

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 561**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2011 E 11185853 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2444486**

54 Título: **Mutantes de O-fosfoserina sulfhidrilasa y procedimiento de producción de cisteína usando los mismos**

30 Prioridad:

20.10.2010 KR 20100102665

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

13.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHIN, SOO AN;
CHANG, JIN SOOK;
UM, HYE WON;
JO, JAE HYUN;
SONG, BYEONG CHEOL y
LEE, KYOUNG MIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 561 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

Mutantes de O-fosfoserina sulfhidrilasa y procedimiento de producción de cisteína usando los mismos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un mutante de O-fosfoserina sulfhidrilasa (denominada también "OPSS") que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de *Mycobacterium smegmatis* que corresponde a la de las SEC ID N°: 3 o 4.

10 La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS, un vector de expresión que porta la molécula de ácido nucleico, y un transformante transformado con el vector de expresión. Además, la presente invención concierne a un procedimiento producción de cisteína haciendo reaccionar O-fosfo-L-serina (OPS) con un sulfuro en presencia del mutante de OPSS.

Técnica anterior

15 La L-cisteína es un aminoácido que juega un papel importante en el metabolismo del azufre en todos los organismos vivos. Se usa en la biosíntesis de proteínas, tales como la queratina del cabello, glutatión, biotina, metionina, y otros metabolitos que contienen azufre y también sirve como precursor de la coenzima A. Además, se sabe que la biosíntesis de la cisteína se asocia estrechamente con la biosíntesis de otros aminoácidos incluyendo L-serina, L-glicina, y L-metionina. Industrialmente, la L-cisteína y sus derivados encuentran aplicaciones en una variedad de campos incluyendo la industria farmacéutica (para el tratamiento de enfermedades bronquiales), la industria cosmética (en champú para el cabello, composiciones para ondulados permanentes, etc.), y la industria alimentaria (antioxidantes, potenciadores del sabor, adyuvantes de la masa, etc.).

20 Tradicionalmente, la L-cisteína se obtenía industrialmente mediante hidrólisis ácida de cabello humano o plumas animales (Biotechnology of the Amino Acids Production editado por Ko Aida, páginas 217-223, 1986). Sin embargo, la producción de cisteína de cabello o plumas no solamente asegura un rendimiento tan bajo como del 7 - 8 %, sino que el uso de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico produce una cantidad significativa de residuos contaminantes para el medio ambiente. Además, los consumidores pueden tener una fuerte aversión a la extracción de cabello o plumas. Estos problemas han ocasionado un impulso para el desarrollo de procesos de producción de L-cisteína respetuosos con el medio ambiente, conduciendo a la fermentación de L-cisteína utilizando microorganismos.

25 La conversión biológica de D, L-ATC usando un microorganismo es representativa de la producción microbiana de L-cisteína (Ryu OH, Ju JY, y Shin CS, Process Biochem., 32:201-209, 1997). Sin embargo, este proceso de conversión, es difícil de aplicar industrialmente debido a la baja solubilidad del precursor D, L-ATC. Otro proceso producción de L-cisteína es la fermentación directa usando *E. coli* (Patente N° EP 0885962B; Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). La acumulación excesiva de L-cisteína en los microorganismos provoca toxicidad intracelular, dando como resultado la limitación para la producción de L-cisteína a una concentración alta. Para superar este inconveniente, se emplearon proteínas exportadoras de L-cisteína, sin embargo no hubo mejoras significativas de la productividad.

35 Con referencia a la ruta de la biosíntesis de la L-cisteína en bacterias y plantas, la O-acetil-serina (OAS) actúa como un precursor intermediario que proporciona el esqueleto de carbono de la L-cisteína (Kredich NM y Tomkins GM, J. Biol. Chem., 241: 4955-4965, 1966). La enzima O-acetilserina sulfhidrilasa (OASS), que usa sulfuro de hidrógeno como donante se azufre, cataliza la conversión de O-acetilserina a S-sulfocisteína y finalmente a cisteína, liberando acetato. Como alternativa, el SO₄ puede reducirse a tiosulfato para usarse como donante de azufre en la producción de cisteína (Nakamura T, Kon Y, Iwahashi H, y Eguchi Y, J. Bacteriol., 156: 656-662, 1983). La ruta de la biosíntesis de cisteína por medio de OAS usa las dos enzimas de la serina acetil-transferasa (CysE), que cataliza la conversión de serina a OAS, y cisteína sintasa (CysK), que cataliza la conversión de OAS a cisteína. Cabe destacar que entre ellas la serina acetiltransferasa (CysE) es altamente sensible a la inhibición por retroalimentación mediante de la cisteína del producto final (Wada M y Tagaki H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). Por lo tanto, es necesaria una enzima alterada que sea insensible a la inhibición por retroalimentación, sin embargo esta es difícil de desarrollar.

