

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 407**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010 PCT/KR2010/001250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO2010098629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10746468 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2402453**

54 Título: **Procedimiento para aumentar la productividad de metionina usando una mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo**

30 Prioridad:

27.02.2009 KR 20090016604

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
292, Ssangnim-dong Jung-gu
Seoul, 100-400 , KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SO YOUNG;
SHIN, YONG UK;
HEO, IN KYUNG;
KIM, HYUN AH;
KIM, JU EUN;
SEO, CHANG IL;
SON, SUNG KWANG;
LEE, SANG MOK;
JHON, SUNG HOO;
LEE, HAN JIN;
NA, KWANG HO y
KIM, IL CHUL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 618 407 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 para aumentar la productividad de metionina usando una mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la productividad de L-metionina.

Descripción de la técnica relacionada

10 Metionina es uno de los amino ácidos esenciales en el cuerpo, y se ha usado ampliamente como alimentación animal y aditivo alimentario, así como también como componente de soluciones médicas acuosas y otras materias primas para productos medicinales. Metionina actúa como precursor de colina (lecitina) y creatina, y también se usa como materia prima para la síntesis de cisteína y taurina. Además, funciona como donante de azufre. S-adenosil-metionina procede de L-metionina y sirve como donante de metilo en el cuerpo y/o está implicada en la síntesis de diversos neurotransmisores en el cerebro. Se ha encontrado también que metionina y/o S-adenosil-L-metionina (SAM) previenen la acumulación de lípidos en el hígado y las arterias y son eficaces para el tratamiento de depresión, inflamación, enfermedades hepáticas y dolor muscular (Jeon BR et al., J. Hepatol, 2001, Mar; 34(3): 395-401).

15 Para la síntesis química de metionina, se produce L-metionina a través de la hidrólisis de 5-(β-metilmercaptoetilo)-hidantoína. No obstante, la metionina sintetizada químicamente está presente, de manera desventajosa, en una mezcla de formas L- y D-. Por tanto, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento biológico para sintetizar selectivamente L-metionina, y ya lo han aplicado a una patente (documento WO 2008/013432). El procedimiento, denominado brevemente como "procedimiento de dos etapas", comprende la producción fermentativa de un precursor de L-metionina y la conversión enzimática del precursor de L-metionina en L-metionina. Preferentemente, el precursor de L-metionina incluye O-acetil homoserina y O-succinil homoserina. El procedimiento de dos etapas se evalúa en términos de haber solucionado los problemas de los cuales adolecen los procedimientos convencionales, tales como toxicidad de sulfuro, regulación de retroalimentación de la cepa por parte de metionina y SAME, y degradación de los intermedios por parte de cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa. También, en comparación con el procedimiento de síntesis química convencional de producción de D- y L-metionina, el procedimiento de dos etapas tiene la ventaja de ser selectivo para L-metionina únicamente, con la producción concomitante de ácidos orgánicos, más particularmente, ácido succínico y ácido acético como sub-productos útiles. El ácido succínico se usa como materia prima en pinturas, productos cosméticos, o productos medicinales, y ácido acético es muy útil en los campos industriales, incluyendo la preparación de ácido vinil acético, tinción, productos médicos tales como aspirina y soluciones de fijación fotográfica.

20 En la reacción de conversión enzimática del procedimiento de dos etapas, se usan las enzimas que tienen las actividades de cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa, y se mezcla O-acetil homoserina o O-succinil homoserina como precursor de L-metionina con metil mercaptano para producir L-metionina y un ácido orgánico por medio de reacción enzimática.

25 Metil mercaptano existe como gas a temperatura ambiente, y es ligeramente soluble en agua, y tiene elevada solubilidad en soluciones alcalinas. La reacción de conversión enzimática para la producción de L-metionina tiene lugar en una solución acuosa. De este modo, metil mercaptano tiene una solubilidad mejorada en la solución acuosa, y se espera que aumente en gran medida la productividad de metionina.

