

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 874**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2016 PCT/FR2016/052481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17055754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2016 E 16785252 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3356540**

54 Título: **Procedimiento de producción de L-metionina**

30 Prioridad:

**30.09.2015 FR 1559273**

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

**09.02.2021**

73 Titular/es:

**ARKEMA FRANCE (100.0%)  
420, rue d'Estienne d'Orves  
92700 Colombes, FR**

72 Inventor/es:

**FREMY, GEORGES y  
MASSELIN, ARNAUD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 804 874 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de L-metionina

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de L-metionina por reacción enzimática entre un precursor de L-metionina, disulfuro de dimetilo (DMDS) y un compuesto orgánico reductor. Se refiere igualmente a un procedimiento en dos etapas de producción de L-metionina por reacción enzimática entre un precursor de L-metionina y metilmercaptano, obteniéndose este último por hidrogenólisis enzimática del DMDS.

La metionina es uno de los aminoácidos esenciales del cuerpo humano y se utiliza ampliamente como aditivo para la alimentación animal. Se utiliza además como materia prima para productos farmacéuticos. La metionina actúa como un precursor de compuestos tales como la colina (lecitina) y creatina. Igualmente, es una materia prima de síntesis para la cisteína y la taurina.

La S-adenosil-L-metionina (SAM) es un derivado de la L-metionina y está implicada en la síntesis de diversos neurotransmisores en el cerebro. La L-metionina, y/o la SAM, inhiben la acumulación de lípidos en el organismo y mejoran la circulación sanguínea en el cerebro, el corazón y los riñones. La L-metionina puede utilizarse igualmente para favorecer la digestión, la desintoxicación y la excreción de sustancias tóxicas o de metales pesados tales como el plomo. Tiene un efecto antiinflamatorio sobre los huesos y las enfermedades articulares y también es un nutrimento esencial para el cabello, impidiendo así su caída prematura y no deseada.

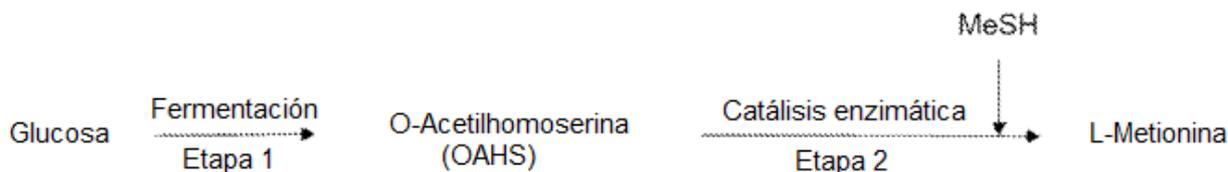
Ya se conoce la preparación industrial de la metionina por vías químicas a partir de materias primas obtenidas de la petroquímica, como se describe, por ejemplo, en los documentos FR2903690, WO2008006977, US2009318715, US5990349, JP19660043158 y WO9408957. Aparte del hecho de que estos métodos de preparación no se integran en un proceso de desarrollo duradero, estas vías químicas presentan el inconveniente de producir una mezcla a partes iguales de los dos enantiómeros L y D.

Las síntesis totalmente biológicas por fermentación bacteriana se han propuesto en la bibliografía con la ventaja de producir solo el enantiómero L de la metionina, como se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales WO07077041, WO09043372, WO10020290 y WO10020681. No obstante, la ausencia de realización industrial a gran escala hasta la fecha, hace suponer que los rendimientos y/o los costes de producción de estos procedimientos siguen siendo insuficientes.

Los procedimientos mixtos químicos/biológicos han sido industrializados con éxito conjuntamente por la empresa CJ Cheil-Jedang y la Solicitante, en los que un precursor de la L-metionina se produce por fermentación bacteriana y reacciona a continuación enzimáticamente con metilmercaptano para producir la L-metionina exclusivamente (véase, WO2008013432 y/o WO2013029690). Estos procedimientos, aunque con muy buen rendimiento, necesitan la síntesis en el sitio del metilmercaptano, que él mismo necesita la síntesis de hidrógeno por reformado del vapor de metano, la síntesis de hidrógeno sulfurado por hidrogenación del azufre y su síntesis a partir de metanol y de hidrógeno sulfurado, es decir, equipos muy importantes poco compatibles con una extrapolación industrial más modesta en términos de producción anual que la ya existente.

Persiste, por lo tanto, una necesidad de producir la L-metionina por un procedimiento mixto en el que los equipos requeridos para la síntesis de metilmercaptano serán menores que para una síntesis a partir de hidrógeno, de hidrógeno sulfurado y de metanol. Es bajo esta óptica en la que se incluye la presente invención.

La presente invención propone, en efecto, reemplazar el metilmercaptano en el procedimiento resumido más adelante (WO2008013432 y/o WO2013029690), por disulfuro de dimetilo (DMDS):



El metilmercaptano (MeSH) se utiliza aquí directamente en la segunda etapa. La presente invención propone sustituir el metilmercaptano por el producto de la hidrogenólisis enzimática del disulfuro de dimetilo en una etapa previa o combinar el conjunto en una reacción « one pot », donde la glucosa y el DMDS producen L-metionina.

Respecto a la síntesis de metilmercaptano a partir de disulfuro de dimetilo, en la técnica anterior se pueden encontrar los elementos siguientes.

La solicitud de patente EP0649837 propone un procedimiento de síntesis de metilmercaptano por hidrogenólisis catalítica, con sulfuros de metales de transición, disulfuro de dimetilo con hidrógeno. Este procedimiento, aunque con buen rendimiento, necesita temperaturas relativamente elevadas del orden de 200 °C para obtener productividades interesantes industrialmente.

El experto en la técnica sabe igualmente que es posible preparar metilmercaptano por acidificación de una disolución acuosa de metilmercaptano de sodio ( $\text{CH}_3\text{SNa}$ ). Este método presenta el inconveniente principal de producir grandes cantidades de sales, tales como cloruro de sodio o sulfato de sodio, según se utilice ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. Estas disoluciones acuosas salinas son frecuentemente muy difíciles de tratar y las trazas de productos malolientes que persisten hacen que este método sea difícilmente factible en el plano industrial.