Divulgación

Problema técnico

50 Dirigiendo la presente invención, la investigación intensiva y minuciosa en la producción de L-cisteína a un alto rendimiento realizada por los presentes inventores destinada a superar los problemas encontrados en la técnica anterior, dio como resultado el hallazgo de que existe O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) en *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Trichomonas vaginalis* que toma una ruta específica de la O-fosfo-L-serina (OPS), en lugar de la ruta específica de OAS, para sintetizar L-cisteína (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW, y Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC, y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006) y que la OPSS de *M. tuberculosis*, que cataliza la conversión de OPS a cisteína con las enzimas adicionales mec+ y cysO,

puede usar Na₂S como donante de azufre en la conversión de OPS a cisteína incluso en ausencia de las enzimas adicionales cuando los cinco restos de aminoácidos del extremo C-terminal se eliminan de la misma (Agren D, Schnell R y Schneider G, FEBS letters, 583: 330-336, 2009).

Solución técnica

- 5 Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un mutante de O-fosfoserina sulfhidrilasa (también denominada "OPSS") que tenga una secuencia de aminoácidos derivada de *Mycobacterium smegmatis* que consiste en las SEC ID N°: 3 o 4.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS.

- 10 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un vector de expresión que porta la molécula de ácido nucleico.

Es otro objeto adicional de la presente invención proporcionar un transformante transformado con el vector de expresión.

- 15 Es otro objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para la conversión de O-fosfo-L-serina en cisteína con un sulfuro en presencia del mutante de OPSS.

Efectos ventajosos

Como se ha descrito anteriormente, el mutante de OPSS con actividad enzimática mejorada que es esencial para la conversión enzimática de la O-fosfoserina en L-cisteína, puede usarse para producir L-cisteína a partir de OPS a escala masiva a un alto rendimiento de un modo sencillo.

- 20 **Descripción de las figuras**

La FIG. 1 es una gráfica que muestra la actividad de la OPSS de acuerdo con la temperatura.

La FIG. 2 es un conjunto de gráficas que muestran la sensibilidad al pH de la OPSS.

La FIG. 3 es una fotografía que muestra el nivel de expresión de la enzima en un sistema pET y un sistema pCL-Pcj1 como se analizó por SDS PAGE.

- 25 La FIG.4 es una gráfica que muestra la actividad enzimática de OPSS para convertir caldo de fermentación de OPS en cisteína.

La FIG. 5 es una gráfica que muestra la actividad enzimática de OPSS para convertir caldo de fermentación de OPS en cisteína.

- 30 La FIG. 6 es una gráfica que muestra la producción de OPS y cisteína que se convierte mediante la OPSS usando OPS como un sustrato a una escala de un frasco de 1 l.

La FIG. 7 es una vista esquemática que muestra el mapa de un vector de expresión pCL-Pcj1 que porta un gen que codifica un mutante de OPSS.

Mejor modo

- 35 La presente divulgación proporciona un mutante de OPSS derivado de *Mycobacterium smegmatics* con la misma secuencia de aminoácidos que la de SEC ID N°: 1, con la excepción de carecer de 3 a 7 restos de aminoácidos del extremo C-terminal de la secuencia aminoácidos de la O-fosfoserina sulfhidrilasa de tipo silvestre.

- En una realización de la presente divulgación, el mutante de OPSS de la presente invención puede tener una de las secuencias de aminoácidos como las de las SEC ID N°: 2, 3, y 4. El mutante de OPSS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 puede modificarse adicionalmente para tener una sustitución del resto de prolina (Pro) en la posición 77 con un resto de serina (Ser). Además, el mutante de OPSS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 puede modificarse adicionalmente para tener una sustitución del resto de treonina (Thr) en la posición 131 con un resto de alanina (Ala), el resto de lisina (Lys) en la posición 137 con un resto de asparagina (Asp) y el resto de treonina (Thr) en la posición 238 con un resto de serina (Ser). Además, las secuencias de aminoácidos que comparten homología de al menos el 50 %, preferentemente el 60 %, 70 %, 75 %, y 80 %, más preferentemente el 85 %, 90 % y 95 %, y más preferentemente del 97 % al 99 % con los mutantes anteriormente mencionados, se desvelan en el presente documento.

