadamente 55°C.

El intervalo de pH de la reacción de bioconversión para una enzima WT SHC (por ejemplo, AacSHC) puede ser de aproximadamente 5.0 a 7.0, más preferentemente de aproximadamente 5.6 a aproximadamente 6.2, incluso más preferentemente de aproximadamente 6.0.

La temperatura de la reacción de bioconversión para una variante de enzima SHC/HAC puede ser de aproximadamente 30°C a aproximadamente 55°C, por ejemplo, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 50°C, por ejemplo, aproximadamente 45°C.

El pH de la reacción de bioconversión para una variante de enzima SHC/HAC puede ser de aproximadamente 4.8 a 6.4, de preferencia de aproximadamente 5.2 a 6.0.

De preferencia, el agente solubilizante usado en la reacción de bioconversión es SDS. La concentración de SDS usada en la reacción de bioconversión para la enzima WT SHC (por ejemplo, AacSHC) puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.010-0.075%, de preferencia de aproximadamente 0.030% cuando se usa EEH a aproximadamente 4 g/L y células a una OD_{650nm} de 10.

La concentración de SDS usada en la reacción de bioconversión para la variante enzimática SHC/HAC puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.0025-0.090%, de preferencia de aproximadamente 0.050% cuando se usa EEH a aproximadamente 4 g/L y células a una OD_{650nm} de 10.

El biocatalizador se puede cargar en la reacción a una OD de aproximadamente 10.0 (650 nm) cuando la reacción se carga con homofarnesol a una concentración de EEH de aproximadamente 4 g/L de EEH.

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

10 La concentración de SDS en la reacción de bioconversión para una enzima variante de SHC puede estar en el intervalo de aproximadamente 1-2%, de preferencia en el intervalo de aproximadamente 1.4-1.7%, incluso más preferentemente de aproximadamente 1.5% cuando la concentración de homofarnesol
15 es de aproximadamente 125 g/L. EEH y la concentración de biocatalizador es de 250 g/L (correspondiente a una OD de aproximadamente 175 (650 nm)).

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

La temperatura óptima para las variantes de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, ser igual o superior a aproximadamente 35°C. Por ejemplo, la temperatura óptima para
25 las variantes de la enzima SHC/HAC puede oscilar entre

aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C, por ejemplo, entre aproximadamente 42°C y aproximadamente 48°C o entre aproximadamente 44°C y aproximadamente 46°C. Por ejemplo, la temperatura óptima de las variantes de la enzima SHC/HAC puede ser de aproximadamente 45°C. Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo a la temperatura óptima de la variante de enzima SHC/HAC.

El pH óptimo para las variantes de la enzima SHC/HAC puede, por ejemplo, ser igual o mayor a aproximadamente 5.4. Por ejemplo, el pH óptimo para las variantes de la enzima SHC/HAC puede oscilar entre aproximadamente 5.2 y aproximadamente 6.0, por ejemplo, entre aproximadamente 5.4 y aproximadamente 5.8, por ejemplo, entre aproximadamente 5.6 y aproximadamente 5.8. Por ejemplo, el pH óptimo de las variantes de la enzima SHC/HAC puede ser de aproximadamente 5.6 o aproximadamente 5.8. El proceso para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descrito en la presente puede llevarse a cabo al pH óptimo de la variante de enzima SHC/HAC.

La concentración óptima de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el medio de reacción del proceso para fabricar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descrito en la presente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0.010% p/p a aproximadamente 0.10% p/p. Por ejemplo, la concentración óptima de SDS puede ser de aproximadamente 0.040% p/p a aproximadamente 0.080% p/p, por

ejemplo, aproximadamente 0.050% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 4 g/L con células a una OD_{650nm} de 10. El proceso para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descrito en la presente puede llevarse a cabo usando la concentración óptima de SDS descrita en la presente. La
5 concentración óptima de dodecil sulfato de sodio (SDS) en el medio de reacción de los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1.0% p/p a aproximadamente 1.5% p/p cuando
10 el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 250 g/L de células. Por ejemplo, la concentración óptima de SDS puede ser de aproximadamente 1.2% p/p a aproximadamente 1.4% p/p, por ejemplo, aproximadamente 1.3% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 250
15 g/L de células o aproximadamente 0.65% p/p cuando el sustrato (por ejemplo, EEH o BisEEH) se usa a 125 g/L con 125 g/L de células.

Los procesos para elaborar (-)-Ambrox u óxido de Ambra descritos en la presente pueden llevarse a cabo dentro del
20 intervalo de temperatura óptimo o a la temperatura óptima y/o dentro del intervalo de pH óptimo o al pH óptimo y/o dentro del intervalo de concentración óptimo de SDS o a la concentración óptima de SDS para la enzima específica usada, como se establece en la Tabla 7 o 9 u 11 en los Ejemplos a
25 continuación.

En algunas modalidades, Ambrox se produce usando un biocatalizador al que se adiciona el sustrato de homofarnesol.

En algunas modalidades, el óxido de Ambra se produce usando un biocatalizador al que se adiciona el sustrato de
5 bishomofarnesol.

Es posible adicionar el sustrato alimentándolo usando medios conocidos (por ejemplo, bomba peristáltica, jeringa de infusión y similares). El homofarnesol y el bishomofarnesol pueden ser compuestos solubles en aceite y se proporcionan en
10 formato de aceite. Dado que el biocatalizador (células microbianas, tales como células enteras recombinantes intactas y/o desechos celulares y/o enzima inmovilizada) está presente en una fase acuosa, la reacción de bioconversión puede considerarse como un sistema de tres fases (que comprende una
15 fase acuosa, una sólida fase y una fase aceitosa) cuando se adiciona homofarnesol o bishomofarnesol a la mezcla de reacción de bioconversión. Este es el caso incluso cuando SDS está presente. A modo de aclaración, cuando se usa una variante de enzima WT SHC o SHC/HAC soluble como biocatalizador, se
20 considera un sistema de dos fases.

Se puede usar un fermentador para hacer crecer células hospederas recombinantes que expresen la enzima SHC/HAC o el gen de la variante de la enzima y que produzcan enzimas SHC/HAC activas o las variantes de enzima a una concentración de
25 biomasa suficiente adecuada para su uso como biocatalizador en

el mismo recipiente de fermentación que se usa para convertir la fuente de homofarnesol en (-)-Ambrox, por ejemplo, mezclado con uno o más de los subproductos (II), (IV) y/o (III) o fuente de bishomofarnesol a óxido de Ambra, por ejemplo, en mezcla
 5 con uno o más de los subproductos (XI), (XII) y/o (XIII).

La persona experimentada comprenderá que se pueden lograr títulos de producción acumulativos más altos mediante la implementación de un proceso continuo, tal como la eliminación del producto, la alimentación del sustrato y la adición o
 10 reemplazo (parcial) de biomasa. De preferencia, la bioconversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra en presencia de una célula hospedera recombinante que comprende una enzima SHC/HAC o una variante de la enzima genera un rendimiento de óxido de Ambrox o Ambra de 5, 6, 7, 8, 9, 10,
 15 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85,
 20 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, dado en porcentaje molar y basado en los moles de EEH o BisEEH empleados; con especial preferencia, el rendimiento está entre 5 y 100, 10 y 100 y 100, 25 y 100, 30 y 100, 35 y 100, en particular entre 40 y 100, 45 y 100, 50 y 100, 60 y 100, 70 y
 25 100 por ciento en mol.

La actividad de la enzima SHC/HAC o variante de enzima se define a través de la velocidad de reacción (cantidad de producto/(cantidad de producto + cantidad de material de partida restante)) x 100) en porcentaje molar. De preferencia, la bioconversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra en presencia de una enzima SHC/HAC o una variante de enzima produce un rendimiento de óxido de (-)-Ambrox o Ambra de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, dado en porcentaje molar y basado en los moles de EEH o BisEEH empleados; de manera especialmente preferida, el rendimiento está entre 5 y 100, 10 y 100, 20 y 100, 25 y 100, 30 y 100, 35 y 100, en particular entre 40 y 100, 45 y 100, 50 y 100, 60 y 100, 70 y 100.

En una modalidad preferida de la invención, el rendimiento y/o la velocidad de reacción se determinan durante un período de tiempo definido de, por ejemplo, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36 o 48 horas, durante la cual EEH se convierte en (-)-Ambrox o BisEEH se convierte en óxido de Ambra por una célula hospedera recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima SHC/HAC o una variante de

enzima. En otra variante, la reacción se lleva a cabo en condiciones definidas con precisión, por ejemplo, 25°C, 30°C, 40°C, 50°C o 60°C. En particular, el rendimiento y/o la velocidad de reacción se determinan llevando a cabo la reacción de conversión de EEH en (-)-Ambrox o BisEEH en óxido de Ambra mediante las enzimas SHC/HAC o variantes enzimáticas de acuerdo con la invención a 35°C durante un periodo de 24-72 horas.

En otra modalidad de la presente invención, una célula hospedera recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de la enzima SHC/HAC se caracteriza porque muestra un 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 21-, 22-, 23-, 24-, 25-, 26-, 27-, 28-, 29-, 30-, 31-, 32-, 33-, 34-, 35-, 36-, 37-, 38-, 39-, 40-, 41-, 42-, 43-, 44-, 45-, 46-, 47-, 48-, 49-, 50-, 51-, 52-, 53-, 54-, 55-, 56-, 57-, 58-, 59-, 60-, 61-, 62-, 63-, 64-, 65-, 66-, 67-, 68-, 69-, 70-, 71-, 72-, 73-, 74-, 75-, 76-, 77-, 78-, 79-, 80-, 81-, 82-, 83-, 84-, 85-, 86-, 87-, 88-, 89-, 90-, 91-, 92-, 93-, 94-, 95-, 96-, 97-, 98-, 99-, 100-, 200-, 500-, 1000 veces o mayor rendimiento y/o velocidades de reacción en la reacción de homofarnesol para dar (-)-Ambrox o en la reacción de bishomofarnesol para dar óxido de Ambra en comparación con la enzima derivada WT SHC o SHC/HAC en las mismas condiciones. En la presente, el término condición se refiere a condiciones de reacción, tales como concentración de sustrato, concentración

de enzima, período de reacción y/o temperatura. El desarrollo exitoso de un proceso de bioconversión para producir (-)-Ambrox a partir de homofarnesol en una cepa recombinante de *E. coli* que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un WT/SHC de referencia o un derivado de SHC/HAC puede ofrecer un
5 proceso industrialmente económico y de bajo costo para la producción de (-)-Ambrox.

El desarrollo exitoso de un proceso de bioconversión para producir óxido de Ambra a partir de bishomofarnesol en una cepa
10 recombinante de *E. coli* que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un WT/SHC de referencia o un derivado de SHC/HAC puede ofrecer un proceso industrialmente económico y de bajo costo para la producción de óxido de Ambra.

A lo largo de esta descripción y las reivindicaciones que
15 siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden" y variaciones, tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros establecidos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero
20 o etapa o grupo de números enteros o etapa. El término "que comprende" también significa "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición que "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y. Debe señalarse también que, como
25 se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas,

las formas singulares "un", "una" y "el, la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. A modo de ejemplo, una referencia a "un gen" o "una enzima" es una referencia a "uno o más genes" o "una o más enzimas".

Debe entenderse que esta descripción no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en la presente, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente descripción que estará limitada únicamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que comúnmente entiende el experimentado en la técnica. De acuerdo con la presente descripción, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante que están dentro de la experiencia en la técnica.

Esta descripción no se limita en su solicitud a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La descripción es susceptible de otras modalidades y de practicarse o llevarse a cabo de varias maneras. Además, la fraseología y la terminología usada en la presente tienen fines

descriptivos y no deben considerarse como limitantes. De preferencia, los términos usados en la presente se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (Recomendaciones de la IUPAC)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta descripción. Cada uno de los documentos citados en la presente (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, envíos de secuencias de números de acceso de GenBank, etc.), ya sea *supra* o *infra*, se incorpora por referencia en su totalidad.

Se prepararon reservas de materiales para usar en reacciones de bioconversión (125 g/L de sustrato o más) en concentraciones de g/L (por ejemplo, una suspensión de biocatalizador) o % p/p (por ejemplo, SDS). Las reacciones de bioconversión se establecieron adicionando por peso las cantidades requeridas de componentes individuales (por ejemplo, reservas de sustrato, suspensión de biocatalizador, solución de SDS, amortiguador de reacción) como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 4. Por esta razón, el volumen real de la mezcla de reacción se expresa en unidades de masa y no en unidades de volumen (ver, por ejemplo, el Ejemplo 4). Dado que el sustrato usado es un aceite (densidad < 1), una masa de

reacción total de, por ejemplo, 150 g (como por ejemplo en el Ejemplo 4) no se traduce en un volumen de reacción de 150 mL. No obstante, las concentraciones de los componentes individuales en las mezclas de reacción de bioconversión se indican en masa por volumen (por ejemplo, g/L o (p/v) %) y, por lo tanto, no tienen en cuenta que una masa de reacción total de, por ejemplo, 150 g (como por ejemplo en el Ejemplo 4) no corresponde exactamente a un volumen de reacción de 150 mL (como por ejemplo en el Ejemplo 4).