Ahora, se ha encontrado que se puede preparar metilmercaptano por reducción enzimática del disulfuro de dimetilo (DMDS) durante una etapa previa a la síntesis de la L-metionina y se ha encontrado igualmente, de forma sorprendente, que se podía realizar esta reducción enzimática del DMDS durante la síntesis de la L-metionina.

Así, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de L-metionina similar al propuesto en las solicitudes internacionales WO2008013432 y/o WO2013029690 y que permite liberarse de, incluso al menos disminuir, la manipulación del metilmercaptano, generando dicho metilmercaptano en una reacción de catálisis enzimática del DMDS, justo antes de la utilización de dicho metilmercaptano en la síntesis de metionina o generando dicho metilmercaptano en una reacción de catálisis enzimática del DMDS in situ en el reactor de síntesis de L-metionina.

Más particularmente, la presente invención tiene como primer objeto el procedimiento de preparación de L-metionina, que comprende al menos las etapas de:

a) preparación de una mezcla que comprende:

1) disulfuro de dimetilo (DMDS),

2) una cantidad catalítica de aminoácido portador de un grupo tiol o de un péptido con grupo tiol,

3) una cantidad catalítica de enzima que cataliza la reacción de reducción de puente disulfuro de dicho aminoácido portador de un grupo tiol o de dicho péptido con grupo tiol,

4) un compuesto orgánico reductor en cantidad estequiométrica respecto al disulfuro, en particular el DMDS,

5) una cantidad catalítica de enzima que cataliza la reacción de deshidrogenación del compuesto orgánico reductor concernido,

6) una cantidad catalítica de un cofactor común a las dos enzimas del sistema catalítico (deshidrogenasa y reductasa),

b) realizar la reacción enzimática para formar metilmercaptano ( $\text{CH}_3\text{-SH}$ ),

c) adición de un precursor de la L-metionina y conversión de dicho precursor con el metilmercaptano formado en la etapa b), y

d) recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.

Los componentes de la etapa a) anterior pueden añadirse en diferentes órdenes (el orden de adición en la etapa a) no es restrictivo). En un modo de realización de la invención, el aminoácido portador de un grupo tiol y/o el péptido portador de un grupo tiol pueden estar en la forma del disulfuro de dicho aminoácido y/o de dicho péptido respectivamente, por ejemplo, glutatión en forma de disulfuro de glutatión.

De una manera general, la enzima que cataliza la reducción del puente disulfuro creado entre dos equivalentes de dicho aminoácido portador de un grupo tiol o de dicho péptido con grupo tiol es una enzima reductasa. El término « reductasa » se utiliza en lo que sigue de la descripción para la explicación de la presente invención. De manera similar, la enzima que cataliza la deshidrogenación del compuesto orgánico reductor implicado en la etapa b) se denomina generalmente enzima deshidrogenasa, eligiéndose el término « deshidrogenasa » en lo que sigue de la descripción para la explicación de la presente invención.

Entre los cofactores comunes a las dos enzimas que catalizan la reducción y la deshidrogenación (la reductasa y la deshidrogenasa), se pueden citar, a título de ejemplos no limitativos, los cofactores flavínicos, y los cofactores nicotínicos. Se prefiere utilizar los cofactores nicotínicos y más particularmente el Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD), o aún mejor el Fosfato del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NADPH). Los cofactores listados anteriormente se utilizan ventajosamente en sus formas reducidas (por ejemplo, NADPH,  $\text{H}^+$ ) y/o sus formas oxidadas (por ejemplo, NADP<sup>+</sup>), es decir, que pueden añadirse en estas formas reducidas y/u oxidadas en el medio de reacción.

La organización y el orden de las adiciones de los componentes 1) a 6) en la etapa a) pueden realizarse de diferentes maneras. La reacción enzimática de la etapa b) se desencadena por la adición de uno de los componentes del sistema catalítico de la mezcla de la etapa a): bien una enzima, bien uno de los compuestos añadidos en cantidad estequiométrica (disulfuro o compuesto orgánico reductor) bien uno de los compuestos añadidos en cantidad catalítica (aminoácido portador de un grupo tiol o péptido con grupo tiol o disulfuro correspondiente a dicho tiol o a dicho péptido o bien el cofactor).

Así, y según un modo de realización de la presente invención, el procedimiento de preparación de L-metionina, comprende al menos las etapas de:

a) preparación de una mezcla que comprende:

- disulfuro de dimetilo (DMDS),

5 • una cantidad catalítica de aminoácido portador de un grupo tiol o de un péptido con grupo tiol,

- una cantidad catalítica de enzima reductasa correspondiente a dicho aminoácido portador de un grupo tiol o a dicho péptido con grupo tiol,

- una cantidad catalítica de NADPH,

10 b) adición de un compuesto orgánico reductor en cantidad estequiométrica respecto al disulfuro de dimetilo) con una cantidad catalítica de la enzima deshidrogenasa correspondiente,

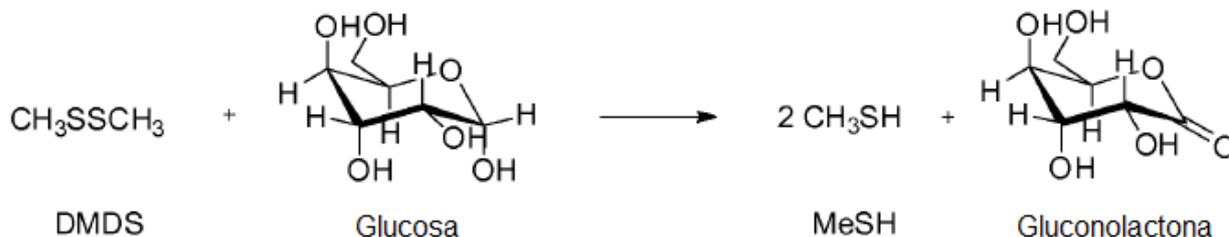
c) realizar la reacción enzimática para formar metilmercaptano (CH<sub>3</sub>-SH),

d) conversión de un precursor de la L-metionina con el metilmercaptano formado en la etapa c'), y

e) recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.

15 Según el procedimiento de la invención, el metilmercaptano, formado generalmente en estado gaseoso, se pone en contacto directamente con un precursor de metionina como se describe más adelante.