30 Considerando el problema anterior, los presentes inventores han realizado un esfuerzo para aumentar la solubilidad de metil mercaptano en la reacción de conversión enzimática para maximizar la producción de L-metionina. Como resultado de ello, encontraron que una mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetil, mezclada en una relación apropiada, puede mejorar la tasa de conversión de L-metionina y un ácido orgánico a partir de un precursor de L-metionina, y de este modo se puede producir L-metionina con elevado rendimiento, en comparación con los procedimientos convencionales, completando de este modo la presente invención.

Sumario de la invención

35 Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para mejorar la tasa de conversión a partir de un precursor de L-metionina, O-acetil homoserina u O-succinil homoserina en la L-metionina, usando la mezcla de un compuesto de azufre, sulfuro de dimetilo y metil mercaptano, que es otro compuesto de azufre usado como sustrato en una reacción de conversión enzimática.

Efecto de la invención

40 Por medio del uso de la presente invención, se pueden aumentar la velocidad de producción y la pureza de L-metionina y un ácido orgánico en comparación con el uso individual de metil mercaptano durante la reacción de conversión. Además, se pueden obtener ventajas económicas de ahorro de costes para la instalación de reacción por medio de la productividad mejorada de metionina.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 es un gráfico de cambio de pH que muestra la velocidad de la reacción de conversión enzimática de acuerdo con el suministro de una solución de metil mercaptano o una mezcla de metil mercaptano y una solución de sulfuro de dimetilo en un reactor discontinuo de 1 l, y
- 5 La Figura 2 es un gráfico que muestra la actividad relativa de acuerdo con la relación de mezcla de una solución de metil mercaptano (SMM) y sulfuro de dimetilo (DMS).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Con el fin de lograr el objeto anterior, un aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir metionina, que comprende:

- 10 1) preparar una solución de reacción que incluye un precursor de metionina que es O-acetil homoserina y una O-succinil homoserina, una enzima que tiene la actividad de convertir el precursor de metionina en metionina, y una mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo; y
- 2) llevar a cabo la reacción de conversión enzimática al tiempo que se agita la solución de reacción,

15 en la que la enzima que tiene actividad de conversión del precursor de metionina en metionina es una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa.

La expresión "procedimiento de dos etapas", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un procedimiento para producir L-metionina divulgado en el documento WO 2008/013432, que comprende las etapas de producción de O-acetil homoserina u O-succinil homoserina por medio de fermentación de glucosa usando un cepa de fermentación preparada de acuerdo con el procedimiento; y conversión de O-acetil homoserina u O-succinil homoserina, junto con metil mercaptano, en metionina por medio de conversión enzimática, produciendo de este modo L-metionina.

20

Posteriormente, la presente invención se describe con detalle.

Un aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir metionina, que comprende:

- 25 1) preparar una solución de reacción que incluye un precursor de metionina que es O-acetil homoserina y una O-succinil homoserina, una enzima que tiene la actividad de convertir el precursor de metionina en metionina, y una mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo; y
- 30 2) llevar a cabo la reacción de conversión enzimática al tiempo que se agita la solución de reacción, en la que la enzima está seleccionada entre el grupo que consiste en una o más enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa.

La agitación de la etapa 2) se puede llevar a cabo a 500 a 1000 rpm, preferentemente a 600 a 900 rpm, y más preferentemente a 700 a 800 rpm.

El procedimiento de la presente invención puede además comprender la terminación de la reacción de conversión enzimática, y es la realización específica de la presente invención, se usa HCl 2 N para terminar la reacción.

35 Además, el procedimiento de la presente invención puede comprender la purificación de metionina presentada en la solución de reacción. En particular, la etapa de purificación de metionina puede comprender:

- 1) separar el microorganismo de la solución de reacción de conversión enzimática;
- 2) decolorar y filtrar la solución de reacción, de la cual se retira el microorganismo; y
- 3) cristalizar a partir del filtrado.

40 La etapa de separación del microorganismo se puede llevar a cabo usando una centrifuga de alta velocidad o un filtro de membrana. La etapa de decoloración y filtración de la solución con el microorganismo retirado se puede llevar a cabo usando un carbono activado, pero no se limita a ello.