Para evitar dudas, toda referencia a EEH en los Ejemplos, las Figuras y las leyendas de las Figuras es una referencia al isómero EE de homofarnesol. El EEH usado se toma de una reserva de homofarnesol que comprende una mezcla de isómeros EE:EZ en una relación ponderal de 80:20.

Los ejemplos descritos en la presente son ilustrativos de la presente descripción y no pretenden ser limitaciones de la misma. Se han descrito diferentes modalidades de la presente descripción de acuerdo con la presente descripción. Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones a las técnicas descritas e ilustradas en la presente sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción. En consecuencia, debe entenderse que los ejemplos son solo ilustrativos y no limitan el alcance de la descripción.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción y prueba de nuevas variantes de enzimas

SHC/HAC**Preparación del plásmido SHC**

El gen que codifica una enzima escualeno hopeno ciclasa (SHC) de tipo salvaje o variante se insertó en el plásmido pET-28a(+), en 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 BL21(DE3) de *E. coli* usando un protocolo estándar de transformación por choque térmico.

10 **Preparación de medios**

El medio mínimo elegido por defecto se preparó de la siguiente manera para 350 mL de cultivo: a 35 mL de solución madre de ácido cítrico/fosfato (133 g/L de KH_2PO_4 , 40 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 17 g/L ácido cítrico. H_2O con pH ajustado a 6.3) se 15 adicionaron 307 mL de H_2O , el pH se ajustó a 6.8 con NaOH al 32% como se requiriera. Después de esterilizar en autoclave, se adicionaron 0.850 mL de MgSO_4 al 50%, 0.035 mL de solución de elementos traza (ver a continuación), 0.035 mL de solución de tiamina y 7 mL de glucosa al 20%.

20 Solución de elementos traza: 50 g/L de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L de H_3BO_3 , 0.9 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.1 g/L de CoCl_2 , 80 g/L de CuCl_2 , 240 g/L de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de KI, 1.4 g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en agua desionizada.

25 Solución de tiamina: 2.25 g/L de Tiamina.HCl en agua

desionizada.

Solución de MgSO_4 : 50% (p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada.

5 ***Producción de biocatalizadores a pequeña escala (enzima de tipo salvaje SHC/HAC o variante de enzima)***

Se inocularon 350 mL de cultivo (medio suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina) de un precultivo de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* que contenía el plásmido de producción de SHC. Las células se cultivaron hasta una densidad óptica de
10 aproximadamente 0.5 ($\text{OD}_{650\text{nm}}$) a 37°C con agitación constante (250 rpm).

A continuación, se indujo la producción de proteínas mediante la adición de IPTG a una concentración de 300 μM , seguido de incubación durante 5-6 horas más con agitación
15 constante. La biomasa resultante finalmente se colectó por centrifugación y se lavó con, por ejemplo, amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Las células se almacenaron como sedimentos a 4°C o -20°C hasta su uso posterior. En general se obtuvieron de 2.5 a 4 gramos de células (peso húmedo) a partir de 1 litro
20 de cultivo, independientemente del medio usado.

Producción de biocatalizadores en fermentadores

Las fermentaciones se prepararon y se corrieron en reactores InforsHT de 750 mL. Al recipiente de fermentación se adicionaron 168 mL de agua desionizada. El recipiente de
25 reacción se equipó con todas las sondas necesarias (pO_2 , pH,

muestreo, antiespumante), alimentación C+N y botellas de hidróxido de sodio y se sometió a autoclave. Después de la autoclave se adicionan al reactor:

- 20 mL de amortiguador de fosfato/ácido cítrico 10x
- 5 14 mL de glucosa al 50%
- 0.53 mL de solución de MgSO_4
- 2 mL de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0.020 mL de solución de elementos traza
- 0.400 mL de solución de tiamina
- 10 0.200 mL de caldo de canamicina

Los parámetros de funcionamiento que se establecieron son los siguientes: pH = 6.95, pO_2 = 40%, T = 30°C, agitación a 300 rpm. Cascada: punto de ajuste rpm a 300, min 300, máx 1000, flujo (L/min) punto de ajuste 0.1, min 0, máx 0.6. Control
15 antiespumante: 1:9.

El fermentador se inoculó a partir de un cultivo de siembra a una $\text{OD}_{650\text{nm}}$ de 0.4-0.5. Este cultivo de siembra se cultivó en medio LB (+ canamicina) a 37°C, 220 rpm durante 8 h. La fermentación se llevó a cabo primero en modo discontinuo
20 durante 11.5 h, en donde luego se inició la alimentación de C+ N con una solución de alimentación (solución de glucosa esterilizada (143 mL de H_2O +35 g de glucosa) a la que se había adicionado 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
25 de elementos traza, 0.360 mL de solución de tiamina, 0.180 mL

de solución madre de canamicina. La alimentación se hizo funcionar a un flujo constante de aproximadamente 4.2 mL/h. Las mediciones de glucosa y NH_4^+ se realizaron externamente para evaluar la disponibilidad de las fuentes de C y N en el cultivo. Por lo general, los niveles de glucosa se mantienen muy bajos.

Los cultivos se cultivaron durante un total de aproximadamente 25 horas, en las que alcanzaron normalmente una $\text{OD}_{650\text{nm}}$ de 40-45. A continuación, se inició la producción de SHC adicionando IPTG a una concentración de aproximadamente 1 mM en el fermentador (como pulso de IPTG o durante un período de 3-4 horas usando una jeringa de infusión), ajustando la temperatura a 40°C y pO_2 al 20%. La inducción de la producción de SHC duró 16 h a 40°C. Al final de la inducción, las células se colectaron mediante centrifugación, se lavaron con amortiguador de ácido cítrico/citrato de sodio 0.1 M pH 5.4 y se almacenaron como sedimentos a 4°C o -20°C hasta su uso posterior.

Producción y selección de nuevas variantes de enzimas SHC/HAC

Se llevó a cabo un programa de evolución de enzimas usando el gen de la variante *Alicyclobacillus acidocaldarius* 215G2 SHC (215G2 SHC) descrito previamente en WO 2016/170099 como una plantilla. Se produjo una biblioteca de aproximadamente 9950 variantes de SHC y se examinaron las variantes que mostraban una mayor capacidad de ciclación de E,E-Homofarnesol

(EEH). El cribado (montaje en placa de microtitulación) se realizó en amortiguador de ácido succínico/NaOH 50 mM pH 5.2 (0.200 mL) que contenía 34 g/L de EEH y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.075%. Las reacciones se llevaron a cabo durante 24 horas a 35°C bajo agitación constante (agitación orbital, 210 rpm).

Se eligieron aproximadamente de 495 variantes para confirmación en la misma configuración de reacción. De estas 495 variantes, se eligieron 48 para confirmación en reacciones de volumen de 0.500 mL (mismas condiciones) con biocatalizador recién producido (cultivos de 2 mL).

Por último, 16 de las 48 variantes anteriores que mostraban una actividad mejorada en EEH se usaron para realizar conversiones de EEH a 34, 68 o 136 g/L en amortiguador de ácido succínico/NaOH 50 mM, pH 5.2 que contenía sustrato de EEH, 0.1% de SDS y células que había producido las variantes SHC a un OD_{600nm} de 40.0. El volumen final fue de 1 mL, las reacciones se incubaron a 35°C y se agitaron vigorosamente en un agitador magnético. Las reacciones se muestrearon a lo largo del tiempo, se extrajeron con solvente y se analizaron mediante cromatografía de gases para determinar la conversión de EEH en (-)-Ambrox) (ver los métodos analíticos a continuación).

A partir de esto, se seleccionaron 3 variantes con actividad de ciclación de EEH mejorada (90C7, 110B8 y 115A7). Se identificaron un total de 7 mutaciones en estas 3 variantes.

El biocatalizador se produjo a partir de estas 3 variantes y las bioconversiones de EEH se corrieron a 100 g/L de EEH y 250 g/L de células en amortiguador de ácido acético/acetato de sodio 100 mM, pH 4.7 en presencia de SDS al 0.975 %. La reacción
5 (volumen de 2 mL) se incubó durante 72 horas a 35°C con agitación constante (agitación magnética) y se tomaron muestras a lo largo del tiempo para el análisis de GC.

Luego se realizó un estudio de mutaciones para determinar cuál de las mutaciones individuales identificadas o
10 combinaciones de mutaciones eran benéficas para la ciclación de EEH a (-)-Ambrox. Se construyeron 15 variantes adicionales y se produjo el biocatalizador de las mismas. La actividad de estas variantes se analizó en reacciones que contenían 34 g/L de EEH, 77 g/L de células y SDS al 0.4%, o 34 g/L de EEH, 155
15 g/L de células y SDS al 0.7%, o 34 g/L de EEH, 250 g/L de células y SDS al 1.0%, en amortiguador de ácido succínico/NaOH 50 mM, pH 4.7-5.2. Las reacciones (volumen de 1 ml) se incubaron a 35°C con agitación constante (agitación magnética), se tomaron muestras a lo largo del tiempo y se extrajeron para
20 análisis por GC.

Análisis de GC

Las muestras se extrajeron con un volumen adecuado de terc-butilmetil éter (MBTE/tBME) para cuantificar su contenido en sustrato y productos de reacción. La fracción de solvente
25 se separó de la fase acuosa por centrifugación antes del

análisis con cromatografía de gases. Se inyectó 1 µl de la fase de solvente (relación de división 10) en una columna Zebron ZB-5 de 30 mx 0.32 mm x 0.25 µm. La columna se desarrolló a flujo constante (4 mL/min de H₂) con el gradiente de temperatura: 100°C, 15°C/min a 200°C, 120°C/min a 240°C, 4 min a 240°C. Temperatura de entrada: 250°C, temperatura del detector: 250°C. Esto resultó en la separación de EEH y EZH, y de los picos correspondientes a (-)-Ambrox y otros 3 productos de reacción resultantes de la ciclación de Homofarnesol. También resultó en la separación de Bis-EEH, Bis-EZH, y de los picos correspondientes al óxido de Ambra y de los otros 3 productos de reacción resultantes de la ciclación de Bishomofarnesol.

La conversión de EEH se calculó a partir de las áreas de los picos resultantes de la ciclación de EEH y EEH con la siguiente fórmula:

$$\text{Conversión de EEH (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{Área}_{\text{Productos pico de EEH}}}{\text{Área}_{\text{Productos pico de EEH}} + \text{Área}_{\text{EEH pico}}} \right)$$

La conversión BisEEH se calculó de la misma forma a partir de las áreas de los picos resultantes de la ciclación de BisEEH y BisEEH de la misma forma que para Conversión EEH.

Resultados

De las 15 variantes evaluadas, las 6 variantes enumeradas en la Tabla 6 a continuación mostraron la mejor actividad. La Tabla 6 enumera las nuevas mutaciones identificadas en estas

variantes.

Tabla 6. Mutaciones en nuevas enzimas variantes de SHC seleccionadas.

Variante de SHC	Y81H	T90A	A172T	M277K	H431L	A557T	R613S
110B8 (SEC ID NO.: 5)	+				+	+	
90C7 (SEC ID NO.: 17)		+					+
115A7 (SEC ID NO.: 18)			+	+			
SHC49 (SEC ID NO.: 2)					+	+	
SHC65 (SEC ID NO.: 3)						+	+
SHC66 (SEC ID NO.: 4)	+					+	+

Nota: estas mutaciones aparecen además de las mutaciones presentes en 215G2 SHC: M132R, A224V e I432T

Las nuevas mutaciones identificadas en las variantes de SHC creadas no se encuentran en la vecindad del sitio activo de la enzima, como se observó anteriormente al evolucionar *Alicyclobacillus acidocaldarius* de tipo salvaje SHC a 215G2 SHC. La mayoría de las nuevas mutaciones identificadas se ubican nuevamente en el dominio 2 de la estructura cristalina de la enzima (T90A, A172T, M277K y H431L). Dos están ubicados en el dominio 1 (A557T y R613S) y 1 en la interface entre los

2 dominios (Y81H).

Ejemplo 2: optimización de las condiciones de reacción para nuevas variantes de enzimas SHC/HAC

Parámetros de reacción investigados: temperatura,
concentración de SDS y pH

Las condiciones de reacción para las variantes de SHC enumeradas en la Tabla 6 anterior en relación con el Ejemplo 1 se optimizaron individualmente con respecto a la temperatura, el pH y la concentración de SDS.

El biocatalizador se preparó a partir de las diferentes variantes por fermentación como se ha descrito anteriormente usando las células de *E. coli* transformadas con el plásmido correspondiente. Las células se colectaron por centrifugación y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Los biocatalizadores producidos mostraron un contenido de SHC muy similar. Por lo tanto, se podría concluir que las diferencias de actividad observadas se debían a las mutaciones insertadas.

Resultados

Se realizaron reacciones de 2-5 mL de volumen con 4 g/L de EEH y biocatalizador cargado a una OD_{650nm} de 10.0 en amortiguador de ácido cítrico/fosfato de sodio 0.1 M pH 5.0-6.8, en presencia de 0.0125-0.125% de SDS a temperaturas que oscilan entre 28 a 50°C y bajo agitación constante (síntesis de Heidolph 1, dispositivo líquido, 900 rpm).