El procedimiento de síntesis de L-metionina según la invención se basa, en primer lugar, en la reducción enzimática del disulfuro de dimetilo con un compuesto orgánico reductor, que es un donador de hidrógeno, como se definirá más adelante, según la reacción siguiente, utilizando glucosa como compuesto orgánico reductor (donador de hidrógeno):



20 Ahora, se ha descubierto que esta reacción está catalizada fácilmente por el sistema enzimático que aplica un aminoácido con grupo tiol o un péptido con grupo tiol, por ejemplo, glutatión, en forma de complejo (aminoácido o péptido)/enzima reductasa correspondiente, regenerado por el compuesto orgánico donador de hidrógeno, como se describe en la Figura 1 adjunta.

25 Así, según la ilustración de la Figura 1, el péptido (« glutatión » representado) reduce el disulfuro (« DMDS » representado) en mercaptano (« metilmercaptano » representado), transformándose en péptido con puente disulfuro (« disulfuro de glutatión » representado). La enzima reductasa (« glutatión reductasa » representada, EC 1.8.1.7 o EC 1.6.4.2) regenera el péptido (glutatión), oxidando el cofactor (« NADPH, H<sup>+</sup> » representado). La forme oxidada (« NADP<sup>+</sup> » representado) se reduce entonces mediante un complejo enzimático óxido-reductor, denominado « de reciclaje », muy conocido por el experto en la técnica y que comprende la enzima deshidrogenasa implicada (« glucosa deshidrogenasa » representada, con el ejemplo del número de clasificación enzimática EC 1.1.1.47) y la molécula orgánica reductora (« glucosa » representada). Se obtiene entonces la forma oxidada del compuesto orgánico reductor (« gluconolactona » representada).

35 Más particularmente, el péptido (ejemplo representado, glutatión) reduce el disulfuro de dimetilo en metilmercaptano transformándose en péptido con puente disulfuro (disulfuro de glutatión representado). La enzima reductasa (« glutatión reductasa » representada, EC 1.8.1.7 o EC 1.6.4.2) regenera el (glutatión) y esta misma enzima se regenera por un complejo enzimático óxido-reductor muy conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, el complejo NADPH/NADP<sup>+</sup> (fosfato de dinucleótido de nicotina y adenina (forma reducida y forma oxidada)). A su vez, el NADP<sup>+</sup> se regenera en NADPH mediante la enzima deshidrogenasa correspondiente al compuesto orgánico reductor empelado (aquí, la «glucosa deshidrogenasa» EC 1.1.1.47) gracias a dicho compuesto orgánico reductor (glucosa representada) que suministra el hidrógeno (donador de hidrógeno) transformándose en su forma oxidada (aquí, gluconolactona).

40 Según un modo de realización muy particularmente adaptado, el sistema glutatión/disulfuro de glutatión asociado a la enzima glutatión-reductasa permite según la presente invención reducir el DMDS en metilmercaptano.

El glutatión es un tripéptido ampliamente utilizado en biología. Esta especie en forma reducida (glutatión) u oxidada (disulfuro de glutatión) forma una pareja de óxido-reducción importante en las células. Así, el glutatión es vital para suprimir los metales pesados de los organismos. Así, por ejemplo, la solicitud WO05107723 describe una formulación donde el glutatión se utiliza para formar una preparación quelante, la patente US4657856 enseña que el glutatión permite igualmente destruir los peróxidos como  $H_2O_2$  en  $H_2O$  mediante la glutatión peroxidasa. Finalmente, el glutatión permite igualmente reducir los puentes disulfuros presentes en las proteínas (Rona Chandrawati, « Triggered Cargo Release by Encapsulated Enzymatic Catalysis in Capsosomes », *Nano Lett.*, (2011), vol. 11, 4958-4963).

Según el procedimiento de la invención, una cantidad catalítica de aminoácido portador de un grupo tiol o de un péptido con grupo tiol, se aplica para la producción de metilmercaptano a partir de disulfuro de dimetilo.

Entre los aminoácidos portadores de grupo tiol utilizables en el procedimiento de la presente invención, se pueden citar, a título de ejemplos no limitativos, la cisteína y la homocisteína. Los sistemas enzimáticos óxido-reductores utilizados que pueden regenerar el ciclo catalítico de la misma forma, son, en este caso, el sistema cisteína/cistina-reductasa EC 1.8.1.6, y homocisteína/homocisteína-reductasa.

Ventajosamente, se puede utilizar la homocisteína porque este aminoácido puede prepararse a partir de OAHs (precursor de la L-metionina), sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y la enzima de la metionina, es decir, la enzima que cataliza la reacción que da lugar a la metionina. Así, una cantidad muy baja de  $H_2S$  en el medio de reacción crea, *in situ*, el ciclo equivalente al del glutatión.

Entre los péptidos portadores de grupo tiol utilizables en el procedimiento de la presente invención, se pueden citar, a título de ejemplos no limitativos, el glutatión y la tioredoxina. El sistema glutatión/glutatión reductasa, descrito anteriormente, puede reemplazarse así por el sistema tioredoxina (CAS no. 52500-60-4)/tioredoxina reductasa (EC 1.8.1.9 o EC 1.6.4.5).

El glutatión y el sistema glutatión/glutatión reductasa se prefieren muy particularmente para la presente invención, en base a la facilidad de aprovisionamiento y los costes de estos compuestos.

Entre los compuestos orgánicos reductores que pueden utilizarse en el marco de la presente invención, los compuestos donadores de hidrógeno se prefieren muy particularmente, y entre ellos, los compuestos completamente adaptados son los compuestos orgánicos reductores donadores de hidrógeno portadores de función hidroxilo, tales como los alcoholes, los polioles, los azúcares y otros.

La enzima utilizada es una enzima apta para deshidrogenar el compuesto portador de hidrógeno, por ejemplo, una alcohol-deshidrogenasa. La glucosa es un azúcar adaptado particularmente bien para ser aplicado en el procedimiento de la presente invención, con la glucosa-deshidrogenasa, para proporcionar la gluconolactona.