En el procedimiento de dos etapas para la producción de metionina, se produce metionina por medio de una reacción de conversión enzimática usando O-acetil homoserina y O-succinil homoserina como precursor de L-metionina y metil mercaptano (CH₃SH) como sustratos (Documento WO2008/013432). En este sentido, se usa metil mercaptano como fuente de azufre que puede reaccionar con el sustrato, O-acetil homoserina y O-succinil homoserina para producir metionina, y de este modo la eficiencia de producción de metionina puede verse afectada en gran medida por la reactividad de metil mercaptano. No obstante, metil mercaptano tiene una solubilidad muy baja en una solución acuosa neutra, y es volátil y, de este modo, se evapora rápidamente de la solución. Por tanto, si se desarrolla un procedimiento capaz de mejorar la reactividad de metil mercaptano, la cantidad máxima posible de metil mercaptano puede reaccionar antes de la evaporación de metil mercaptano, para mejorar el rendimiento de producción de metionina. Por consiguiente, los inventores pretendieron desarrollar la reactividad de metil mercaptano mediante la adición de otro material a la solución de reacción que contenía metil mercaptano. Como resultado de ello, encontraron que cuando se mezcla sulfuro de dimetilo (DMS) como otro material con metil

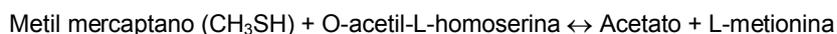
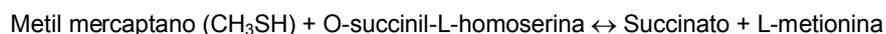
45

50

mercaptano para inducir la reacción, se puede aumentar la tasa de conversión.

En el Ejemplo específico de la presente invención, la reacción de conversión no ocurre cuando se usa sulfuro de dimetilo solo. No obstante, cuando se usa la mezcla de metil mercaptano con sulfuro de dimetilo, aumenta la tasa de conversión, en comparación con el uso individual de metil mercaptano (véase las Tablas 1 y 4, y la Figura 2). Además, la velocidad de reacción fue más elevada que el uso sencillo de metil mercaptano, de acuerdo con la tasa de disminución de pH por parte de ácido acético, que es un sub-producto producido mediante mezcla de sulfuro de dimetilo (véase la Figura 1). Además, cuando se llevó a cabo un suministro continuo de la mezcla (véase la Tabla 2) o un cultivo a gran escala (véase la Tabla 3), también mejoraron las tasas de conversión, en comparación con el uso individual de metil mercaptano. Por consiguiente, el procedimiento de la presente invención puede usarse eficazmente para mejorar la tasa de conversión de L-metionina a partir de O-acetil homoserina y O-succinil homoserina.

La reacción de conversión de metionina a partir del precursor de metionina usando enzimas que tienen actividad de conversión en metionina es como se muestra en los siguientes Esquemas de Reacción.



En los esquemas de reacción anteriores, el residuo de CH₃S- de metil mercaptano está sustituido con el residuo de acetato o succinato de O-succinil homoserina o O-acetil-homoserina para producir metionina.

Tras la reacción, se puede añadir metil mercaptano (CH₃SH) en una diversidad de formas. Preferentemente, se puede añadir metil mercaptano en forma de gas de metil mercaptano o también se puede usar una solución de metil mercaptano de sodio como tipo líquido, debido a que la solución de metil mercaptano de sodio y el gas de metil mercaptano muestran las mismas propiedades de reacción en la solución de reacción acuosa. Por tanto, se puede usar directamente metil mercaptano, o en forma de solución de metil mercaptano de sodio por medio de solubilización en la solución de hidróxido de sodio. No obstante, dado que mercaptano de metilo existe como gas a temperatura ambiente, es más preferible usar una solución de metil mercaptano de sodio preparado por medio de solubilización de metil mercaptano en una solución de hidróxido de sodio.

En la presente invención, la enzima que tiene actividad de conversión en metionina puede incluir una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa.

En la reacción anterior, las enzimas que tienen una actividad de conversión en metionina usadas en la producción de metionina pueden ser las procedentes de una cepa de microorganismo que pertenece a *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Leptospira* sp., *Corynebacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Chromobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Hyphomonas* sp., *Methylococcus* sp., *Methylobacillus* sp., *Nitrosomas* sp., *Kleisella* sp., *Bacillus* sp., *Shigella* sp., *Colwellia* sp., *Salmonella* sp., levadura y hongos.