Las condiciones enumeradas en la Tabla 7 a continuación

parecían ser las condiciones óptimas individuales. Se confirmaron en reacciones realizadas en amortiguador de ácido succínico/NaOH 0.1 M a un pH cercano al definido anteriormente como óptimo.

5 **Tabla 7. Condiciones de reacción óptimas para las enzimas variantes de SHC.**

	Variante de SHC	Temperatura óptima (°C)	Intervalo de temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Intervalo de pH óptimo	[SDS] óptimo (% p/p)	Intervalo [SDS] óptimo (%) p/p)
10	215G2 (SEC ID NO.: 10)	35	32-50	5.4	5.0-6.2	0.060	0.010-0.10
	110B8 (SEC ID NO.: 5)	45	40-50	5.8	5.6-6.0	0.050	0.040-0.070
	SHC 49 (SEC ID NO.: 2)	45	40-50	5.6	5.4-5.8	0.050	0.040-0.080
15	SHC65 (SEC ID NO.: 3)	45	40-50	5.6	5.2-5.8	0.050	0.040-0.10
	Variante de SHC	Temperatura óptima (°C)	Intervalo de temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Intervalo de pH óptimo	[SDS] óptimo (% p/p)	Intervalo [SDS] óptimo (%) p/p)
20	SHC 66 (SEC ID NO.: 4)	45	40-46	5.8	5.6-6.0	0.060	0.040-0.080
	90C7 (SEC ID NO.: 17)	45	40-46	5.6	5.2-6.0	0.040	0.025-0.050
	115A7 (SEC ID NO.: 18)	35	32-36	5.4	5.2-5.8	0.050	0.040-0.075

25 Se observó alguna desviación de la enzima madre 215G2 SHC.

Con solo una excepción, la introducción de las nuevas mutaciones cambió la temperatura óptima en 10°C, de 35°C a aproximadamente 45°C.

5 Ejemplo 3: prueba de la actividad de la nueva variante
enzimática SHC/HAC en condiciones de reacción iniciales y
optimizadas

Para comparar la actividad de las variantes de SHC, se produjeron biocatalizadores por fermentación a partir de células de *E. coli* transformadas con el plásmido apropiado.
10 Las células resultantes se usaron para probar la conversión de EEH a 4 g/L de EEH con biocatalizador cargado a una OD_{650nm} de 10.0, ya sea en condiciones iniciales (35°C, pH 5.4, 0.070% de SDS) o a T, pH y [SDS] establecido en condiciones definidas como óptimas para cada una de las variantes (ver la Tabla 7 en
15 el Ejemplo 2 anterior). Se cargó una muestra de la mezcla de reacción en un gel SDS-PAGE para analizar el contenido de SHC de las reacciones. Este análisis confirmó que todas las reacciones contenían cantidades idénticas de enzima SHC.

La Figura 1 muestra las actividades relativas de las
20 variantes de SHC en condiciones iniciales (pH 5.4, 35°C, SDS al 0.065%, células a OD_{650nm} de 10), que se determinaron anteriormente como condiciones de reacción óptimas para la actividad de 215G2 SHC y condiciones de reacción optimizadas individualmente (pH variable, T y [SDS]).

25 La Figura 2 muestra las actividades relativas de las

variantes de SHC en condiciones optimizadas en comparación con la enzima original 215G2 SHC. Se concluyó que la introducción de solo unas pocas mutaciones en 215G2 SHC condujo a variantes con actividad mejorada o significativamente mejorada (ciclación de EEH a (-)-Ambrox).

Ejemplo 4: rendimiento relativo de las variantes de SHC en bioconversión de 125 g/L de EEH

Los biocatalizadores producidos por fermentación de cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido que porta el gen que codifica las nuevas variantes de SHC seleccionadas o 215G2 "HC madre se usaron en bioconversiones de 125 g/L de EEH.

Se preparó una reacción típica (150 g de volumen total) como sigue en fermentadores Infors de 0.75 litros. El recipiente de reacción se cargó con una cantidad apropiada de Homofarnesol correspondiente a 18.75 g de EEH. Se adicionaron 1.95 g de SDS de una solución al 31% (p/p) preparada en agua desionizada. Se prepara una suspensión celular a partir de células de *E. coli* que habían producido la variante SHC de interés suspendiendo las células en amortiguador de ácido succínico/NaOH 0.1 M, pH 5.1. Después de determinar la concentración de peso húmedo celular de esta suspensión celular por centrifugación durante 10 minutos a 10°C y 17210 g, se adicionó el volumen apropiado de células al recipiente de reacción para introducir 37.5 g de células en la reacción. El volumen de la reacción se completó a 150 g con la cantidad

requerida de amortiguador de reacción, pH 5.1. La reacción se corrió con cada variante de SHC a la temperatura determinada como óptima para su actividad y bajo agitación constante a 700 rpm. El pH se fijó en el valor determinado como óptimo para cada variante de SHC o SHC original 215G2 usando H_3PO_4 al 85%. La regulación del pH se realizó manualmente usando ácido fosfórico al 85% como se requiriera. Se tomaron muestras de la reacción a lo largo del tiempo (1 mL), se extrajo con 5 volúmenes de MTBE/tBME (5 mL). El contenido de homofarnesol y (-)-Ambrox de la reacción se determinó mediante análisis GC después de la clarificación de la fase solvente por centrifugación (centrífuga de mesa, 13,000 rpm, 2 min) y dilución de 10 a 20 veces en MTBE/tBME.

La Figura 3 muestra la conversión de EEH a (-)-Ambrox por variantes de SHC y 215G2 SHC (enzima original) en bioconversiones realizadas a 125 g/L de EEH con 250 g/L de células, y se corrieron con cada enzima SHC en condiciones óptimas de pH y temperatura.

La Figura 4 muestra el mejoramiento relativo para las 4 mejores variantes de SHC como % de aumento en la conversión de EEH en comparación con la obtenida con la enzima madre 215G2 SHC. Se observó un aumento significativo en la velocidad de reacción inicial, es decir, la conversión de EEH lograda durante las primeras 6 a 8 horas de reacción. Se anticipa que los ajustes adicionales en las condiciones de reacción

aplicadas en la conversión de EEH de 125 g/L con SHC # 65 permitirían aumentar aún más la actividad de esta variante sobre la del SHC original 215G2 SHC, y alcanzar la conversión completa como con las otras variantes de SHC.

5 Los datos demuestran que la evolución de la enzima usando 215G2 SHC como enzima original produjo enzimas SHC con propiedades de bioconversión EEH mejoradas. La introducción de solo unas pocas mutaciones de aminoácidos aumenta sustancialmente la bioconversión de EEH. De esta
10 forma se puede reducir la conversión de EEH en aproximadamente 1/3 o 1/2 en el tiempo, obteniéndose la finalización en aproximadamente 24 h en lugar de 72 h dependiendo de la variante SHC usada.

Ejemplo 5: ciclación de E,E-bishomofarnesol a óxido de Ambra

15 ***Síntesis de Bishomofarnesol***

El bishomofarnesol se produjo como una mezcla de dos isómeros, como se indica en la Figura 10.

Etapas 1:

Se cargaron el compuesto 1 de la Figura 10 (E-Nerolidol)
20 (700.0 g, 3.148 mol, 1.0 equivalente), etil vinil éter (703.7 g, 9.758 mol, 3.1 equivalentes) y ácido fenilfosfónico (2.1 g, 0.0132 mol, 0.004 equivalentes) a un autoclave y la mezcla se calentó a 180°C durante 2.5 h. (Nota: La presión interna se elevó a 14 bar). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura
25 ambiente, se descargó de la autoclave y se concentró a presión

reducida para eliminar el exceso de etil vinil éter. El producto en bruto se diluyó con MTBE (1,400 mL), se lavó con HCl 2.0 M (2 x 700 mL), agua (500 mL) y salmuera (500 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se pasó a través de un tapón de sílice y luego se destiló para obtener el compuesto 2 de la Figura 10 (líquido amarillo, 483.0 g, 61.7%).

Etapas 2:

Se adicionó el compuesto 2 (420.0 g, 1.6907 mol, 1.0 equivalente) en THF (5 Vol) a una solución agitada de Red-Al (283.26 g, 0.980 mol, 0.58 equivalentes, 70% en tolueno) a 0°C durante un período de 2.0 h. La mezcla de reacción se agitó durante la noche y se controló por TLC. Una vez completada, la reacción se apagó lentamente usando una solución de NaOH al 10% (670.0 ml) a 0°C y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, la mezcla de reacción se diluyó con agua helada (2 L) y se extrajo con MTBE (2 x 3 L). La capa orgánica combinada se lavó con agua (1 x 2 L) y salmuera (1 x 2 L) y se secó sobre sulfato de sodio. La capa orgánica se concentró al vacío para obtener el compuesto en bruto, que se purificó por destilación al vacío para proporcionar E,E/Z-Bishomofarnesol (líquido amarillo pálido, 280.0 g, 66.1%).

El bishomofarnesol se produjo como una mezcla de isómeros con una relación E,E:E,Z de aproximadamente 80:20.

Ciclación de E,E-bishomofarnesol a óxido de Ambra

Las nuevas variantes de SHC producidas se usaron en la bioconversión de bishomofarnesol (mezcla de E,E- y E,Z-bishomofarnesol) en óxido de Ambra. Se identificaron los productos de reacción en la Figura 11:

Ciclación a 4 g/L de E,E-Bishomofarnesol

La actividad de las variantes se probó en condiciones de reacción individualmente definidas como óptimas y como se establece en la Tabla 7 anterior (temperatura, pH, concentración de SDS). Las reacciones (volumen de 5 mL) contuvieron 4 g/L de E,E-bishomofarnesol como sustrato. Las células que habían producido las variantes de SHC se adicionaron a una OD_{650nm} de 10.0 para iniciar la reacción. Las reacciones se incubaron en un dispositivo Heidolph Synthesis 1 Liquid 16 con agitación constante (900 rpm).

Bioconversión a 125 g/L de E,E-Bishomofarnesol

Se preparó una reacción típica (150 g de volumen total) en fermentadores Infors de 0.75 litros como se muestra en el Ejemplo 4, pero cargando las reacciones con 125 g/L de E,E-Bishomofarnesol en lugar de E,E-Homofarnesol. Las reacciones se llevaron a cabo a 35°C con agitación constante (700 rpm) y pH 5.4 en amortiguador de ácido succínico/NaOH 0.1 M con todas las variantes de SHC.

Resultados - Ciclación a 4 g/L de E,E-Bishomofarnesol

Se observó un aumento significativo en la actividad con las variantes de la enzima SHC/HAC #65, #66 y #110B8 con

respecto a la variante de la enzima madre 215G2 SHC/HAC. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Resultados - Bioconversión a 125 g/L de E,E-Bishomofarnesol

La conversión de E,E-Bishomofarnesol se muestra en la Figura 6. Se observó un aumento en la conversión con cada una de las variantes probadas. A las 72 horas de reacción con todas las variantes de SHC, la conversión de E,E-BisHF fue de 95% o superior. Con las variantes SHC #66 o 110B8 SHC se obtuvo una conversión de 95% en aproximadamente 48 horas de reacción, es decir, solo 2/3 del tiempo requerido al correr la bioconversión con la enzima original 215G2 SHC.

La reacción se extrajo 5 veces con 100 mL de MTBE mediante agitación vigorosa seguido de separación de fases por centrifugación (6,000 g, 10 min, temperatura ambiente). Esto permitió una extracción casi total del producto de reacción según se juzga a partir del análisis CG de las fases de solvente recuperadas.

Las variantes probadas con E,E-Bishomofarnesol mostraron una actividad mejorada sobre la enzima original 215G2 SHC, aunque las condiciones de reacción no se establecieron en condiciones de pH y temperatura definidas como óptimas para las nuevas variantes de SHC. Se anticipa que se observe un aumento adicional en la actividad cuando el pH y la temperatura se establezcan en los valores determinados como óptimos con las variantes individuales como se establece en el Ejemplo

anterior.

Resultados - identidad de los productos de reacción

Compuesto X, óxido de Ambra

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3.71-3.59 (m, 2H), 1.76 (dt, $J=11.7$, 3.8 Hz, 1H), 1.71-1.57 (m, 6H), 1.46-1.24 (m, 6H), 1.26 (s, 3H), 1.15 (td, $J=13.2$, 4.2 Hz, 1H), 0.97 (dd, $J=13.2$, 4.2 Hz, 1H), 0.89-0.85 (m, 1H), 0.88 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.76 (s, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 74.67, 60.89, 57.81, 56.43, 42.10, 41.96, 38.97, 36.88, 33.36, 33.29, 27.68, 21.36, 19.94, 19.91, 18.60, 18.15, 15.60.

Compuesto XI

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 3.61-3.57 (m, 2H), 2.09 (td, $J=12.84$, 4.40 Hz, 1H), 1.82 (dt, $J=12.23$, 3.91 Hz, 1H), 1.70-1.62 (m, 2H), 1.60-1.33 (m, 7H), 1.39 (br s, 3H), 1.31-1.19 (m, 2H), 1.15-0.99 (m, 3H), 1.12 (br s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 31.74, 30.92, 26.64, 24.99, 21.91, 21.78, 20.96, 18.91.