En el procedimiento según la invención, en el caso en el que la reducción enzimática del DMDS se hace en un reactor separado de la síntesis de la L-metionina, se utiliza solo la glucosa en cantidad estequiométrica, todos los demás componentes (glutatión, cofactor (por ejemplo, NADPH) y las dos enzimas) se utilizan en cantidad catalítica. En el caso en el que la reacción de reducción enzimática del DMDS se hace con la síntesis de la L-metionina en un solo reactor denominado « one pot », el precursor de la L-metionina se añade igualmente en cantidad estequiométrica, mientras que los reactivos complementarios a esta síntesis tales como el fosfato de piridoxal (PLP) y la enzima específica de esta reacción, se añaden en cantidades catalíticas.

Las concentraciones de fosfato de piridoxal y de enzima específica del precursor preferidas son aquellas que se pueden encontrar en las solicitudes internacionales WO2008013432 y/o WO2013029690.

Las ventajas que procura la síntesis por catálisis enzimática de metilmercaptano a partir de disulfuro de dimetilo son numerosas, ya sea en el caso de las dos etapas sucesivas o del procedimiento « one pot ». Entre estas ventajas, se puede citar la posibilidad de trabajar en disolución acuosa o hidro-orgánica, en condiciones muy suaves de temperatura y de presión y en condiciones de pH cercanas a la neutralidad. Todas estas condiciones son típicas de un procedimiento denominado « verde » o « sostenible », y son completamente compatibles con la preparación de L-metionina, tal como se describe en las solicitudes internacionales WO2008013432 y/o WO2013029690.

Otra ventaja durante el procedimiento aplicado del disulfuro de dimetilo es que el metilmercaptano producido, que está en estado gaseoso en las condiciones de reacción, sale del medio de reacción a medida que se forma. El metilmercaptano puede utilizarse, por lo tanto, directamente a la salida del reactor en la síntesis de la L-metionina, como se describe, por ejemplo, en WO2008013432 y/o WO2013029690, es decir a partir, por ejemplo, de O-acetilhomoserina o de O-succinilhomoserina y de enzimas tales como O-acetilhomoserinasulfhidrilasa u O-succinilhomoserina-sulfhidrilasa, respectivamente.

El metilmercaptano también puede licuarse fácilmente por criogenia, por ejemplo, si se desea aislarlo. Se puede acelerar eventualmente su partida del medio de reacción introduciendo por burbujeo un flujo ligero de gas inerte, ventajosamente nitrógeno.

Los gases de salida que contienen nitrógeno y metilmercaptano pueden, si se desea y es necesario, reciclarse en el primer reactor (reducción enzimática del DMDS) después del paso en el segundo reactor (síntesis de L-metionina) si el metilmercaptano no se ha convertido completamente en L-metionina. El procedimiento según la invención describe, por lo tanto, un procedimiento de síntesis de L-metionina en dos etapas enzimáticas sucesivas a partir de un precursor de L-metionina y de DMDS.

Es posible igualmente realizar la síntesis de L-metionina en un solo y único reactor. En este caso, se añaden al sistema de reducción enzimática del DMDS (etapa a) anterior) todos los reactivos necesarios para la síntesis de la L-metionina y se cierra el reactor para evitar la salida del metilmercaptano formado por reducción enzimática *in situ* del DMDS. El metilmercaptano reacciona entonces con el precursor de la L-metionina para proporcionar la L-metionina. El procedimiento según la presente invención describe así un procedimiento de síntesis directa de L-metionina a partir de un precursor de L-metionina y de DMDS, como se ilustra por la Figura 2 adjunta, donde la síntesis a partir de OAHs, de DMDS y glucosa.

El disulfuro de dimetilo (DMDS) puede producirse en otro sitio a partir de metilmercaptano y de un oxidante tal como el oxígeno, el azufre o el agua oxigenada, por ejemplo, o también a partir de sulfato de dimetilo y de disulfuro de sodio. El DMDS puede provenir también de una fuente de « DiSulfide Oils » (DSO) purificados, por ejemplo, por destilación reactiva como se describe en la solicitud WO2014033399.

La reducción por catálisis enzimática de DMDS puede considerarse como un procedimiento que permite evitar el transporte de metilmercaptano desde su sitio de producción por las vías industriales existentes, hacia su sitio de utilización, si son diferentes. En efecto, el metilmercaptano es un gas a temperatura ambiente, tóxico y fuertemente maloliente lo que complica enormemente su transporte ya muy regulado a diferencia del DMDS. Así, el DMDS puede utilizarse, por lo tanto, para producir metilmercaptano directamente en el sitio de utilización de este último en la síntesis de la L-metionina, reduciendo así más los inconvenientes ligados a la toxicidad y al olor de este producto, así como los riesgos industriales asociados.

En el caso del procedimiento de síntesis en dos etapas sucesivas, consumiéndose el DMDS en la reacción y saliendo el metilmercaptano del medio de reacción a medida que se forma, solo se acumula el producto de deshidrogenación del compuesto orgánico reductor, por ejemplo, la gluconolactona, en el medio de reacción, en la hipótesis de una alimentación en continuo de glucosa y de DMDS. Cuando la concentración de gluconolactona supera la saturación en las condiciones de reacción, esta última va a precipitar y podrá aislarse entonces del medio de reacción por cualquier medio conocido por el experto en la técnica.

La gluconolactona puede tener varias utilidades. Se utiliza, por ejemplo, como aditivo alimentario conocido por las siglas E575. La gluconolactona se hidroliza en medios acuosos ácidos para formar ácido glucónico utilizado igualmente como aditivo alimentario (E574). La gluconolactona se utiliza igualmente para la producción de tofu (véase, CN103053703) por la industria alimentaria.

La gluconolactona puede reemplazar, principalmente y ventajosamente, en el sentido en el que representa el « desecho » del procedimiento según la presente invención, a la glucosa en una reacción de fermentación eventual para producir bien bioetanol bien cualquier otra molécula proveniente de la fermentación de azúcar o de almidón.

Determinadas bacterias pueden utilizar, en efecto, en fermentación la gluconolactona como fuente de carbono, como se describe por J. P. van Dijken, « *Novel pathway for alcoholic fermentation of gluconolactone in the yeast Saccharomyces bulderi* », *J. Bacteriol.*, (2002), Vol. 184(3), 672-678.

Un interés evidente de la gluconolactona en el procedimiento según la invención es reciclarla en la síntesis del precursor de la L-metionina. En efecto, siendo esta síntesis una fermentación bacteriana que utiliza glucosa, la gluconolactona podría reemplazar fácilmente a una parte de esta glucosa. Este reciclaje puede representar, en estas condiciones, una ventaja económica muy significativa.