En la reacción de conversión anterior, cuando se usa O-succinil homoserina como sustrato, la enzima puede incluir uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa, que proceden preferentemente de cepas de microorganismos que pertenecen a *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp. y *Chromobacterium* sp., y más preferentemente procedente de cepas de microorganismos que pertenecen a *Pseudomonas aurogenosa*, *Nocardia Farcinica*, *Pseudomonas putida* y *Chromobacterium Violaceum*.

En la reacción de conversión anterior, cuando se usa O-acetil homoserina como sustrato, la enzima puede incluir un o más seleccionados entre el grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa, que preferentemente proceden de cepas de microorganismos que pertenecen a *Leptospira* sp., *Corynebacterium* sp. e *Hyphomonas* sp., y más preferentemente proceden de cepas de microorganismos que pertenecen a *Leptospira meyeri*, *Pseudomonas aurogenosa*, *Hyphomonas Neptunium* y *Corynebacterium Violaceum*.

En la realización específica de la presente invención, se produjo O-acetil homoserina u O-succinil homoserina que se usa como sustrato en la reacción de conversión para la producción de L-metionina mediante fermentación de la cepa de microorganismos preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2008/013432, y el sustrato, O-acetil homoserina y O-succinil homoserina se purificaron a partir de la solución fermentada por medio de precipitación de metanol.

Además, las enzimas usadas en la reacción de conversión para la producción de L-metionina se obtuvieron a partir de los genes de O-succinil homoserina sulfhidrilasa procedente se *Chromobacterium violaceum* y O-acetil homoserina sulfhidrilasa procedente de *Hyphomonas Neptunium*, en las que las cepas que contienen genes se fermentaron, recuperaron y después interrumpieron de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2008/013432.

La solución de la reacción de conversión se preparó por medio de mezcla de O-acetil homoserina o O-succinil homoserina, que fue el sustrato recuperado por medio del procedimiento anterior, junto con la enzima que tiene una actividad de conversión en metionina.

5 El otro sustrato, metil mercaptano se mezcló con sulfuro de dimetilo en una relación apropiada, y se añadió a la solución de reacción de conversión, y las tasas de conversión de metionina a partir de O-acetil homoserina u O-succinil homoserina se compararon en cada caso. Los resultados mostraron que una relación de mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo fue óptima cuando la relación de metil mercaptano:sulfuro de dimetilo fue de 1,0:0,5 (mol:mol) a 1:1 (mol:mol), preferentemente de 1:0,20 (mol:mol) a 1:1 (mol:mol) y más preferentemente de 1:0,25 (mol:mol) a 1:0,5 (mol:mol). Al mismo tiempo, se usa preferentemente sulfuro de dimetilo en una relación de un 5 % a un 25 %, y más preferentemente de un 20 % a un 25 %, basándose en la concentración molar de metil mercaptano.

La L-metionina preparada mediante el procedimiento divulgado puede estar en forma de polvo seco o en forma líquida disuelta en una solución acuosa, que se purifica por medio de un procedimiento de purificación.

15 El procedimiento de conversión del precursor de L-metionina en L-metionina usando la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo de acuerdo con la presente invención es capaz de producir L-metionina con un rendimiento más elevado que los procedimientos convencionales, y de este modo la metionina producida se puede aplicar a diversos campos incluyendo alimentación animal, aditivos alimentarios, medicinas y otras materias primas para productos medicinales.

20 A continuación, se describen las constituciones y efectos de la presente invención con más detalle con referencia a los Ejemplos. No obstante, estos Ejemplos son con fines únicamente ilustrativos y no se pretende que la invención está limitada a estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Comparación de la Tasa de Conversión de Metionina de O-Acetil Homoserina de Acuerdo con la Relación de Mezcla de Metil Mercaptano y Sulfuro de Dimetilo

25 Tras la reacción de conversión, se mezcló sulfuro de dimetilo con una solución de metil mercaptano a una relación apropiada, y se añadió la mezcla a una solución de reacción de conversión para examinar la tasa de conversión de metionina a partir de O-acetil homoserina.