Compuesto XII

RMN ^1H (600 MHz, BENCENO-d_6) δ ppm 4.94 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.38 (br t, $J=5.6$ Hz, 2H), 2.37 (br d, $J=12.4$ Hz, 1H), 1.94 (td, $J=12.8$, 4.1 Hz, 1H), 1.72-1.57 (m, 3H), 1.56-1.46 (m, 3H), 1.44-1.33 (m, 3H), 1.33-1.24 (m, 2H), 1.13 (td, $J=13.4$, 3.4 Hz, 1H), 0.96 (br d, $J=12.8$ Hz, 1H), 0.89 (td, $J=13.4$, 2.6 Hz, 1H), 0.85 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.72 (s, 3H), 0.62 (br s, OH). RMN ^{13}C (151 MHz, BENCENO-d_6) δ ppm 148.70,

106.52, 62.78, 56.57, 55.25, 42.11, 39.90, 38.92, 38.34, 33.70,
33.44, 32.03, 24.38, 21.58, 19.64, 19.55, 14.27.

Compuesto XIII

RMN ^1H (600 MHz, BENCENO- d_6) δ ppm 5.15 (br dd, $J=10.5$,
5 4.9 Hz, 1H), 3.32 (td, $J=13.2$, 3.4 Hz, 1H), 3.25-3.21 (m, 1H),
3.14-3.09 (m, 1H), 2.79 (qd, $J=12.3$, 4.9 Hz, 1H), 1.87-1.80
(m, 2H), 1.72 (s, 3H), 1.72-1.62 (m, 6H), 1.51-1.44 (m, 1H),
1.39-1.22 (m, 5H), 1.27 (s, 3H), 1.03 (td, $J=13.2$, 3.0 Hz, 1H),
0.93 (s, 3H), 0.77 (s, 3H). RMN ^{13}C (151 MHz, BENCENO- d_6) δ ppm
10 137.10, 123.6, 78.0, 56.79, 43.05, 42.11, 37.74, 35.0, 33.46,
29.20, 27.29, 24.57, 24.29, 23.48, 22.59, 20.27.

Ejemplo 6 - Conversión de EEH a (-)-Ambrox usando enzimas SHC de tipo salvaje

Las enzimas SHC de tipo salvaje enumeradas en la Tabla 8
15 a continuación se eligieron para probar su capacidad para
convertir E,E-Homofarnesol en (-)-Ambrox.

Tabla 8. Enzimas de escualeno hopeno ciclasa de tipo salvaje.

Escualeno hopeno ciclasa	Origen (microorganismo)	Número de archivo de nucleótido Europeo
AacSHC (SEC ID NO.: 1)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59449.1
ApaSHC1 (SEC ID NO.: 20)	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ASC07046.1
BjaSHC (SEC ID NO.: 13)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ABQ33590.1
TelSHC	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BAC09861.1

5

(SEC ID NO.: 19)		
ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11)	<i>Zymomonas mobilis</i>	AVZ42714.1
ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12)	<i>Zymomonas mobilis</i>	AAF12829.1
GmoSHC (SEC ID NO.: 14)	<i>Gluconobacter morbifer</i>	EHH69691.1

10

El biocatalizador se produjo a partir de cepas de *E. coli* transformadas con el pET-28a(+) que porta el gen para la producción de la enzima de tipo salvaje como se describe en el Ejemplo 1 anterior (producción de biocatalizador a pequeña escala).

15

20

Con cada uno de los biocatalizadores producidos, se investigó a grandes rasgos la influencia de las condiciones de pH, temperatura y concentración de tensioactivo. En una primera etapa, se realizó la optimización del pH, seguida de la [SDS] y la optimización de la temperatura. La confirmación de las condiciones de reacción optimizadas se realizó en un grupo adicional de reacciones (pH variable, temperatura y concentración de SDS) usando amortiguadores de ácido succínico/NaOH 0.1 M alrededor del valor de pH definido como óptimo:

25

*Optimización del pH: 4 g/L de EEH con 0.075% de SDS, células a una OD_{650nm} de 10, en amortiguador de ácido cítrico/fosfato de sodio pH 5.0 a 7.0 (1 mL de volumen total, 40°C, 900 rpm, Síntesis de Heidolph 1).

*[SDS] y optimización de la temperatura: 4 g/L de EEH, células a una OD_{650nm} de 10, en amortiguador de ácido cítrico/fosfato de sodio (1 mL de volumen total, 900 rpm, Síntesis de Heidolph 1), variación de [SDS] y temperatura a pH óptimo.

5 *confirmación de las condiciones de reacción: 4 g/L de EEH, células a una OD_{650nm} de 10, en amortiguador de ácido cítrico/fosfato de sodio (1 mL de volumen total, 900 rpm, Síntesis de Heidolph 1), [SDS], temperatura y pH como se requiera.

Las reacciones se corrieron durante 24 horas, se tomaron
10 muestras a lo largo del tiempo (t = 0, t = 3 h y t = 22 h), se extrajeron y analizaron su contenido de sustrato y producto, y se calculó la conversión de EEH como se describió anteriormente. Esto permitió evaluar aproximadamente la velocidad inicial de conversión de EEH con cada una de las
15 enzimas SHC de tipo salvaje, así como la conversión obtenida después de 22 horas de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo con 4 g/L de EEH y biocatalizador cargado a una OD_{650nm} de 10.0, a pH variable, temperatura y concentración de SDS.

Resultados

20 La Tabla 9 a continuación resume las condiciones determinadas como óptimas para cada una de las enzimas SHC de tipo salvaje probadas, así como la conversión de EEH obtenida a las 22 horas de reacción al aplicar condiciones de reacción
iniciales (35°C, pH 5.4, SDS al 0.070%) o condiciones de
25 reacción optimizadas individualmente. Se observó una

conversión de EEH a (-)-Ambrox con todas estas enzimas, aunque en niveles significativamente variables. La conversión de EEH fue más alta cuando las células de *E. coli* producían SHC de *B. japonicum* y SHC1 de *Zymomonas mobilis*. De manera muy interesante, la conversión de EEH también se obtuvo con SHC2 de *Zymomonas mobilis*, para la cual se reportó en otra parte que esta enzima no cicla EEH.

Tabla 9. Condiciones de reacción optimizadas para enzimas escualeno hopeno ciclasa de tipo salvaje.

Escualeno hopeno ciclasa	Condiciones de reacción optimizadas			Conversión de EEH a 22 h (%)
	[SDS] (%)	T (°C)	pH	
AacSHC (SEC ID NO.: 1)	0.030	55	6.0	40.0
ApaSHC1 (SEC ID NO.: 20)	0.0075	45	5.2	9.2
BjaSHC (SEC ID NO.: 13)	0.0050	50	5.8	16.5
TelSHC (SEC ID NO.: 19)	0.0075	45	6.2-6.6	1.5
ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11)	0.005	40	5.0-5.4	70.3
ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12)	0.005	35	6.2-6.4	3.2
GmoSHC (SEC ID NO.: 14)	0.0075	40	5.6	12.2

Conversión de EEH obtenida en reacciones corridas a 4 g/L de EEH y con biocatalizador cargado a una OD_{650nm} de 10.0 aplicando condiciones de reacción optimizadas individualmente (T, pH, [SDS]).

Ejemplo 7 - Alineación de secuencias de SHC de tipo salvaje

Las secuencias de varios SHC de tipo salvaje se alinearon usando los parámetros especificados a continuación (usando los

elementos de programación ("software") Clone Manager 9). Los resultados se muestran en la tabla 10 a continuación y en la Figura 8.

Alineación: Alineación global de proteínas contra la molécula de referencia

Parámetros: Matriz de puntuación: BLOSUM 62

Molécula de referencia: Aac SHC, Región 1 a 631

Longitud total de secuencias alineadas con espacios: 838
aas

Tabla 10. Porcentaje de identidad de secuencia SHC en relación con WT AacSHC

Secuencia	Inicio	Fin	Igualación	No igualación	% de igualación
AacSHC (SEC ID NO.: 1)	1	631	-	-	-
TelSHC (SEC ID NO.: 19)	1	642	285	360	44
ApaSHC1 (SEC ID NO.: 20)	1	720	296	430	40
ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11)	1	725	299	434	40
ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12)	1	658	251	410	37
BjaSHC (SEC ID NO.: 13)	1	684	296	397	42
GmoSHC (SEC ID NO.: 14)	1	685	291	396	42

-: no aplica

Ejemplo 8 - Condiciones de reacción óptimas con variantes de SHC

Métodos

Se introdujeron mutaciones adicionales en 215G2 SHC que producen variantes [215G2 + V174I], [215G2 + V174I + F601], [215G2 + L37Q] y [215G2 + L37Q + V174I]. La alineación de

secuencias de estas variantes se muestra en la Figura 8.

Las condiciones de reacción óptimas para estas variantes se investigaron como se describe en los Ejemplos anteriores. A continuación, se probó su rendimiento en la ciclación de EEH a 4 g/L de sustrato con células cargadas para la reacción a una OD_{650nm} de 10.0.

Resultados

Las condiciones de reacción (temperatura, pH, concentración de SDS) listadas en la Tabla 11 a continuación parecían ser las condiciones de reacción óptimas individuales para la actividad de ciclación de las variantes mencionadas anteriormente. Las variantes con nuevas mutaciones mostraron aproximadamente la misma actividad que 215G2 SHC, o una mayor actividad que puede correlacionarse con mayores niveles de producción de SHC.

Tabla 11. Condiciones de reacción óptimas para las enzimas variantes de SHC.

Variante de enzima SHC/HAC	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	[SOS] óptima (% peso/peso)
215G2 + L37Q (SEC ID NO.: 24)	40	5.8	0.070
215G2 + V174I (SEC ID NO.: 25)	50	5.2-5.4	0.040
215G2 + V174I + F601Y (SEC ID NO.: 26)	40-50	5.2-5.6	0.030-0.070
215G2 + L37Q + V174I + F601Y (SEC ID NO.: 27)	35	5.4-5.8	0.070

Ejemplo 9 - Productos de reacción

Métodos

Se realizaron reacciones de 5 mL de volumen con 4 g/L de EEH y biocatalizador cargado a una OD_{650nm} de 10.0 a pH, temperatura y concentración de SDS definidos como óptimos para cada enzima y bajo agitación constante (Síntesis de Heidolph 1 dispositivo líquido, 900 rpm).

Resultados

La Tabla 12 ilustra la conversión de EEH después de 20 h con cada enzima y la distribución resultante de los productos de reacción. Los compuestos de las fórmulas (I) ((-)-Ambrox) y (IV) resultan de la ciclación EEH, los compuestos de las fórmulas (II) (Macrociclo) y (III) (9b-epi-Ambrox) resultan de la ciclación de EZH. El homofarnesol usado fue una mezcla de isómeros (EEH:EZH 80:20).

Se observa que todas las enzimas WT SHC y, en particular, WT ZmoSHC1, BjaSHC, GmoSHC, ApaSHC1 a niveles de conversión de aproximadamente 9% o superiores muestran una mayor selectividad hacia EEH en comparación con WT AacSHC. Esto resultó en una mayor proporción de compuestos (I) y (IV) en comparación con los compuestos (II) y (III) en el producto de reacción y también se tradujo en una relación de conversión EEH:EZH más alta.

Tabla 12. Conversión de una mezcla EEH/EZH con enzimas SHC de tipo salvaje (WT).

Enzima SHC	Conversión de EEH (%)	Productos de reacción (% de productos de reacción totales)					
		I	II	III	IV	I+IV	II+III
AacSHC	40.4	93.5	1.0	4.8	0.7	94.2	5.8
TelSHC1	1.6	94.8	2.0	1.7	1.4	96.2	3.8
ApaSHC1	9.3	98.6	0.3	0.9	0.2	98.8	1.2
ZmoSHC1	70.3	98.1	0.6	1.1	0.2	98.3	1.7
ZmoSHC2	3.2	98.5	0.3	0.9	0.4	98.8	1.2
BjaSHC	16.2	98.0	0.5	1.0	0.5	98.5	1.5
GmoSHC	11.9	98.3	0.5	0.8	0.4	98.7	1.3

Ejemplo 10 - Productividad volumétrica

Se usaron nuevas variantes de SHC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* para mejorar la ciclación de E,E-homofarnesol a (-)-Ambrox en bioconversiones corridas a 125 g/L de E,E-homofarnesol y con 250 g/L de células como se establece en el Ejemplo 4. Se abordó la reducción del tiempo de reacción para la conversión total de EEH en bioconversiones corridas a 125 g/L con 250 g/L de células.

Métodos

Los biocatalizadores se produjeron como se describe en el Ejemplo 1 (fermentación). Las bioconversiones se corrieron como se establece en el Ejemplo 4 aplicando condiciones de temperatura y pH optimizadas individualmente para cada variante y como se establece en el Ejemplo 2, con la única excepción de que la concentración de SDS se fijó en 1.3% p/v

([SDS]:[células] relación de 0.052) con todas las variantes.

Resultados

Dependiendo de la variante SHC/HAC considerada, el tiempo requerido para la conversión completa de 125 g/L de E,E-homofarnesol a (-)-Ambrox con 250 g/L de células podría reducirse en 1/3 o 2/3, la conversión completa se logra en aproximadamente 48 o 24 horas en lugar de aproximadamente 72 horas con el biocatalizador SHC de referencia 215G2SHC (Figura 12).