Asimismo, en el caso en el que la reacción se hace en las condiciones « one pot » definidas más arriba, y siendo la gluconolactona mucho más soluble que la L-metionina, es fácil separarla del medio de reacción según técnicas clásicas y muy conocidas por el experto en la técnica.

Pueden utilizarse otros azúcares en el procedimiento de la invención, y, por ejemplo, es posible reemplazar el sistema glucosa/gluconolactona/gluconolactona-deshidrogenasa por el sistema siguiente: glucosa-6-fosfato/6-fosfoglucono- $\delta$ -lactona/Gluconolactona-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49).

Es posible igualmente en el procedimiento de la invención utilizar un alcohol que reemplaza el azúcar, y utilizar así en lugar del sistema glucosa/gluconolactona/gluconolactona-deshidrogenasa, el sistema general siguiente: alcohol/cetona o aldehído/alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1) y más particularmente el sistema isopropanol/acetona/isopropanol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.80).

En efecto, este sistema permite obtener, a partir de DMDS y de isopropanol, una mezcla constituida por metilmercaptano (MeSH) y acetona que sale del medio de reacción (por lo tanto, no hay acumulación de ningún producto). El MeSH y la acetona pueden separarse fácilmente por una destilación simple si se desea.

Según un modo de realización, el procedimiento según la invención comprende la preparación por reducción enzimática del DMDS, después reacción del metilmercaptano formado con un precursor de L-metionina para proporcionar L-metionina. En este caso, el procedimiento según la invención comprende al menos las etapas siguientes:

5 Etapa 1: preparación de un precursor de la L-metionina, por ejemplo, por fermentación bacteriana de glucosa (véanse, WO2008013432 y/o WO2013029690),

Etapa 2: reducción enzimática del DMDS en un reactor R1 con formación de metilmercaptano que sale de dicho reactor R1 (correspondiente a las etapas a') a c') anteriores),

10 Etapa 3: síntesis enzimática de la L-metionina en un reactor R2 con el precursor de la Etapa 1 y el metilmercaptano de la Etapa 2 (correspondiente a la etapa d') anterior),

Etapa 4 (opcional): reciclaje de la gluconolactona formada en la Etapa 3 en la Etapa 1,

Etapa 5: recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada (correspondiente a la etapa e') anterior).

15 Para la Etapa 1, se encontrará el ámbito de condiciones utilizables en las patentes siguientes (véanse, WO2008013432 y/o WO2013029690).

Para la Etapa 2, la temperatura de la reacción está comprendida en un intervalo que va de 10 °C a 50 °C, preferentemente entre 15 °C y 45 °C, preferentemente aún entre 20 °C y 40 °C.

20 El pH de la reacción puede estar comprendido entre 6 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5. El pH del medio de reacción puede ajustarse mediante un tampón. De forma completamente preferida, se elegirá, por ejemplo, el pH del tampón fosfato a 0,1 moles.L<sup>-1</sup> a 7,3.

25 La presión utilizada para la reacción puede ir de una presión reducida con respecto a la presión atmosférica a varios bares (varios cientos de kPa), según los reactivos utilizados y el material utilizado. Una presión reducida puede permitir, en efecto, una desgasificación más rápida del metilmercaptano formado, pero presenta el inconveniente de aumentar las presiones de vapor saturante del agua y del DMDS, contaminando un poco más el metilmercaptano formado. De forma preferida, se utilizará una presión que va de la presión atmosférica a 20 bares (2 MPa) y de forma aún más preferida, se trabajará bajo una presión que va de la presión atmosférica a 3 bares (300 kPa).

30 Para la Etapa 3, se hará referencia a la solicitud internacional WO2013029690 para las condiciones ideales con la diferencia posible de introducir un flujo de nitrógeno en el reactor R1 para llegar en el reactor R2 y reciclar estos gases del reactor R2 hacia el reactor R1 a la presión deseada si el metilmercaptano no ha reaccionado totalmente en el reactor R2.

Según otro modo de realización (otra variante), el procedimiento según la presente invención se realiza en un solo y único reactor (« one pot »), y en este caso comprende al menos las etapas siguientes:

Etapa 1': preparación de un precursor de la L-metionina por fermentación bacteriana de glucosa, por ejemplo (similar a la Etapa 1 anterior),

35 Etapa 2': reducción enzimática del DMDS en un reactor R1 con formación *in situ* de metilmercaptano y síntesis conjunta enzimática de la L-metionina en el mismo reactor con el precursor obtenido en la Etapa 1',

Etapa 3' (opcional): reciclaje de la gluconolactona formada en la Etapa 2' en la Etapa 1', y

Etapa 4': recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.

40 Para la Etapa 1', se encontrará el ámbito de condiciones utilizables en las solicitudes internacionales WO2008013432 y/o WO2013029690.

Para la Etapa 2', las condiciones operativas son las siguientes.

La temperatura de la reacción está comprendida en un intervalo que va de 10 °C a 50 °C, preferentemente de 15 °C a 45 °C, preferentemente aún de 20 °C a 40 °C.

45 El pH de la reacción está comprendido ventajosamente entre 6 y 8, preferentemente entre 6,2 y 7,5. De forma completamente preferida, la reacción se efectúa al pH del tampón fosfato a 0,2 moles.L<sup>-1</sup> e igual a 7,0.

De forma preferida, el procedimiento se realiza a una presión que va de la presión atmosférica a 20 bares (2 MPa) y de forma aún más preferida, de la presión atmosférica a 3 bares (300 kPa).

La relación molar DMDS/precursor de L-metionina está comprendida entre 0,1 y 10, generalmente entre 0,5 y 5, y preferentemente la relación molar es la estequiometría (relación molar = 0,5), pero puede ser superior si esta se muestra beneficiosa para la cinética de la reacción.

5 En una u otra de las variantes del procedimiento según la invención, este puede realizarse en discontinuo o en continuo, en un reactor de vidrio o metal según las condiciones operativas seleccionadas y los reactivos utilizados.