30 Metil mercaptano existe como un gas a temperatura ambiente, y puede existir en una forma de solución de metil mercaptano de sodio (metil mercaptano de sodio, $\text{CH}_3\text{S-Na}$, 2,14 M, 15 %, Tokyo Chemical Industry, Japón) mediante la adición a una solución de hidróxido de sodio. En el presente Ejemplo, se usó una solución de metil mercaptano de sodio de 2,14 M para llevar a cabo el experimento. A continuación, la solución de metil mercaptano de sodio de 2,14 M se designa como una solución de metil mercaptano. La solución de metil mercaptano y la solución de disulfuro de dimetilo (13,38 M, 99 %, Arkema, Francia) se mezclaron a una relación molar apropiada (mol:mol) y se agitó para preparar una solución mezclada.

35 Se preparó la solución de reacción de conversión mediante adición de 50 μl de solución de enzima de conversión y 5'-fosfato de piridoxal 0,1 mM (Sigma, USA) como cofactor a 1 ml de solución de O-acetil homoserina (500 mM). Se preparó la solución de O-acetil homoserina mediante una solución de O-acetil homoserina purificada a partir de un líquido fermentado en una solución de tampón de fosfato (pH 7,5).

40 Se usó una cepa de CJM-BTJA/pCJ-metXlme-CL preparada mediante el procedimiento divulgado en el documento WO 2008/013432 como cepa de fermentación. La cepa de CJM-BTJA/pCJ-metXlme-CL se inoculó en un fermentador de 5 l, y se llevó a cabo el cultivo por medio de fermentación por lotes durante 50-100 horas. Se purificó O-acetil homoserina a partir del líquido fermentado mediante precipitación de metanol. La enzima de conversión se obtuvo a partir de la cepa de E. coli W3110 transformada con pCJ-MetZ-CL procedente de *Hyphomonas Neptunium*, en la que se fermentó la cepa, y después se recuperó y se interrumpió de acuerdo con el procedimiento divulgado en el documento WO 2008/013432. La mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo se añadió a la solución de reacción de conversión preparada para iniciar la reacción de enzima. En este sentido, la cantidad añadida a la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo se ajustó hasta que la cantidad final de metil mercaptano se hizo de 0,04 mM. Se llevó a cabo la reacción a una temperatura de 33 °C y 800 rpm durante 10 minutos bajo agitación. Para la conclusión de la reacción, se añadió una solución de HCl 0,2 N para terminar la reacción. Se analizó la concentración de la metionina de producto final por medio de HPLC. Se llevó a cabo el análisis en las condiciones divulgadas en el documento WO 2008/013432.

50 Se calculó la tasa de conversión (%) de metionina a partir de O-acetil homoserina partiendo de un porcentaje (%) del número de moles de la metionina producidos con respecto al número de moles del sustrato (mol/l) usados en la reacción. Cuando se produjo 1 mol de metionina a partir de 1 mol de O-acetil homoserina y metil mercaptano, la tasa de conversión (%) fue de un 100 %. Los resultados de análisis se muestran en la siguiente Tabla 1.

55

[Tabla 1]

Comparación de las tasas de conversión de O-acetil homoserina entre diferentes relaciones de mezcla de solución de metil mercaptano (SMM) y sulfuro de dimetilo (DMS)				
Relación molar		Cantidad de producción de Met [met-g]/[10 min]	Tasa de conversión (%)	Actividad relativa (%)
SMM	DMS			
1	0	4,44	74,5	100
1	0,05	4,52	75,7	102
1	0,10	4,62	77,6	104
1	0,20	5,07	85,1	114
1	0,25	5,95	100	134
1	0,35	5,60	94,0	126
1	0,70	5,70	95,6	128
1	1,00	5,88	98,7	132

5 Como se muestra en la Tabla 1, cuando se añadió una mezcla de solución de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo a una relación de 1:0,25 (mol:mol), aumentó la producción de metionina hasta un 34 %, en comparación con el uso individual de metil mercaptano. Cuando la relación de mezcla de solución de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo aumentó más de 1:0,25, la actividad no aumentó más, sino que se mantuvo en un nivel elevado.