La velocidad de reacción inicial aumentó en un factor de 1.4-1.8 con las nuevas variantes de SHC en comparación con el biocatalizador de referencia 215G2 SHC.

La productividad volumétrica definida como Ambrox producido por litro y por hora o como Ambrox producido por litro, por hora y por gramo de biocatalizador aumentó en un factor de 1.4-2.6 en comparación con una bioconversión de referencia con el biocatalizador 215G2SHC (Tabla 13).

Tabla 13. Productividad volumétrica.

Variante de SHC	[EEH] (g/L)	[células] (g/L)	Tiempo (h)	Conversión (%)	Productividad		Aumento (veces)
					(g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	(mg.l ⁻¹ .h ⁻¹ .g ⁻¹) ¹⁾	
215G2	125	250	68.5	95.9	1.75	7.0	-
#49	125	250	26.5	98.2	4.65	18.5	2.6
#65	125	250	30.5	98.7	4.10	16.2	2.3
#66	125	250	50	98.1	2.45	9.8	1.4
110B8	125	250	46	96.8	2.65	10.5	1.5

Conversión: conversión de EEH.

Ejemplo 11 - Productividad volumétrica

Se usaron nuevas variantes de SHC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* para mejorar la ciclación de E,E-homofarnesol a (-)-Ambrox en bioconversiones corridas a 125 g/L de E,E-homofarnesol y con 250 g/L de células como se establece en el Ejemplo 4. Se abordó la reducción de la carga de biocatalizador para la conversión total de EEH en bioconversiones realizadas a 125 g/L de sustrato.

10 **Métodos**

Los biocatalizadores se produjeron como se describe en el Ejemplo 1 (fermentación). Las bioconversiones se corrieron como se establece en el Ejemplo 4 aplicando condiciones de temperatura y pH optimizadas individualmente para cada variante y como se establece en el Ejemplo 2, con las únicas excepciones de que la concentración de células se fijó en 125 g/L y la concentración de SDS en 0.65% p/v (relación [SDS]:[células] de 0.052) con todas las variantes.

Resultados

20 Con los biocatalizadores que producen las nuevas variantes SHC/HAC SHC#49 y SHC#65, fue posible reducir la concentración de células en un factor de 2 de 250 a 125 g/L de células para una conversión total de EEH en 72 horas (Figura 13). La conversión de EEH con el biocatalizador de referencia 215G2
25 SHC fue solo de aproximadamente 67% en el mismo tiempo.

La productividad volumétrica definida como (-)-Ambrox producido por litro y por hora o como (-)-Ambrox producido por litro, por hora y por gramo de biocatalizador aumentó en un factor de aproximadamente 1.5 en comparación con el mismo experimento de bioconversión con el biocatalizador 215G2SHC como referencia (Tabla 14). Tomando una corrida de bioconversión con 125 g/L y 250 g/L de células con el biocatalizador de referencia 215G2 SHC, la productividad volumétrica aumentó en un factor de aproximadamente 2 (Tabla 14).

Tabla 14. Productividad volumétrica.

Varian te de SHC	[EEH] (g/L)	[células] (g/L)	Tiempo (h)	Conversión (%)	Productividad		Aumento (veces)	
					(g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	(mg.l ⁻¹ .h ⁻¹ .g ⁻¹)		
215G2	125	125	72	66.7	1.16	9.3	-	n.a.
215G2	125	250	68.5	95.9	1.75	7.0	n.a.	-
#49	125	125	72	95.0	1.65	13.2	1.4	1.9
#65	125	125	72	98.5	1.70	13.7	1.5	2.0

Conversión: conversión de EEH. n.d.: no aplicable.

Ejemplo 12 - Productividad volumétrica

Se usaron nuevas variantes de SHC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* para mejorar la ciclación de E,E-homofarnesol a (-)-Ambrox en bioconversiones realizadas a 125 g/L de E,E-homofarnesol y con 250 g/L de células como se establece en el Ejemplo 4. Se abordó la concentración de EEH en las bioconversiones.

Métodos

El biocatalizador se produjo como se describe en el Ejemplo 1 (fermentación). Las bioconversiones se realizaron como se establece en el Ejemplo 4, pero con una relación EEH a biocatalizador de 1:1, y una relación constante [SDS]:[células] de 0.052. Las condiciones de temperatura y pH optimizadas se definieron como óptimas para el biocatalizador SHC#65 (Ejemplo 2).

Resultados

Con la nueva variante SHC/HAC SHC#65 fue posible convertir completamente hasta 300 g/L de EEH con 300 g/L de biocatalizador en 48 h (Figura 14).

La productividad volumétrica definida como Ambrox producido por litro y por hora aumentó entre 2.3-3.4 veces. La productividad volumétrica definida como Ambrox producido por litro, por hora y por gramo de biocatalizador aumentó en un factor de 2.8-2.9. El aumento en veces se refiere a un proceso de reacción a 125 g/L de EEH con 250 g/L de células usando biocatalizador 215G2SHC (Tabla 15).

Tabla 15. Productividad volumétrica.

Variante de SHC	[EEH] (g/L)	[células] (g/L)	Tiempo (h)	Conversión (%)	Productividad		Aumento (veces)
					(g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	(mg.l ⁻¹ .g ⁻¹ .h ⁻¹)	
215G2	125	250	68.5	95.9	1.75	7.0	-/-
#65	125	250	25.5	99.2	4.9	19.5	2.8/2.8

5

Variante de SHC	[EEH] (g/L)	[células] (g/L)	Tiempo (h)	Conversión (%)	Productividad		Aumento (veces)
					(g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	(mg.l ⁻¹ .g ⁻¹ .h ⁻¹)	
#65	200	200	48	97.7	4.1	20.5	2.3/2.9
#65	250	250	48	93.8	4.9	19.5	2.8/2.8
#65	300	300	48	94.4	5.9	20.0	3.4/2.8

Conversión: conversión de EEH

Ejemplo 13 - Ciclación de EEH con enzimas wt SHC

Métodos

10 Biocatalizadores de las enzimas SHC de tipo salvaje AacSHC (*Alicyclobacillus acidocaldarius* SHC, SEC ID NO.:1), GmoSHC (*Gluconobacter morbifer* SHC, SEC ID NO.: 14), BjpSHC (*Bradyrhizobium japonicum* SHC, SEC ID NO.: 13), ApaSHC1 y ApaSHCA (*Acetobacter pasteurianus* SHC1 y SHCA, SEC ID NO.: 20
15 y 30 respectivamente), ZmoSHC1 y ZmoSHC2 (*Zymomonas mobilis* SHC1 y SHC2, SEC ID NO.: 11 y 12 respectivamente), SalSHC (*Streptomyces albolongus* SHC, SEC ID NO.: 29), TelSHC (*Thermosynechococcus elongates*, SEC ID NO.: 19) y de BmeSHC (*Bacillus megaterium* SHC, SEC ID NO.: 28), se produjeron en
20 fermentaciones como se describe en el Ejemplo 1.

Estas enzimas SHC de tipo salvaje (también enumeradas en la Tabla 16 a continuación) se eligieron para probar su capacidad para convertir E,E-Homofarnesol en (-)-Ambrox.

25

Tabla 16. Enzimas de escualeno hopeno ciclasa de tipo salvaje.

	Escualeno hopeno ciclasa	Origen (microorganismo)	Número de archivo de nucleótido Europeo o Acceso Genbank Número
5	AacSHC (SEC ID NO.: 1)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59449.1
	ApaSHC1 (SEC ID NO.: 20)	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ASC07046.1
	BjaSHC (SEC ID NO.: 13)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ABQ33590.1
10	TelSHC (SEC ID NO.: 19)	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BAC09861.1
	ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11)	<i>Zymomonas mobilis</i>	AVZ42714.1
	ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12)	<i>Zymomonas mobilis</i>	AAF12829.1
15	GmoSHC (SEC ID NO.: 14)	<i>Gluconobacter morbifer</i>	EHH69691.1
	BmeSHC (SEC ID NO.: 28)	<i>Bacillus megaterium</i>	WP_016763969
	Sal SHC (SEC ID NO.: 29)	<i>Streptomyces albolongus</i>	AZN28579
20	ApaSHCA (SEC ID NO.: 30)	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	WP_003625617

Las condiciones de reacción óptimas se investigaron con el biocatalizador BmeSHC como se establece en el Ejemplo 6 para otras enzimas SHC. Las condiciones de reacción óptimas se definieron como 45°C, pH 5.6 y con 0.0025% p/v de SDS para una

25 carga de célula de OD_{650nm} de 10 en la reacción.

Las condiciones de reacción óptimas con SalSHC fueron a 30°C, pH 7.0 sin adición de tensioactivo a la reacción (Liu *et al.*, (2020): A Novel Soluble Squalene-Hopene Cyclase and Its Application in Efficient Synthesis of Hopene, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol 8, Artículo 426, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00426>).

La actividad de los biocatalizadores resultantes se probó tanto a 4 g/L de EEH como a 125 g/L de EEH con la única excepción de SalSHC en donde se usó 1 g/L de EEH en lugar de 4 g/L de EEH.

La prueba de actividad con 4 g/L de EEH (SalSHC: 1 g/L de EEH) contuvo células a una OD_{650nm} de 10 (biocatalizador SalSHC: OD_{650nm} de 40) y, por lo demás, se llevó a cabo como se establece en el Ejemplo 6 aplicando condiciones de temperatura y pH optimizadas individualmente para cada enzima SHC.

Las bioconversiones a 125 g/L de EEH se corrieron con 250 g/L de células como se establece en el Ejemplo 4 aplicando condiciones de temperatura y pH optimizadas individualmente para cada enzima SHC y como se establece en el Ejemplo 6. Las reacciones contuvieron 1.3% p/v de SDS con AacSHC, 0.16% p/v con BjpSHC, ZmoSHC1, ApaSHC1, 0.10% p/v con BmeSHC y 0.14% p/v con GmoSHC. No se realizaron bioconversiones a 125 g/L de EEH con los biocatalizadores ApaSHCA, TelSHC, SalSHC y ZmoSHC2.

Resultados

Se observó ciclación de EEH a (-)-Ambrox con todos los

biocatalizadores SHC probados a baja concentración de sustrato (1 o 4 g/L). Con los biocatalizadores SHC de tipo salvaje probados a 125 g/L de EEH, la conversión de EEH estuvo entre aproximadamente 15% y aproximadamente 75% (Figura 15).

5 Ejemplo 14 - Alineación de secuencias de enzimas SHC de tipo salvaje

La identidad de secuencia de las enzimas SHC en relación con WT AacSHC se determinó con los elementos de programación ("software") Clone Manager 9 con los parámetros especificados a continuación o con blastp usando los parámetros predeterminados. Los resultados se resumen en las Tablas 17A y 17B, respectivamente.

Alineación: Alineación global de proteínas contra la molécula de referencia

15 Parámetros: Matriz de puntuación: BLOSUM 62

Molécula de referencia: Aac SHC, Región 1 a 631

Longitud total de secuencias alineadas con espacios: 838 aas

Tabla 17A. Porcentaje de identidad de secuencia SHC en relación con WT AacSHC.

20	Secuencia	Inicio	Fin	Igualación	No igualación	% de igualación
	AacSHC (SEC ID NO.: 1)	1	631	-	-	-
	TelSHC (SEC ID NO.: 19)	1	642	285	360	44
25	paSHC1 (SEC ID NO.: 20)	1	720	296	430	40

5

10

IZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11)	1	725	299	434	40
IZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12)	1	658	251	410	37
BjaSHC (SEC ID NO.: 13)	1	684	296	397	42
GmoSHC (SEC ID NO.: 14)	1	685	291	396	42
BmeSHC (SEC ID NO.: 28)	1	625	194	443	30
SalSHC (SEC ID NO.: 29)	1	691	327	367	47
ApaSHCA (SEC ID NO.: 30)	1	656	259	403	39

—: no aplica. Identidad de secuencia determinada con los elementos de programación ("software") Clone Manager 9.

Tabla 17B. Porcentaje de identidad de secuencia SHC en relación con WT AacSHC.

15

20

25

Enzima SHC/SEC ID	% de identidad
AacSHC (SEC ID NO.: 1)	—
TelSHC (SEC ID NO.: 19)	45.3
ApaSHC1 (SEC ID NO.: 20)	43.5
ZmoSHC1 (SEC ID NO.: 11)	45.3
Enzima SHC/SEC ID	% de identidad
ZmoSHC2 (SEC ID NO.: 12)	39.2
BjaSHC (SEC ID NO.: 13)	44.3
GmoSHC (SEC ID NO.: 14)	43.9
BmeSHC (SEC ID NO.: 28)	31.4
SalSHC (SEC ID NO.: 29)	51.8
ApaSHCA (SEC ID NO.: 30)	39.9

-: no aplica. Identidad de secuencia determinada con blastp.

Ejemplo 15 - Alineación de secuencias de SHC de tipo salvaje

Las secuencias de SHC de tipo salvaje descritas en las Tablas 16-18 se alinearon usando Clustal O (1.2.4). Los
5 alineamientos de múltiples secuencias se proporcionan en las Figuras 9A y 9B y el porcentaje de identidad entre las secuencias (como se determina usando blastp) se proporciona en la Tabla 19.