- La expresión "*Mycobacterium smegmatics*" se refiere a una cepa con forma de bacilo del filo *Actinobacteria* que es pequeña, rectilínea, o ligeramente curvada, que tiene ramas irregulares y que se puede teñir con la tinción básica de anilina. En la presente invención, se descubrió que cuando su secuencia de aminoácidos se modificaba, la O-fosfoserina sulfhidrilasa derivada de la cepa, podía catalizar la biosíntesis de la L-cisteína con un rendimiento aumentado.

- Como se usa en el presente documento, la expresión "O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS)" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de OPS en cisteína. La enzima se descubrió por primera vez en *Aeropyrum pernix* y se le dio nombre (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003, SEC ID N°: 6).

Se pueden usar diversos procedimientos bien conocidos para obtener OPSS. Los ejemplos ilustrativos de los procesos incluyen, pero no se limitan a, técnicas de síntesis génica que se basan en la optimización de codones mediante los cuales se pueden obtener enzimas de interés a un alto rendimiento, y procedimientos bioinformáticos de exploración de recursos enzimáticos útiles basados en almacenamientos masivos de información genética de microorganismos. En una realización de la presente invención, las enzimas OPSS que utilizan OPS como un sustrato para sintetizar cisteína, se seleccionaron de diversos microbios. En este sentido, se realizó la (lisis) de los sedimentos celulares obtenidos usando medio adecuado y condiciones de cultivo conocidos en la técnica, seguido de la purificación del sobrenadante que contenía la enzima para producir la enzima OPSS.

Como se usa en el presente documento, el término "mutante" se refiere a un cultivo o a un individuo que muestra una alteración estable en el fenotipo heredable o no heredable. Cuando se usa junto con OPSS (O-fosfoserina sulfhidrilasa), el término "mutante" quiere decir que una enzima OPSS se altera genéticamente de modo que su actividad se puede mejorar eficazmente, en comparación con el tipo silvestre.

Basándose en el informe de que los mutantes de OPSS derivados de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con la eliminación de cinco restos de aminoácidos del extremo C-terminal muestran una afinidad aumentada para una fuente de azufre que contiene grupos s^{2-} incluso en ausencia de enzimas adicionales, se preparó un mutante de OPSS eliminando cinco restos de aminoácidos del extremo C-terminal de la OPSS de *Mycobacterium smegmatis*. El mutante de OPSS de acuerdo con la presente divulgación puede tener una secuencia de aminoácidos derivada de *Mycobacterium smegmatis* que corresponde a la de la SEC ID N°: 1 en la que se eliminan de tres a siete, preferentemente cinco, restos de aminoácidos del extremo C-terminal.

En una realización de la presente divulgación, se observó que el mutante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 mostraba una tasa de conversión del 100 % una hora después de aplicarlo a la conversión de OPS en cisteína (Tabla 5).

La sustitución de aminoácidos puede aumentar además la actividad enzimática del mutante de OPSS de la presente invención. Siempre que se conozca bien en la técnica, se puede usar cualquier procedimiento para mejorar la enzima. En la presente invención, se empleó, preferentemente, la mutagénesis aleatoria para producir una mejora en la actividad enzimática del mutante de OPSS. En detalle, después de que se permitiera que la OPSS se sometiera a mutagénesis aleatoria, los mutantes con actividad enzimática mejorada se seleccionaron usando el sistema de exploración desarrollado basándose en la EAR (exploración de alto rendimiento) por los presentes inventores. Como resultado, los mutantes de OPSS, Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3, que tienen actividad enzimática mejorada, se obtuvieron realizando una exploración EAR en un gen Msm-T. El Msm-T-HA2 es un mutante de OPSS que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la de la SEC ID N°: 2, con la excepción de que el resto de prolina (Pro) de la posición 77 se sustituye con un resto de serina (Ser). El Msm-T-EP3 es un mutante de OPSS que tiene los mismos restos de aminoácidos de aminoácidos que los de la SEC ID N°: 2, con la excepción de que la mutación de sustitución ocurre con un resto de alanina (Ala) por el resto de treonina (Thr) en la posición 131, con un resto de asparagina (Asp) por el resto de lisina (Lys) en la posición 137, y con un resto de serina (Ser) por el resto de treonina (Thr) en la posición 238. De acuerdo con la presente invención los mutantes de OPSS Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3 consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4, respectivamente.