10 Como grupo de control, cuando solo se añadió sulfuro de dimetilo a la solución de reacción de conversión en una cantidad idéntica a la presente en la mezcla 1:1 de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo, no se observó la producción de metionina, lo que indica que el uso individual de sulfuro de dimetilo no puede producir metionina. Por tanto, se sugiere que sulfuro de dimetilo se mezcle con metil mercaptano para aumentar la reactividad de metil mercaptano, mejorando de este modo la producción de metionina.

Ejemplo 2: Reacción de Conversión de Metionina Usando una Mezcla de Metil Mercaptano y Sulfuro de Dimetilo

15 Para examinar si la producción mejorada de metionina tiene lugar de forma continua en las mismas condiciones del Ejemplo 1, se examinó la producción de metionina al tiempo que la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo se añadió de forma continua de acuerdo con el tiempo. La reacción se mantuvo usando la misma solución de reacción de conversión durante 30 minutos al tiempo que se añadieron una solución de metil mercaptano y la mezcla con sulfuro de dimetilo cada 10 minutos. Trascurridos 30 minutos, se terminó la reacción, y la cantidad de metionina producida se midió por medio de HPLC. Se llevó a cabo la reacción en la condición de relación de mezcla de solución de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo de 1:0,25 (mol:mol), a la cual se observó la producción más elevada de metionina en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2.

[Tabla 2]

Comparación de las tasas de conversión de acuerdo con el suministro continuo de solución de metil mercaptano o mezcla de sulfuro de dimetilo una escala de un tubo de 1,5 ml		
	Solución de metil mercaptano (100 %)	Mezcla de metil mercaptano: sulfuro de dimetilo (mezcla 1:0,25)
Metionina [g/l]	12,84	14,69
Tasa de conversión [%]	66,88	76,51
Actividad relativa [%]	100,00	114,41

25 Como se muestra en la Tabla 2, la tasa de conversión aumentó hasta aproximadamente un 15 % trascurridos 30 minutos, en comparación con el uso individual de metil mercaptano.

Ejemplo 3: Reacción de Conversión Enzimática de O-Acetil Homoserina en un Reactor Discontinuo de 1 l

Para examinar la eficiencia de la reacción de conversión en un reactor de gran escala, se llevó a cabo la reacción usando 500 ml de O-acetil homoserina 700 mM en un reactor discontinuo de 1 l. Se llevó a cabo la reacción de conversión enzimática al tiempo que se suministraba de forma continua la solución de metil mercaptano o la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo de 1:0,25 (mol:mol) a un caudal de 3,0 ml/min durante 60 minutos. La cantidad de metil mercaptano presente en cada solución se ajustó para que fuese idéntica. La temperatura de reacción fue de 33 °C y se llevó a cabo la agitación a 700 rpm. Se preparó líquido enzimático de conversión de la misma forma que en el Ejemplo anterior, y se añadieron 10 ml del mismo. Se añadió 5'-fosfato de piridoxal 0,1 mM (Sigma, USA) como cofactor. Trascorridas aproximadamente 3 horas, se midió la cantidad de metionina producida por medio de HPLC. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

Comparación de las tasas de conversión de acuerdo con el suministro de metil mercaptano o mezcla de sulfuro de dimetilo en un reactor discontinuo de 1 l.		
	SMM (100 %)	SMM 1: DMS 0,25 M (mol:mol)
Metionina [g/l]	65,6	75,5
Tasa de conversión [%]	85	100
Actividad relativa [%]	100	118

Como se muestra en la Tabla 3, cuando se añadió la mezcla de solución de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo con una relación de 1:0,25 (mol:mol), aumentó la tasa de conversión hasta aproximadamente un 18 %, en comparación con el uso individual de metil mercaptano.

Tras la reacción de conversión de O-acetil homoserina, también se produjo acetato como producto además de metionina, y de este modo tuvo lugar una disminución de pH. Tras el inicio de la reacción, al tiempo que se suministraron la solución de metil mercaptano y la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo, el pH aumentó debido a que se suministró metil mercaptano en forma líquida por medio de solución en NaOH. No obstante, tras completar el suministro, el pH disminuyó. Cuando se produjo ácido acético (en caso de usar O-acetil homoserina como sustrato) o ácido succínico (en caso de usar O-succinil homoserina como sustrato) como sub-productos de la reacción de conversión, la velocidad de reacción de la enzima puede venir reflejada por la velocidad de disminución de pH. Como se muestra en la Figura 1, cuando se usó la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo de 1:0,25 (mol:mol), se encontró que la velocidad de reacción de la enzima de acuerdo con la velocidad de disminución de pH era relativamente elevada, en comparación con el uso individual de metil mercaptano.