**Tabla 18. Matriz de identidad de secuencia calculada con
10 blastp.**

	% de identidad	Aac SHC	Bjp SHC	Bme SHC	Gmo SHC	Apa SHCA	Apa SHC1	Sal SHC	Tel SHC	Zmo SHC1	Zmo SHC2
	AacSHC	100									
	BjpSHC	44.3	100								
	BmeSHC	31.4	28.1	100							
15	GmoSHC	43.9	71.6	30.5	100						
	ApaSHCA	39.9	36.8	30.7	37.1	100					
	ApaSHC1	43.5	69.4	29.7	75.8	37.2	100				
	% de identidad	Aac SHC	Bjp SHC	Bme SHC	Gmo SHC	Apa SHCA	Apa SHC1	Sal SHC	Tel SHC	Zmo SHC1	Zmo SHC2
	SalSHC	51.8	43.4	31.3	42.6	39.3	42.4	100			
20	TelSHC	45.3	39.3	30.4	39.1	40.5	39.2	44.4	100		
	ZmoSHC1	45.3	69.6	30.8	76.7	36.8	76.8	45	39.5	100	
	ZmoSHC2	39.2	36.8	32.1	35.3	55.1	35.2	42	41.4	36.8	100

Ejemplo 16 - Influencia de las condiciones de cultivo sobre la actividad específica del biocatalizador.

Métodos

25 Como alternativa a los métodos de producción de

biocatalizadores descritos en el Ejemplo 1 (cultivo y fermentación en matraces agitados), se probó la producción de biocatalizadores usando un medio auto-inductor (AIM). El medio se preparó usando una base de caldo AIM-TB que incluye
5 elementos traza (Formedium). Se enriquecieron 25 mL de AIM-TB en un matraz de agitación con mamparas de 100 mL con glicerol al 1%. El cultivo se inoculó a una OD_{650nm} de $2E-07$; el cultivo duró 18 ± 1 h a $37^{\circ}C$ bajo agitación constante (220 rpm).

La actividad de los biocatalizadores colectados se probó
10 en la prueba de actividad estándar a 4 g/L de E,E-homofarnesol, células a una OD_{650nm} de 10 como se establece en el Ejemplo 2, y aplicando temperatura, pH y [SDS] óptimos por lo demás como se describe en los Ejemplos 2 y 6 dependiendo de la enzima SHC considerada.

15 **Resultados**

La actividad del biocatalizador SHC considerado varió fuertemente dependiendo del medio de cultivo y las condiciones para la producción del biocatalizador (Tabla 19). De la misma manera, se espera que la producción de biocatalizadores usando
20 protocolos de fermentación alternativos o modificados resultará en biocatalizadores con una actividad específica menor o mayor que cuando se producen aplicando el protocolo de fermentación descrito en el Ejemplo 1.

Tabla 19. Influencia del método de cultivo en la conversión de EEH.

Biocatalizador de SHC	Matraz agitado AIM-TB	Conversión de EEH a 24 h (%)	
		Matraz de agitación medio mínimo	Fermentador medio mínimo
SHC 65	41-70	n.d.	100
ZmoSHC1	41-57	60-70	91
BjpSHC	11-26	14-17	90
ApaSHC1	24-35	4-9	94

n.d.: no determinado.

Ejemplo 17 - Influencia de la relación [SDS]:[células] en la conversión de EEH

Métodos

El biocatalizador se produjo como se indica en el Ejemplo 1 (fermentación) a partir de la cepa de *E. coli* que produce la enzima variante SHC SHC#65. Las bioconversiones de EEH se corrieron como se establece en el Ejemplo 4, pero con 125 g/L de EEH y 150 g/L de células. Las reacciones se realizaron a pH 5.6 y 45°C definido como óptimo para SHC#65. La SDS en las reacciones varió de 0.060, 0.066, 0.072, 0.078, 0.084 y 0.090% resultando en una relación [SDS]:[células] de: 0.040, 0.044, 0.048, 0.052, 0.056 y 0.060, respectivamente.

Resultados

La conversión de EEH fue en todas las reacciones >85%, y la conversión máxima se obtuvo en una relación [SDS]:[células]

que oscilaba entre 0.044 y 0.056. Con una relación [SDS]:[células] de 0.040 y 0.060, la conversión fue ligeramente menor (Figura 16).

Lo anterior describe ampliamente algunas modalidades de la presente invención sin limitación. Las variaciones y modificaciones, como resultarán fácilmente evidentes para los experimentados en la técnica, están destinadas para estar dentro del alcance de la presente invención, tal como se define en y por las reivindicaciones anexas.

10 **LISTADO DE SECUENCIAS**

SEC ID NO.: 1 (Secuencia de aminoácido de AacSHC de tipo salvaje)

15 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDVRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMPLNIEYFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYRHVFPTLALGRYKQAIER
R

SEC ID NO.: 2 (Secuencia de aminoácido de la variante de enzima SHC/HAC #49)

20 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDVRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMPLNIEYFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNLTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTTWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYRHVFPTLALGRYKQAIER
R

25 SEC ID NO.: 3 (Secuencia de aminoácido de la variante de enzima

SHC/HAC #65)

5 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDREVDRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMPPLNIYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DNDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTTWAL
MALIAGGRAESEAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYSHVFPTLALGRYKQAIER
R

SEC ID NO.: 4 (Secuencia de aminoácido de la variante de enzimaSHC/HAC #66)

10 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDREVDRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALHPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMPPLNIYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DNDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTTWAL
MALIAGGRAESEAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYSHVFPTLALGRYKQAIER
R

SEC ID NO.: 5 (Secuencia de aminoácido de la variante de enzima15 SHC/HAC #110B8)

20 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDREVDRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALHPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMPPLNIYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DNDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTTWAL
MALIAGGRAESEAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYRHVFPTLALGRYKQAIER
R

SEC ID NO.: 6 (Secuencia nucleotídica de la variante de enzima

SHC/HAC #49)

ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
 CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCGCTTCTGAGCAACGTACGATGGAAGCGGAGTACGT
 CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
 GAGCAGCGCGAGGACGGCAGCTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
 CGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTTCAT
 TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTCGCGCGTGTTCACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
 CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
 ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCTGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
 CCGCTGCCCCGAGCGGGCGCGCTGCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
 AAGGGAGGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGTGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTCCGGTGC
 ACCCGTTCCGCGCGCGCGCGGAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAG
 CTGGGGCGGGATTACGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
 CCGGCGTTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGCGGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
 TTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
 GGCCGATCAGCAGCGGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGGTTCCGGGCGAC
 TGGGCGGTGAAGCGCCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACGTGTAACCCGG
 ACGTGGACGACACGGCCGTCTGTGGTGTGGGCGCTCAACACCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
 GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTTGGGGCGCCTAC
 GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAACCTCACCCCGTTTCTGCGACTTCGCGGAAGTGACCGATCCGC
 CGTCAGAGGACGTCACCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCTTGGAAAGGT
 CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCCGGTCTGTGGGGC
 GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTTCGGGATCGACACGCGCGAGC
 CGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTTCGAGCAGCATCAGAACCAGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
 CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTTCGAGACGACCTGGGCGCTG
 ATGGCGCTCATCGCGGGCGCGAGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTCAATACCTCGTGGAGA
 CGCAGCGCCGGACGGCGGCTGGGATGAGCCGTACTACACGGCACGGGCTTCCAGGGGATTTCTACCT
 CGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
 AGGTGA

SEC ID NO.: 7 (Secuencia nucleotídica de la variante de enzima

SHC/HAC #65)

ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
 CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCGCTTCTGAGCAACGTACGATGGAAGCGGAGTACGT
 CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
 GAGCAGCGCGAGGACGGCAGCTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
 CGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTTCAT
 TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTCGCGCTGTTTACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
 CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
 ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCTGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
 CCCGCTGCCCGAGCGGGCGCGCTGCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
 AAGGGAGGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGTGTGCACGGGTATCAGAAGCTGTCCGGTGC

ACCCGTTCCGCGCGCGCGCGGAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAG
 CTGGGGCGGGATTACGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
 CCGGCGTTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGCGGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
 TTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
 GGCCGATCAGCAGCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGGTTCCGGGCGAC
 TGGGCGGTGAAGCGCCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACGTGTAACCCGG
 ACGTGGACGACACGGCCGTCTGTGGTGTGGGCGCTCAACACCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
 GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTGGGGCGCCTAC
 GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAACACACCCCGTTCTGCGACTTCGCGGAAGTGACCGATCCGC
 CGTCAGAGGACGTACCCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCTTGGAAAGGT
 CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCCGGTCTGTGGGGC
 GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTTCGGGATCGACACGCGCGAGC
 CGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTTCGAGCAGCATCAGAACCAGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
 CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTTCGAGACGACCTGGGCGCTG
 ATGGCGCTCATCGCGGGCGCGAGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTCAATACCTCGTGGAGA
 CGCAGCGCCCGGACGGCGGCTGGGATGAGCCGTACTACACGGCACGGGCTTCCAGGGGATTTCTACCT
 CGGCTACACCATGTACAGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
 AGGTGA

SEC ID NO.: 8 (Secuencia nucleotídica de la variante de enzima
 SHC/HAC #66)

5 ATGGCTGAGCAGTTGGTGGGAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
 CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGT
 CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
 GAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGCACCCGGGTGGGCCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
 CGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTTCAT
 TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTGCGCGGTGTTACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
 CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTCCCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
 ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
 CCCGCTGCCCCGAGCGGGCGCGCGTCCCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
 AAGGGAGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGTGTGTCACGGGTATCAGAAGCTGTCGGTGC
 ACCCGTTCCGCCGCGCGGCCGAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAG
 CTGGGGCGGGATTACAGCCGCCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
 CCGGCGTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
 10 TTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
 GGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGTTCCGGGCGAC
 TGGGCGGTGAAGCGCCCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGG
 ACGTGGACGACACGGCCGTCGTGGTGTGGGCGCTCAACACCCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
 GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTGGGGCGCCTAC
 GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAACACACCCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGC
 CGTCAGAGGACGTCACCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCCTGGAAGGT
 CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCGGTTCGTTGGGGC
 GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTGCGGATCGACACGCGCGAGC
 CGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
 CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTTCGAGACGACCTGGGCGCTG
 15 ATGGCGCTCATCGCGGGCGGCAGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTGAATACCTCGTGGAGA
 CGCAGCGCCCGGACGGCGGTGGGATGAGCCGTACTACACCGGCACGGGCTTCCAGGGGATTTCTACCT
 CGGCTACACCATGTACAGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
 AGGTGA

20

25

SEC ID NO.: 9 (Secuencia nucleotídica de la variante de enzima
SHC/HAC #110B8)

5 ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
 CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGT
 CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
 GAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGCACCCGGGTGGGCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
 CGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCCGTCCGGTTCAT
 TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTCGCGCGTGTTCACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
 CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
 ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
 CCCGTGCCCCGAGCGGGCGCGCGTGCCTCGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
 AAGGAGGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTGACCCGGGTGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTCGGTGC
 AACCGTTCCGCCGCGCGGCCGAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGAGACGGCAG
 CTGGGGCGGGATTACGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
 CCGGCGTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
 TTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
 GGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTGGACCGGCAGATCACGGTTCCGGGCGAC
 10 TGGGCGGTGAAGCGCCCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGG
 ACGTGGACGACACGGCCGTCTGTTGTGGGCGCTCAACACCCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
 GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTTGGGGCGCCTAC
 GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAACCTCACCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGC
 CGTCAGAGGACGTCACCGCCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCCTGGAAGGT
 CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCGGTTCGTTGGGGC
 GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTTCGGGATCGACACGCGCGAGC
 CGTACATTCAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
 CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTCGACAGACGACCTGGGCGCTG
 ATGGCGCTCATCGCGGGCGGCAGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGCGGTGCAATACCTCGTGGAGA
 CGCAGCGCCCGGACGGCGGTGGGATGAGCCGTACTACACCGGCACGGGCTTCCAGGGGATTCTACCT
 15 CGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
 AGGTGA

SEC ID NO.: 10 (Secuencia de aminoácido de la variante de
enzima Aac215G2 SHC/HAC)

20 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDRDRMEKIRRYLLH
 EQREDGTWALYPGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
 PWEKVPMVPPEIMFLGKRMLNIYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
 KGGGGWIFDALDRVLHGYYQLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQQPPWFYALIALKILDMTQH
 PAFIKGWEGLYGVLDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
 WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
 DVDNTSDLPNHTPFCDGFEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLRKQKPDGSWFGRWG
 VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPIYQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
 MALIAGGRAESEAAARGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYRHVFPTLALGRYKQAIER
 R

25

SEC ID NO.: 11 (Secuencia de aminoácido de ZmoSHC1 de tipo salvaje)