10 En una u otra de las variantes del procedimiento según la invención, la relación molar compuesto orgánico reductor/DMDS ideal es la estequiometría (relación molar = 1), pero puede variar de 0,01 a 100 si el experto en la técnica encuentra un interés cualquiera, tal como una adición en continuo del DMDS mientras que el compuesto reductor se introduce tan pronto como se produce la salida en el reactor. De forma preferida, esta relación molar se elige entre 0,5 y 5 globalmente sobre el conjunto de la reacción.

15 Los elementos presentes en cantidad catalítica en la mezcla preparada en la etapa a) anterior (aminoácido portador de un grupo tiol o un péptido con grupo tiol o también el disulfuro correspondiente a dicho aminoácido o el disulfuro correspondiente a dicho péptido, enzima reductasa, enzima deshidrogenasa, cofactor, por ejemplo, NADPH) son fácilmente accesibles comercialmente o pueden prepararse según las técnicas muy conocidas por el experto en la técnica. Estos diferentes elementos pueden presentarse en forma sólida o líquida y pueden ponerse muy ventajosamente en disolución en agua para aplicarse en el procedimiento de la invención. Las enzimas utilizadas pueden injertarse igualmente en soportes (caso de las enzimas soportadas).

20 La disolución acuosa de complejo enzimático que comprende el aminoácido o el péptido puede reconstituirse igualmente por métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, por permeabilización de células que contendrían estos elementos. Esta disolución acuosa cuya composición se proporciona en el ejemplo 1 siguiente puede utilizarse en los contenidos en masa comprendidos entre el 0,01 % y el 20 % con respecto al peso total del medio de reacción. De forma preferida, se utilizará un contenido comprendido entre el 0,5 % y el 10 %.

La invención se comprenderá mejor con los ejemplos siguientes no limitativos con respecto al alcance de la invención.

#### **Ejemplo 1:** Procedimiento en 2 etapas sucesivas

25 En un reactor R1 que contiene 150 mL de tampón fosfato a 0,1 moles/L a pH 7,30, se introducen 10 mL de complejo enzimático con glutatión (Aldrich) y 19,2 g (0,1 moles) de glucosa. La disolución de complejo enzimático contiene: 185 mg (0,6 mmoles) de glutatión, 200 U de glutatión-reductasa, 50 mg (0,06 mmoles) de NADPH y 200 U de glucosa-deshidrogenasa. El medio de reacción se lleva a 25 °C bajo agitación mecánica. Se efectúa una primera toma t = 0. A continuación, el disulfuro de dimetilo (9,4 g, 0,1 moles) se pone en una bureta y se añade gota a gota en el reactor, la reacción comienza. Se pone una corriente de nitrógeno en el reactor.

30 Un análisis en cromatografía en fase gaseosa de los gases que salen del reactor muestra casi esencialmente la presencia de nitrógeno y de metilmercaptano (algunas trazas de agua). Estos gases de salida se envían al reactor R2. El DMDS se introduce en 6 horas en el reactor R1. Un análisis final en cromatografía en fase gaseosa del medio de reacción del reactor R1 confirma la ausencia de DMDS, y un análisis por UPLC/masa muestra trazas de glucosa y la presencia casi exclusiva de gluconolactona (trazas de ácido glucónico).

35 En paralelo, en el segundo reactor R2 que contiene 75 mL de tampón fosfato 0,1 moles.L<sup>-1</sup> a pH 6,60, se introducen 5 g de O-acetil-L-homoserina (OAHS) (la O-acetilhomoserina se sintetizó a partir de L-homoserina y de anhídrido acético según Sadamu Nagai, « *Synthesis of O-acetyl-L-homoserine* », Académie Press, (1971), vol. 17, p. 423-424). La disolución se lleva a 35 °C bajo agitación mecánica.

40 Antes de comenzar la reacción, se efectúa una toma (t = 0) de 1 mL del medio de reacción. Se disuelve una disolución de fosfato de piridoxal (1,6 mmoles, 0,4 g) y la enzima O-acetil-L-homoserina-sulfhidrilasa (0,6 g) en 10 mL de agua, después se añade en el reactor.

45 El metilmercaptano se introduce a través de la reacción del reactor R1 y se conduce por una corriente de nitrógeno. La reacción comienza entonces. La formación de L-metionina y la desaparición de la OAHS se siguen por HPLC. Los gases de salida del reactor R2 se atrapan en una disolución acuosa de sosa (hidróxido de sodio) al 20 %. Los análisis muestran que la OAHS se ha convertido al 52 % en L-metionina y que el exceso de DMDS se ha convertido en metilmercaptano recuperado en la trampa de sosa.

#### **Ejemplo 2:** Procedimiento « one pot »

50 En un reactor que contiene 150 mL de tampón fosfato 0,2 moles.L<sup>-1</sup> a pH 7, se introducen 10 mL del complejo enzimático, 6 g (33 mmoles) de glucosa y 5 g (31 mmoles) de O-acetil-L-homoserina (OAHS, la O-acetil-L-homoserina se sintetizó a partir de L-homoserina y de anhídrido acético según Sadamu Nagai, « *Synthesis of O-acetyl-L-homoserine* », Academic Press, (1971), vol. 17, p. 423-424). La disolución del complejo enzimático contiene: 185 mg (0,6 mmoles) de glutatión, 200 U de glutatión-reductasa, 50 mg (0,06 mmoles) de NADPH, 200 U de glucosa-deshidrogenasa, 0,4 g (1,6 mmoles) de fosfato de piridoxal y 0,6 g de O-acetil-L-homoserina-sulfhidrilasa.