Ejemplo 4: Reacción de Conversión Enzimática de O-Succinil Homoserina de Acuerdo con la Cantidad de Adición de Sulfuro de Dimetilo con respecto a Metil Mercaptano

También se usó O-succinil homoserina como sustrato para la reacción de conversión enzimática de metionina para llevar a cabo la reacción de producción de metionina y ácido succínico.

Se añadieron diferentes cantidades de sulfuro de dimetilo a la solución de metil mercaptano en una escala de tubo de 1,5 ml como en el Ejemplo 1, y después se comparó la tasa de conversión de metionina a partir de O-succinil homoserina. Se añadió sulfuro de dimetilo en una relación de metil mercaptano con respecto a sulfuro de dimetilo de 1:0, 1:0,25, 1:0,35 y 1:1 (mol:mol). Se preparó el líquido de reacción de conversión mediante adición de 50 µl de líquido de enzima de conversión y 5'-fosfato de piridoxal 0,1 mM como cofactor a 1 ml de solución de O-succinil homoserina (500 mM). Se preparó la solución de O-succinil homoserina mediante solución de O-succinil homoserina purificada a partir de un líquido fermentado en una solución de tampón de fosfato (pH 7,5). Se inoculó una cepa de CJM-BTJ/pCJ-metA-CL preparada por medio del procedimiento divulgado en el documento WO 2008/013432 en un fermentador de 5 l, y se llevó a cabo el cultivo por medio de fermentación por lotes de alimentación durante 50-100 horas. Se purificó O-succinil homoserina a partir del líquido fermentado por medio de precipitación de metanol. Se obtuvo la enzima de conversión a partir de cepa de E. coli W3110 transformada con pCJ-MetZ-Cl procedente de *Chromobacterium violaceum*, en la que se fermentó la cepa, y después se recuperó y se interrumpió de acuerdo con el procedimiento divulgado en el documento WO 2008/013432. Se añadieron 0,05 ml de enzima. Se añadieron 0,02 ml de cada mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo a diferentes relaciones a la solución de reacción de conversión preparada para iniciar la reacción de enzima. Se ajustó cada solución para que tuviera la cantidad idéntica de metil mercaptano. Se llevó a cabo la reacción a una temperatura de 33 °C y 800 rpm durante 10 minutos bajo agitación. Para la terminación de la reacción, se añadió una solución de HCl 0,2 N para terminar la reacción. Se analizó la concentración de metionina de producto final por medio de HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Comparación de las tasas de conversión de O-succinil homoserina de acuerdo con la cantidad añadida				
Relación de mezcla de metil mercaptano: sulfuro de dimetilo (mol: mol)	1:0	1:0,25	1:0,35	1:1
Metionina [g/l]	4,3	4,6	4,7	4,5
Tasa de conversión [%]	86	94	95	92
Actividad relativa [%]	100	109	110	107

- 5 Como se muestra en la Tabla 4, cuando la mezcla de solución de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo se añadió con una relación de 1:0,35 (mol:mol), la actividad aumentó hasta aproximadamente un 10 %, en comparación con el uso individual de metil mercaptano. Cuando la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo se añadió con una relación de 1:0,25 y 1:1 (mol:mol), la actividad enzimática no aumentó en gran medida, en comparación con la relación de mezcla de 1:0,35 (mol:mol), sino que cada una de las actividades enzimáticas aumentó en aproximadamente un 9 % y 7 %, en comparación con el uso individual de metil mercaptano.