5 MGIDRMNSLSRLLMKKIFGAEKTSYKPASDTIIGTDTLKRPNRRPEPTAKVDKTIFKTMGNSLNNTLVSA
CDWLIQGOQKPDGHWVGAVESNASMEAEWCLALWFLGLEDHPLRPRLGNALLEMQREDGSGWGVYFGAGNGD
INATVEAYAALRSLGYSADNPVLKKAIAEWAEKGGGLKNIRVFTRYWLALIGEWPEKTPNLPPEIIWFPD
NEVFSIYNFAQWARATMVP IAILSARRPSRPLRPQDRLDELFP EGRARFDYELPKKEGIDLWSQFFRTTD
RGLHWVQSNLLKRNSLREAAIRHVLEWII RHQDADGGWGGIQQPPWVYGLMALHGEQYQLYHPVMAKALSA
LDDPGWRHHRGESSWIQATNSPVWDTMLALMALKDAKAEDRFTPEMDKAADWLLARQVKVKGDWSIKLPD
VEPGGWAFEYANDRYPD TDDTAVALIALSSYRDKEEWQKKGVEDAITRGVNWLIAMQSEC GGWGAFFDKDN
NRSILSKIPFCDFGESIDPPSVDVTAHVLEAFGTGLGSRDMPVIQKAIDYVRSEQEAEGAWFGRWGVNYI
YGTGAVLPALAAIGEDMTQPYITKACDWLVAHQQEDGGWGESCSSYME

SEC ID NO.: 12 (Secuencia de aminoácido de ZmoSHC2 de tipo salvaje)

10 MTVSTSSAFHHSPLSDDVEPIIQKATRALLEKQQQDGHWWFELEADATIPA EYILLKH YLGEPEDLEIEA
KIGRYLRRRIQGEHGGWSLFYGGDLDSLATVKAYFALKMIGDSPDAPHMLRARNEILARGGAMRANVFTRI
QLALFGAMSWEHVPQMPVELMLMPEWFPVHINKMAYWARTVLVPLLVLQALKPVARNRGILVDELFPD
VLPTLQESGDP IWRFFSALDKVLHKVEPYWPKNMRAKAIHSCVHFVTERLNGEDGLGAIYPAIANSVMM
YDALGYPENHPERA IARRAVEKLMVLDGTEDQGDKEVYCQPCLSPIWDTALVAHAMLEVGGDEAEKSAIS
ALSWLKPQQIILDVKGDAWRRPDLRPGGWAFQYRNDYYPDVDDTAVVTMAMDRAAKLSDLHDDFEESKAR
AMEWTIGMQSDNGGWGAFDANNSYTYLNNIPFADHGALLDPPTVDVSARCVSMMQAAGISITDPKMKAAV
DYLLKEQEEDGSWFGRWGVNYIYGTWSALCALNVAALPHDHLAVQKAVAWLKT IQNEDGGWGENCDSYAL
DYSGYEPMDSQTAWALLGLMAVG EANSEAVTKGINWLAQNQDEEGLWKEDYSSGGGFPRVFYLYRHG
YSKYFPLWALARYRNLLKANQPIVHYGM

15 SEC ID NO.: 13 (Secuencia de aminoácido de BjpSHC de tipo salvaje)

20 MTVTSSASARATRDPGNYQTALQSTVRAAADWLIANQKPDGHWVGRAESNACMEAQWCLALWFMGLEDH
LRKRLGQSLDSQRPDGAWQVYFGAPNGDINATVEAYAALRSLGFRDDEPAVRRAREWIEAKGGLRNIRV
FTRYWLALIGEWPEKTPNIPPEVIWFPLWFFPSIYNFAQWARATLMP IAVLSARRPSRPLPPENRLDAL
FPHGRKAFDYELPVKAGAGGWD RFFRGADKVLHKLQNLGNRLNLGLFRPAATSRVLEWMIRHQDFDGA
WG IQQPPWIYGLMALYAEGYPLNHPVLAKGLDALNDPGWRVDVG DATYIQATNSPVWDTILTLLAFDDAGVL
GDYPEAVDKAVDWVLQRQVRVPGDWSMKLPHVKPGGWAF EYANNYPDTDDTAVALIALAPLRHDPKWKA
KGIDEAIQLGVDWLIGMQSQGGGWGAFFDKDNNQKILTKIPFCDYGEALDPPSVDVTAHII EAFGKLGISR
NHP SMVQALDYIRREQEPSPGWFGWGVNYVYGTGAVLPALAAIGEDMTQPYIGRACDWLVAHQQADGGW
GESCASYMDVSAVGRGTTTASQTAWALMALLAANRPQDKDAIERGCMWLVERQSAGTWDEPEFTGTGFP
G YGVGQTIKLNLPALSQRLMQGP ELSRAFMLRYGMYRHYFPLMALGRALRPQSHS

25

SEC ID NO.: 14 (Secuencia de aminoácido de GmoSHC de tipo salvaje)

5 MSPADISTKSSSFQRLDNMLPEAVSSACDWLIDQQKPDGHWVGPVESNACMEAQWCLALWFLGQEDHPLR
PRLAQALLEMQREDGSGWGIYVGADHGDINTTVEAYAALRSMGYAADMPIMAKSAAWIQQKGGLRNVRVFT
RYWLALIGEWPWDKTPNLPPEIIWLDPDNFIFSIYNFAQWARATMMPLTILSARRPSRPLLPENRLDGLFP
EGRENFYELPVKGEEDLWGRFFRAADKGLHSLQSFVRRFVPREAAIRHVIEWIIRHQDADGGWGGIQP
PWIYGLMALSVGYPLHHPVLAKAMDALNDPGWRRDKGDASWIQATNSPVWDTMLAVLALHDAGAEDRYS
PQMDKAIGWLLDRQVRVKGDWSIKLPDTEPGGWAFEYANDKYPDTDDTAVALIALAGCRHRPEWRERDIE
GAISRGVNWLLAMQSSSGGWGAFDKDNNRSILTKIPFCDFGEALDPPSVDVTAHVLEAFGLLGISRNHPS
VQKALAYIRSEQERNGAWFGRWGVNYVYGTGAVLPALAAIGEDMTQPYIVRACDWLMSVQQENGWGWESC
ASYMDINAVGHGVATASQTAWALIGLLAAKRPKDREAIRGCQFLIERQEDGSWTEEEYTGTGFPGYGVG
QAIKLDPSLPDRLLQGAELSRAFMLRYDLYRQYFPMALSRARRMMKEDASAAA

SEC ID NO.: 15 (Secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido AacSHC de tipo salvaje)

10 ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAGCGCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGT
CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
GAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
CGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTTCAT
TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTGCGCGCTGTTACGCGGATGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCGAGCCGGTGT
CCCGCTGCCGAGCGGGCGCGCGTGGCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
AAGGGAGGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGCGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTGGGTGC
ACCCGTTCCGCGCGCGCGGCGGAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAG
15 CTGGGGCGGGATTACGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
CCGGCGTTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
TTCAGGCTTCCATCTCGCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
GGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGTTCCGGGCGAC
TGGGCGGTGAAGCGCCCAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGG
ACGTGGACGACACGGCCGTGTTGGTGTGGGCGCTCAACACCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGCGAGCG
GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTGGGGCGCCTAC
GACGTGACAAACACGAGCGATCTCCCGAACACATCCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGC
CGTCAGAGGACGTACCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCTTGAAGGT
CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCCGTGCTTGGGGC
GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTGCGGATCGACACGCGCGAGC
CGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCAACAGAACCGGACGGCGGCTGGGGCGAGGACATG
CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGTAAGGGCGCGAGCACCCGTCGCAGACGGCCTGGGCGCTG
20 ATGGCGCTCATCGCGGGCGGCAGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTGAATACCTCGTGGAGA
CGCAGCGCCCGGACGGCGGCTGGGATGAGCCGTACTACACCGGCACGGGCTTCCAGGGGATTTCTACCT
CGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
AGGTGA

25

SEC ID NO.: 16 (Secuencia nucleotídica que codifica la variante de enzima Aac 215G2 SHC/HAC)

5 ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGT
CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
GAGCAGCGCAGGACGGACAGTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
CGTACGTCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTCGCGGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTCAT
10 TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTGCGCGTGTTCACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCTGCGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
CCCGCTGCCCGAGCGGGCGCGCTGCCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
AAGGGAGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGTGTGCACGGGTATCAGAAGCTGTGGTGC
ACCCGTTCCGCGCGCGGGGATCCGCGCCTTGACTGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAG
CTGGGGCGGGATTTCAGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
CCGGCGTTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
TTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
GGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGGTTCGGGGCGAC
TGGGCGGTGAAGCGCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGG
15 ACGTGGACGACACGGCCGTCTGGTGTGGGCGCTCAACACCCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
GGACGCCATGACGAAGGATTCCGCTGGATTGTCGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTGGGGCGCCTAC
10 GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAACCACACCCCGTTCGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGC
CGTCAGAGGACGTACCCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCCTGGAAGGT
CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCGGTTCGTTGGGGC
GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTTCGGGATCGACACGCGCGAGC
CGTACATTCAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTCGAGACGGCCTGGGCGCTG
ATGGCGCTCATCGCGGGCGGAGGGCGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTGCAATACCTCGTGGAGA
CGCAGCGCCCGGACGGCGGTGGGATGAGCCGTACTACACGGCACGGGCTTCCCAGGGGATTTCTACCT
CGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
AGGTGA

15 SEC ID NO.: 17 (Secuencia de aminoácido de la variante de enzima SHC/HAC #90C7)

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMPPEIMFLGKRMP LNIYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHG YQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGI QPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGV ELDYGGWMFQASISPVDWTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEY LKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREP YIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYL VETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGFYLG YTMYSHVFP TLALGRYKQAIER
20 R

25

SEC ID NO.: 18 (Secuencia de aminoácido de la variante de enzima SHC/HAC #115A7)

5 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLL SNVTMEAEYVLLCHILDRVDRDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMP LNIYEFGSWARTTVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQQPPWFYALIALKILDKTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHTPFCDGFEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYKREQKPDGSGWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVTQRPDGGWDEPYTGTGFPDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIER
R

SEC ID NO.: 19 (Secuencia de aminoácido de TelSHC de tipo salvaje)

10 MPTSLATAIDPKQLQQAIRASQDFLFSQQYAEGYWAAELESNVTMTAEVILLHKIWGTEQRLPLAKAEQY
LRNHQRDHGGWELFYGDGDLSTSVEAYMGLRLLGVPETDPALVKARQFILARGGISKTRIFTKLHLALI
GCYDWRGIPSLPPWIMLLPEGSPFTIYEMSSWARSSTVPLLIIVMDRKPVYGMDDPITLDELYSEGRANVV
WELPRQGDWRDVFIGLDRVFKLFETLNIHPLREQGLKAAEEWVLERQEASGDWGGIIPAMLNSLLALRAL
DYAVDDPIVQRGMAAVDRFAIETETETERYVQPCVSPVWDTALVMRAMVDSGVAPDHPALVKAGEWLLSKQI
LDYGDWHIKNKKGRPGGWAFEFENRFYPDVDDTAVVVWALHAVTLPNENLKRAIERAVAWIASMQCRPG
GWAADFVDNDQDWLNGIPYGLDKAMIDPNTADVARTVLEMVGRQCQLAFDRVALDRALAYLRNEQEPEGCW
FGRWGVNLYLGTSGVLTALSLVAPRYDRWRIIRRAEWMQCCQNADGGWGETCWSYHDP SLKGKGDSTASQ
TAWAIIGLLAAGDATGDYATEAIERGIAYLLETQRPDGTWHEDYFTGTGFPCHFYLKYHYQQHFPLTAL
GRYARWRNLLAT

15 SEC ID NO.: 20 (Secuencia de aminoácido de Apa SHC1 de tipo salvaje)

20 MNMASRFLSKKILRSGSDTQGTNVNTLIQSGTSDIVRQKPAQPQEPADLSALKAMGNSLTHTLSSACEWLM
KQQKPDGHWVGSVGSNASMEAEWCLALWFLGLEDHPLRPRLGKALLEMQRPDGSWGTYYGAGSGDINATV
ESYAALRSLGYAEDDPAVSKAAAWIISKGGKKNVRVFTRYWLALIGEWPEKTPNLPPEIIWFPDNFVFS
IYNFAQWARATMMPLAILSARRPSRPLRPQDRDLALFPGGRANFDYELPTKEGRDVIADFFRLADKGLHW
LQSSFLKRAPSREAAIKYVLEWIIWHQDADGGWGGIQQPPWVYGLMALHGEQYQFHHVPMKALDALNDPG
WRHDKGDASWIQATNSPVWDTMLSLMLALHDANAERFTPEMDKALDWLLSRQVRVKGDWSVKLPNTEPGG
WAFEYANDRYPD TDDTAVALIAIASCRNRPEWQAKGVEEAIGRGVRWLAMQSSCGGWGAFDKDNNKSIL
AKIPFCDFGEALDPPSVDVTAHVLEAFGLLGLPRDLPCIQRGLAYIRKEQDPTGPWFGRWGVNLYLTGA
VLPALAAALGEDMTQPYISKACDWLINCQENGWGESCASMEVSSIGHGATTPSQTAWALMGLIAANRP
QDYEAIAKGCYRLIDLQEEDGSWNEEFTGTGFPGYGVGQTIKLDDPAISKRLMQGAELSRAFMLRYDLY
RQLFP IIALSRASRLIKLGN

25

SEC ID NO.: 21 (Secuencia de aminoácido de una variante de GmoSHC)