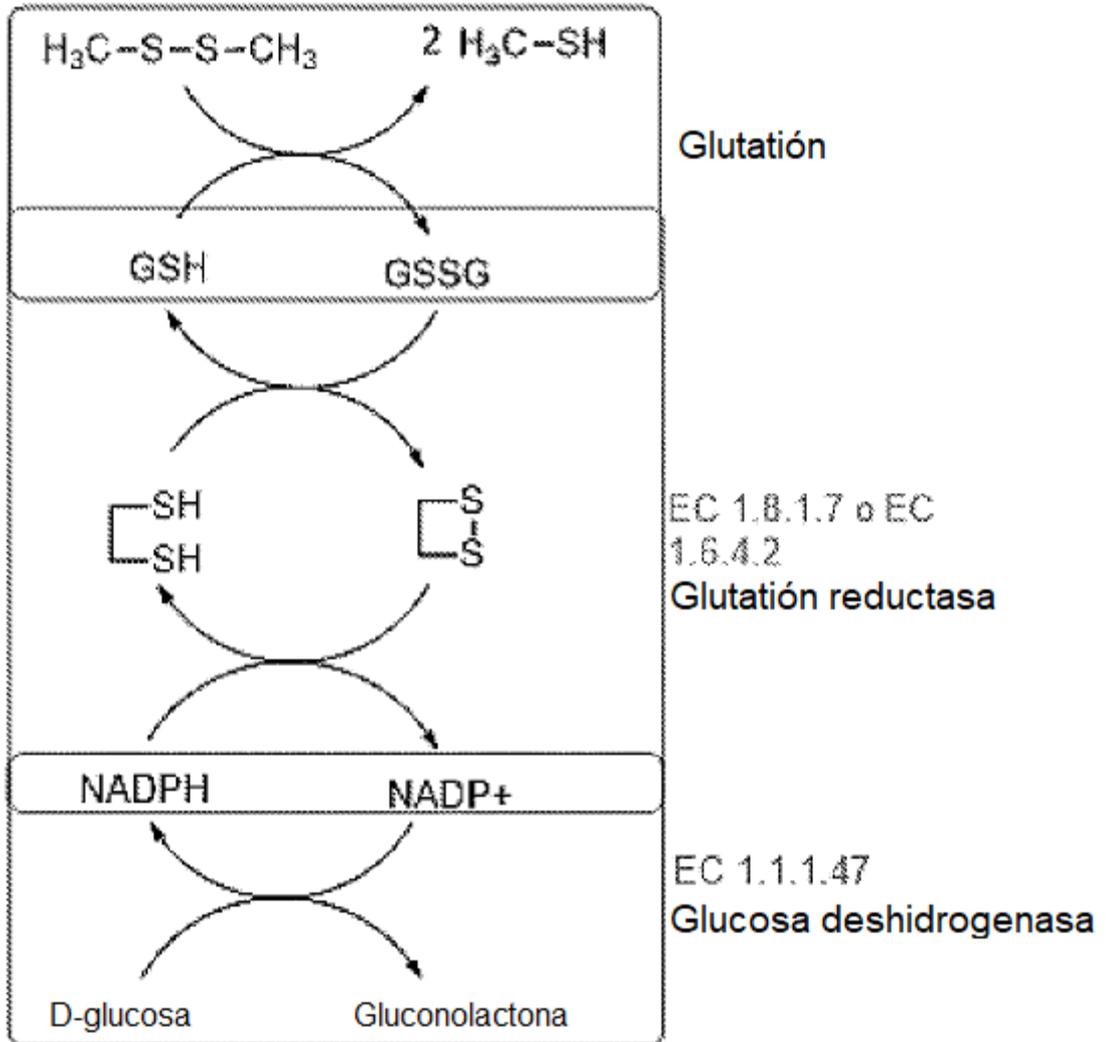
- 5 El medio de reacción se lleva a 27 °C bajo agitación mecánica. Se efectúa una primera toma  $t = 0$ . A continuación, el disulfuro de dimetilo (3 g, 32 mmoles) se pone en una bureta y se añade gota a gota en el reactor que se ha cerrado para evitar cualquier emisión de metilmercaptano, la reacción comienza. La reacción se sigue por HPLC para observar la desaparición de la OAHS y la formación de la L-metionina. Al cabo de 6 horas, el 21 % de la OAHS se ha convertido en L-metionina demostrando la posibilidad de producir L-metionina por un procedimiento « one-pot » a partir de un precursor de la L-metionina, de DMDS y de un compuesto orgánico reductor.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de L-metionina, que comprende al menos las etapas de:
  - a) preparación de una mezcla que comprende:
    - 1) disulfuro de dimetilo (DMDS),
    - 5 2) una cantidad catalítica de aminoácido portador de un grupo tiol o de un péptido con grupo tiol,
    - 3) una cantidad catalítica de enzima que cataliza la reacción de reducción de puente disulfuro de dicho aminoácido portador de un grupo tiol o de dicho péptido con grupo tiol,
    - 4) un compuesto orgánico reductor en cantidad estequiométrica con respecto al disulfuro, en particular DMDS,
    - 10 5) una cantidad catalítica de enzima que cataliza la reacción de deshidrogenación de un compuesto orgánico reductor concernido,
    - 6) una cantidad catalítica de un cofactor común a las dos enzimas del sistema catalítico (deshidrogenasa y reductasa),
  - b) realizar la reacción enzimática para formar el metilmercaptano (CH<sub>3</sub>-SH),
  - 15 c) adición de un precursor de la L-metionina y conversión de dicho precursor con el metilmercaptano formado en la etapa b), y
  - d) recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende al menos las etapas de:
  - a) preparación de una mezcla que comprende:
    - 20 • disulfuro de dimetilo (DMDS),
    - una cantidad catalítica de aminoácido portador de un grupo tiol o de un péptido con grupo tiol,
    - una cantidad catalítica de enzima reductasa correspondiente a dicho aminoácido portador de un grupo tiol o a dicho péptido con grupo tiol,
    - una cantidad catalítica de NADPH,
  - 25 b') adición de un compuesto orgánico reductor en cantidad estequiométrica con respecto al disulfuro de dimetilo) con una cantidad catalítica de la enzima deshidrogenasa correspondiente,
  - c') realizar la reacción enzimática para formar el metilmercaptano (CH<sub>3</sub>-SH),
  - d') conversión de un precursor de la L-metionina con el metilmercaptano formado en la etapa c'), y
  - e') recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.
- 30 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el metilmercaptano se pone en contacto directamente con un precursor de metionina.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto orgánico reductor es un compuesto orgánico reductor donador de hidrógeno portador de función hidroxilo, elegido entre los alcoholes, los polioles, los azúcares.
- 35 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto orgánico reductor se elige entre glucosa, glucosa-6-fosfato e isopropanol.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el aminoácido portador de grupo tiol o el péptido portador de grupo tiol se elige entre cisteína, homocisteína, glutatión y tioredoxina.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el precursor de la L-metionina se elige entre O-acetil-L-homoserina y O-succinil-L-homoserina.
- 40 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el metilmercaptano se utiliza directamente a la salida del reactor en la síntesis de la L-metionina.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, que comprende al menos las etapas siguientes:

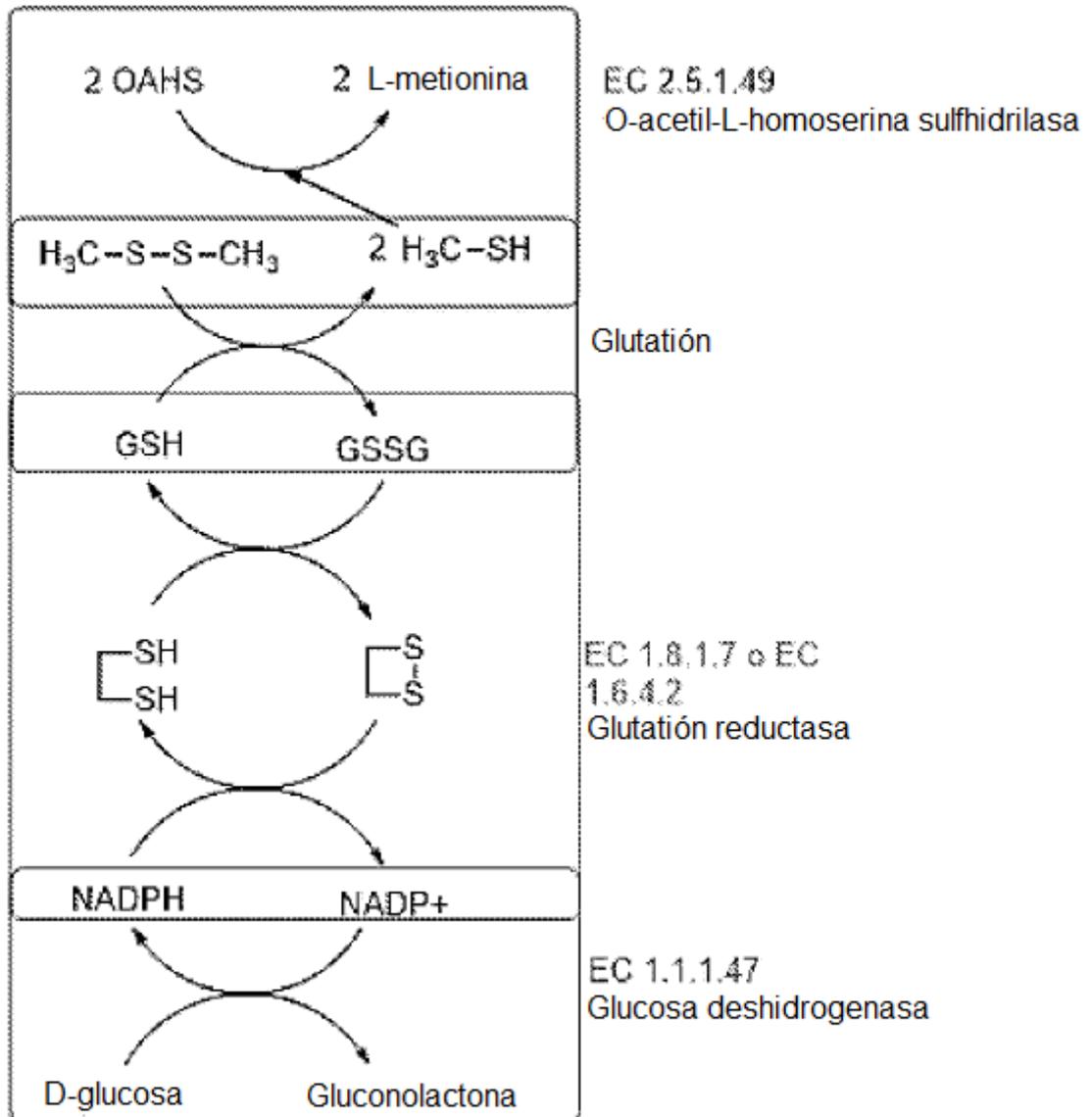
- Etapa 1: preparación de un precursor de la L-metionina, por ejemplo, por fermentación bacteriana de glucosa,
- Etapa 2: reducción enzimática del DMDS en un reactor R1 con formación de metilmercaptano que sale de dicho reactor R1,
- 5 Etapa 3: síntesis enzimática de la L-metionina en un reactor R2 con el precursor de la Etapa 1 y el metilmercaptano de la Etapa 2,
- Etapa 4 (opcional): reciclaje de la gluconolactona formada en la Etapa 3 en la Etapa 1,
- Etapa 5: recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la síntesis de metilmercaptano a partir de DMDS y la síntesis de L-metionina a partir de dicho metilmercaptano se realiza en un solo y único reactor.
- 10 11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende al menos las etapas siguientes:
- Etapa 1': preparación de un precursor de la L-metionina por fermentación bacteriana de glucosa,
- Etapa 2': reducción enzimática del DMDS en un reactor R1 con formación *in situ* de metilmercaptano y síntesis conjunta enzimática de la L-metionina en el mismo reactor con el precursor obtenido en la Etapa 1',
- Etapa 3' (opcional): reciclaje de la gluconolactona formada en la Etapa 2' en la Etapa 1', y
- 15 Etapa 4': recuperación y, eventualmente, purificación de la L-metionina formada.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, realizado en discontinuo o en continuo.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación molar compuesto orgánico reductor/DMDS ideal varía de 0,01 a 100, de forma preferida dicha relación molar se elige entre 0,5 y 5, y de manera completamente preferida, la relación molar es igual a 1.
- 20 14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación molar DMDS/precursor de L-metionina está comprendida entre 0,1 y 10, generalmente entre 0,5 y 5, y preferentemente la relación molar es la estequiometría (relación molar = 0,5).
- 25 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de la reacción está comprendida en un intervalo que va de 10 °C a 50 °C, preferentemente de 15 °C a 45 °C, preferentemente aún de 20 °C a 40 °C.

**Reducción con el complejo  
glutación/glutación reductasa**



-- **Figura 1** --

**Preparación de la L-metionina a partir  
de un precursor de la L-metionina  
de dimetilsulfuro y de un donador de protones  
La glucosa**



**-- Figura 2 --**