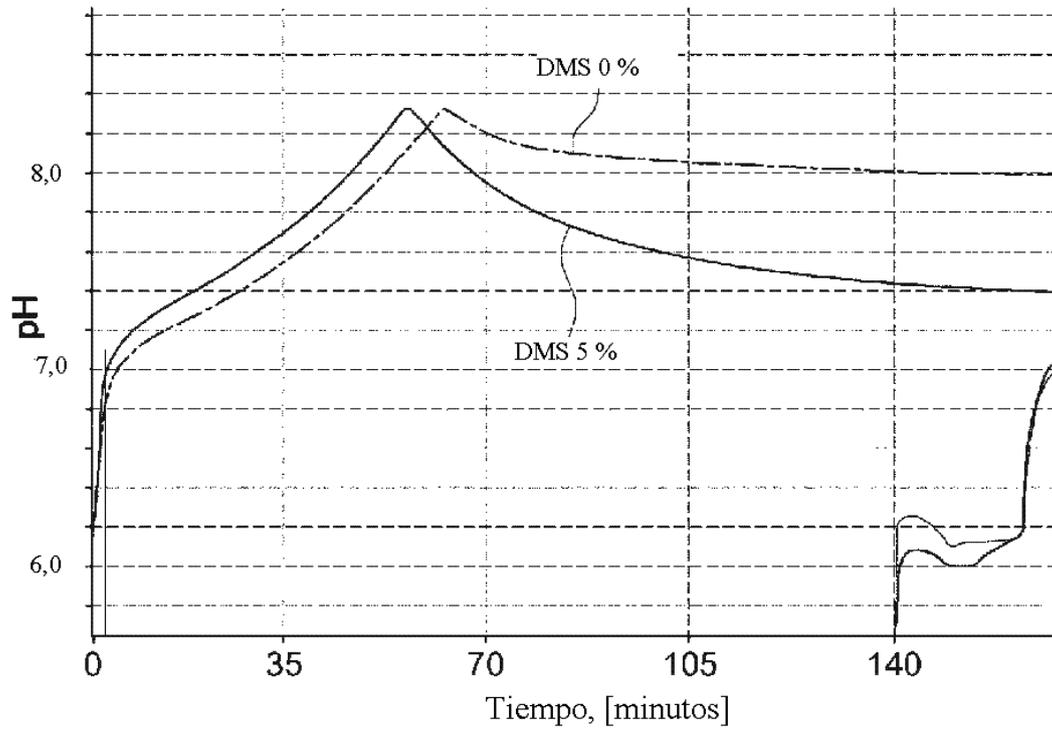
Aplicabilidad Industrial

- 10 Como se ha descrito en los Ejemplos anteriores, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la tasa de conversión de metionina, aplicándose a diversos campos incluyendo alimentación animal, aditivos alimentarios y medicinas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de L-metionina, que comprende:
- 5 1) preparar una solución de reacción que incluye (i) un precursor de metionina que es una O-acetil homoserina o una O-succinil homoserina, (ii) una enzima de conversión que tiene la actividad de convertir el precursor de metionina en metionina y (iii) una mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo; y
2) llevar a cabo una reacción de conversión enzimática al tiempo que se agita la solución de reacción;
- en el que la enzima de conversión es una o más seleccionada entre el grupo que consiste en cistationina gamma sintasa, O-succinil homoserina sulfhidrilasa y O-acetil homoserina sulfhidrilasa.
- 10 2. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el metil mercaptano es un gas de metil mercaptano o una solución de metil mercaptano de sodio.
3. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo tiene una relación molar de metil mercaptano : sulfuro de dimetilo de 1:0,05 a 1:1.
4. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo tiene una relación molar de metil mercaptano : sulfuro de dimetilo de 1:0,20 a 1:1.
- 15 5. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la mezcla de metil mercaptano y sulfuro de dimetilo tiene una relación molar de metil mercaptano : sulfuro de dimetilo de 1:0,25 a 1:0,5.
6. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende terminar la reacción de conversión enzimática.
- 20 7. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprender purificar la L-metionina.
8. Un procedimiento de producción de L-metionina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se produce O-acetil homoserina u O-succinil homoserina en una etapa anterior por medio de fermentación de glucosa usando un microorganismo y en el que la etapa de purificación de metionina comprende:
- 25 1) separar el microorganismo de la solución de reacción de conversión enzimática;
2) decolorar y filtrar la solución de reacción de la cual se ha retirado el microorganismo; y
3) cristalizar a partir del filtrado.

[FIG. 1]



[FIG. 2]