5 MSPADISTKSSSFQRLDNMLPEAVSSACDWLIDQQKPDGHWVGPLESNACMEA EWCLALWFLGQEDHPLR
PRLAQALLEMQREDGSGWIYVGADHGDINTTVEAYAALRSMGYAADMPIMAKSAAWIQQKGGLRNVRVFT
RYWLALIGEWPDKTPNLPPEIIWLDPNFIFSIYNFAQWARATIMPLTILSARRPSRPLLPENRLDGLFP
EGRENFYELPVKGEEDLWGRFFRAADKGLHSLQSFPVRRFVPREAAIRHVIEWIIRHQDADGGWGGIQP
PWIYGLMALSV EGYPLHHPVLAKAMDALNDPGWRRDKGDASWIQASNSPVWDTMLAVLALHDAGAEDRYS
PQMDKAIGWLLDRQVRVKGDWSIKLPDTEPGGWA FEYANDKYPDTDDTAVALIALAGCRHRPEWRERDIE
GAISRGVNWLLAMQSSSGGWGA FDKDNNRSILTKIPFCDFGEALDPPSVDVTAHVLEAFGLLGISRNHPS
VQKALAYIRSEQERNGA WFGRWGVNYVYGTGAVLPALAAIGEDMTQPYIVRACDWLMSVQQENGWG WESC
ASYMDINAVGHGVATASQTAWALIGLLAAKRPKDREAIARGCQFLIERQEDGSWTEEEYTGTGYPGYGVG
QAIKLD DPLSLPDRLLQGAELSR AFMLRYDLYRQYFPVMALSRARRMMKEDASAAA

SEC ID NO.: 22 (Secuencia nucleotídica de variante de SHC/HAC #90C7)

10 ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAGCGGAGTACGT
CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
GAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCCGCGGACCTCGACGCGACCATCGAGG
CGTACGTGCGGCTCAAGTATATCGGCATGTGCGCGGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTTCAT
TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTGCGCGGTGTTACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGGCGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
CCCGCTGCCCCGAGCGGGCGCGCGTGCCTGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
AAGGGAGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGTGTGTCACGGGTATCAGAAGCTGTCCGTGC
15 ACCGTTCCGCCGCGCGGCCGAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGAGACGGCAG
CTGGGGCGGGATTTCAGCCGCTTGGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
CCGGCGTTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
TTCAGGCTTTCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
GGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGGTTCCGGGCGAC
TGGGCGGTGAAGCGCCCGAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGG
ACGTGGACGACACGGCCGTCTGTTGGTGTGGGCGCTCAACACCCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTGGGGCGCCTAC
GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAACACACCCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGC
CGTCAGAGGACGTACCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCCTGGAAGGT
CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCCGTGCTTGGGGC
20 GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTTCGGGATCGACACGCGCGAGC
CGTACATTCAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACCCGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTCGCAGACGGCCTGGGCGCTG
ATGGCGCTCATCGCGGGCGGACGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTGAATACCTCGTGGAGA
CGCAGCGCCCGACGGCGGTGGGATGAGCCGTACTACACCGGCACGGGCTTCCAGGGGATTTCTACCT
CGGCTACACCATGTACAGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
AGGTGA

25

SEC ID NO.: 23 (Secuencia nucleotídica de variante de SHC/HAC
#115A7)

ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAAGCTCCGGCCTACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAGTATCTCCTCT
CCTGCCAAAAGGACGAAGGCTACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTACGATGGAAGCGGAGTACGT
CCTCTTGTGCCACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGCATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC
5 GAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTGTACCCGGGTGGGCCGCCGGACCTCGACACGACCATCGAGG
CGTACGTGCGCGCTCAAGTATATCGGCATGTGCGCGACGAGGAGCCGATGCAGAAGGCGCTCCGGTTCAT
TCAGAGCCAGGGCGGGATCGAGTCGTGCGCGGTGTTACGCGGAGGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCCGCCGGAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCGCTCAACATCT
ACGAGTTTGGCTCGTGGGCTCGGACGACCGTCGTGGCGCTCTCGATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGT
CCCGCTGCCCCGAGCGGGCGCGCGTGGCCGAGCTGTACGAGACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGCGGTGCC
AAGGGAGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCGCTCGACCGGGTGCTGCACGGGTATCAGAAGCTGTGCGGTGC
ACCCGTTCCGCCGCGCGGCCGAGATCCGCGCCTTGACTGGTTGCTCGAGCGCCAGGCCGGAGACGGCAG
CTGGGGCGGGATTACAGCCGCCTTGTTTTACGCGCTCATCGCGCTCAAGATTCTCGACAAGACGCAGCAT
CCGGCGTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTAGAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGAGGATGGATGT
TTCAGGCTTCCATCTCGCCGGTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCGCTGCGCGCTGCGGGGCTTCC
10 GGCCGATCACGACCGCTTGGTCAAGGCGGGCGAGTGGCTGTTGGACCGGCAGATCACGGTTCGGGGCGAC
TGGGCGGTGAAGCGCCCAACCTCAAGCCGGGCGGGTTCGCGTTCCAGTTCGACAACGTGTACTACCCGG
ACGTGGACGACACGGCCGTCGTGGTGTGGGCGCTCAACACCCTGCGCTTGCCGGACGAGCGCCGAGGCG
GGACGCCATGACGAAGGGATTCCGCTGGATTGTGCGCATGCAGAGCTCGAACGGCGGTGGGGCGCCTAC
GACGTGACAACACGAGCGATCTCCCGAACACACCCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTGACCGATCCGC
CGTCAGAGGACGTCACCGCCACGTGCTCGAGTGTTCGGCAGCTTCGGGTACGATGACGCCTGGAAGGT
CATCCGGCGCGCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAGCCGGACGGCAGCTGGTTCGGTTCGTTGGGGC
GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTGGTGTGCGCGCTGAAGGCGGTGGGATCGACACGCGCGAGC
CGTACATTCAAAAGGCGCTCGACTGGGTGAGCAGCATCAGAACC CGGACGGCGGTGGGGCGAGGACTG
CCGCTCGTACGAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCGAGCACCCCGTCGCAGACGGCCTGGGCGCTG
ATGGCGCTCATCGCGGCGGCGAGGGCGGAGTCCGAGGCCGCGCGCGCGCGGTGCAATACCTCGTGGAGA
15 CGCAGCGCCCGGACGGCGGCTGGGATGAGCCGTACTACACGGCACGGGCTTCCAGGGGATTTCTACCT
CGGCTACACCATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCGCTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC
AGGTGA

SEC ID NO.: 24 (Secuencia de aminoácido de variante de SHC/HAC
215G2+L37Q)

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLQSNVTMEAEYVLLCHILD RVD RDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMP LNIYEF GSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
20 KGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVLDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVWALNTRLRPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHTPFCD FGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEY LKREQKPDGSWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFP GDFYLG YTM YRHVFP T LALGRYKQAIER
R

25

SEC ID NO.: 25 (Secuencia de aminoácido de variante de SHC/HAC
215G2+V174I)

5 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLL SNVTMEAEYVLLCHILD RVD RDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRF IQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMP LNIYEF GSWARATIVALSI VMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEY LKREQKPDG SWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREP YIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGPGDFYLG YTM YRHVFPTLALGRYKQAIER
R

SEC ID NO.: 26 (Secuencia de aminoácido de variante de SHC/HAC
215G2+V174I+F601Y)

10 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLL SNVTMEAEYVLLCHILD RVD RDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRF IQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMP LNIYEF GSWARATIVALSI VMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEY LKREQKPDG SWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREP YIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGPGDFYLG YTM YRHVFPTLALGRYKQAIER
R

15 SEC ID NO.: 27 (Secuencia de aminoácido de variante de SHC/HAC
215G2+L37Q+V174I+F601Y)

20 MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLL SNVTMEAEYVLLCHILD RVD RDRMEKIRRYLLH
EQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRF IQSQGGIESSRVFTRRWLALVGEY
PWEKVPMVPPEIMFLGKRMP LNIYEF GSWARATIVALSI VMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGA
KGGGGWIFDALDRVLHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQH
PAFIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGD
WAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRLPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAY
DVDNTSDLPNHTPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEY LKREQKPDG SWFGRWG
VNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREP YIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWAL
MALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGPGDFYLG YTM YRHVFPTLALGRYKQAIER
R

25

SEC ID NO.: 28 (Secuencia de aminoácido de BmeSHC de tipo salvaje)

5 MIILLKEVQLEIQRRRIAYLRPTQKNDGSFRYCFETGVMPDAFLIMLLRTFDLDKEVLIKQLTERIVSLQN
EDGLWTLFDDEEHNLSATIQAYTALLYSGYYQKNDRI LRKAERYIIDSGGISRAHFLTRWMLSVNGLYEW
PKLFYLP LSLLLVPTYVPLNIFYELSTYARIHFVPMVMVAGNKKFSLTSRHTPSLSHLVDVREQKQSEETTQ
ESRASIFLVDHLKQLASLPSYIHKLGYYQAERYMLERIEKDGTLYSYATSTFFMIYGLLALGYKKDSFVI
QKAIDGICSLSTCSGHVHVENSTSTVWD TALLSYALQEAGVPQQDPMIKGTTRYLKKRQHTKLGDWQFH
NPNTAPGGWGFSDINTNNPD LDDTSAAIRALSRR AQTD TDYLESWQRGINWLLSMQNKDGGFAAFEKNTD
SILFTYLPLENAKDAATDPATADLTGRVLECLGNFAGMNKSHPSIKA AVKWLFDHQLDNGSWYGRWGVCY
IYGTWAAITGLRAVGVSASDPRI IKA INWLKSIQQEDGGFGESCYSASLKKYVPLSFSTPSQTAWALDAL
MTICPLKDQSVKEGKIFLLNPNLTEQQTHYPTGIGLPQQFYIYHSYNDIFPLALAHYAKKHSS

SEC ID NO.: 29 (Secuencia de aminoácido de SalSHC de tipo salvaje)

10 VTATADGRLDPEYDPEPAAVGERPPVTDRLTGRQT TVATAPAGAGRRQAEGPERSGPLDPAQALARATA
ELLSRQSPDGWWKGDLETNVTMDAEDLLLRQFLGIREPEQTAATAAWIRSQQREDGTWSTFYGGPPELST
TVEAYVALKLAGDDPGAPHMAAAARYVRERGGIAASRVFTRIWLALFGWWPWERLPEMPPEIIFLPRWLP
LNIYAFGCWARQTIVPLTVVSAHRPVRPAPFDLTELHTDPADPYPLRPLAPPTGWDGVFERLDLVLHAYH
KRALRPLRRAALAQAGRWIVERQEADGCWGGIQQPAVYSLIALHLLGYDLEHPVMRAGLAAFDRTVHTE
DGRRWLEACQSPVWDTCLATIALRDAGLPADHPALVSAADWMLAEEIRRP GDWSVQRPLAPGGWAFEF
NDNYPDIDDTAEVVLAKRV AHPDRARIDGAVRRGVEWNLGMQSRNGAWGAFD VDNSTL PNLKLPFCDFG
EVVDPPSADVT AHVVEMLAETGLAGDRRTRRGIDWLLKNQEPDGSWFGRWGTNYIYGTGSVLPALVAAGI
PGSHPAVRRAVDWLADRQNP DGGWGEDMRSYEDPVRWSGRGDSTASQTAWALMALLAAGEGPDGARSEVV
ERGVQWLCRTQLPSGSWDEPQFTGTGFPWDFSINYHLRLVFPVTALGRYLHGSPLTGGA

15 SEC ID NO.: 30 (Secuencia de aminoácido de ApaSHCA de tipo salvaje)

MAADGSALSSESRLSSEALDRAVL SAHTALSQAQQDDGHVVELEADATIPA EYILLEHFMDRID
DALEQKIAIYLRRIQSEEHGGWPLYHNGKFDLSATVKAYFALKAVGDDINAPHMQRAREAILDH
GGAERSNVFTRSQLALFGEVPWRATPVMPELMLLPK AFFSVWNMSYWSRTVIAPLLVLAALR
PVAANPRQVHVRELFVTPPEKVQDWIRGYPYRSAGYVFKGLDSVLRPVVPF IPEKTHKKAIQAA
LDFIEPRLNGKDGLGAIYPAMANVMMYRAMGV PDEDPRAKTAW EAVQALIVEKDDEAYCQPCV
SPIWDTGLSGHAMIEAASGPNGIAPEKTVAELKKASAWLRSKQILNVKGDWAVRNP NLAPGGWA
FQYGN DYYPDVDDTAVVGMLLHREGDPTNAEAIERARTWIVGMQSTDGGWGAFDIDNNKDVNLH
IPFADHGALLDPPTADVTARCISFLAQLRNPEDEPVIQRGLEYLRKEQEKDGSWFGRWGTNYIY
GTWSALCALNAAGVSHDDPAVVKAVEWLR SVQRADGGWEGCESYEGGPHGTYGESLPSQTAWA
20 VLGLMAAGRRDDPAVTRGIAWLADQQDANGEWHEDPYNAVGF PKVFYLR YHGYKQFFPLMALAR
YRNLESSNTRRVSF GF

25