En una realización de la presente invención, se descubrió que tanto Msm-T-HA2 como Msm-T-EP3 mostraban una actividad enzimática más elevada que Msm-T teniendo un resto de aminoácido de la SEC ID N°: 2 (Tablas 5 y 6). En detalle, los mutantes de OPSS Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3 se midieron para mostrar aumentos de 5 veces y 1,2 veces en las tasas de conversión en una etapa temprana de la reacción de conversión, en comparación con la Msm-T control. Además, incluso cuando el mutante Msm-T-HA2, cuya actividad de síntesis de cisteína es 4 veces mayor que la de la enzima Msm-T y que se usó en una cantidad correspondiente al 40 % de Msm-T, la tasa de conversión de cisteína final fue similar.

El término "homología", tal como se usa en el presente documento, está concebido para referirse al porcentaje de identidad entre dos polipéptidos. La correspondencia entre una secuencia respecto a otra puede determinarse por técnicas que se conocen en la materia. Por ejemplo, la homología puede determinarse por una comparación directa de la información de las secuencias entre dos moléculas polipeptídicas mediante alineamiento de la información de las secuencias y usando programas informáticos de fácil disponibilidad. Como alternativa, la homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa monocatenaria específica, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" en todas sus formas gramaticales y variantes ortográficas se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de las inmunoglobulinas) y proteínas homólogas de distintas especies (por ejemplo, cadena ligera de la miosina, etc.). Dichas proteínas (y sus genes codificantes) tienen homología de secuencia, tal como se refleja por su similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no referirse a un origen evolutivo común.

Como se usa en el presente documento, la expresión "similitud de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común. En una realización específica, dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos el 21 % (preferentemente al menos aproximadamente el 50 %, y más preferentemente de aproximadamente el 75 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, o el 99 %) de los aminoácidos coinciden a lo largo de la longitud definida de las secuencias de aminoácidos. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando un programa informático convencional disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern, por ejemplo, en condiciones estrictas tal como se define para ese sistema en particular. Las condiciones de hibridación definidas están dentro del alcance de la técnica (por ejemplo, Sambrook y col., 1989, mencionado a continuación).

Los mutantes de OPSS de la presente invención pueden catalizar la transferencia de un grupo tiol (grupo SH) a OPS para producir cisteína. Preferentemente, las condiciones que permiten que los mutantes de OPSS de la presente invención ejerzan su actividad óptima incluyen i) la presencia de PLP (piridoxal-5'-fosfato) de 0-2 mM o DTT (ditiotreitól) de 0-100 mM como cofactor, ii) una temperatura de reacción de 25 a 60 °C; y iii) pH de desde 6,0 a 10,0, pero no se limitan a las mismas.

Un ensayo para la actividad enzimática de OPSS que cataliza la síntesis de cisteína transfiriendo un grupo tiol al sustrato OPS se desveló junto con la nomenclatura de la Ape-OPSS (Ape-O-fosfoserina sulfhidrilasa). En particular, debido a que Ape-OPSS tiene la actividad de convertir OAS en cisteína mediante la transferencia de un grupo tiol, el ensayo se basa en la medición de la actividad de la enzima sintetizadora de cisteína de *E.coli* (OASS, O-acetilserina sulfhidrilasa, EC 4.2.99.8)) (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003).

En el ensayo de acuerdo con una realización de la presente invención, el PLP, que proporciona un grupo tiol para la OAS (O-acetilserina) u OPS, sirviendo como un cofactor de OASS u OPSS en la conversión de cisteína, se añade a una concentración de aproximadamente 0,2 mM. También, se añade DTT no solamente para impedir la oxidación de la cisteína expuesta al aire a cisteína, sino también para cuantificar la cantidad de cisteína ya oxidada, gracias a su poder reductor. Preferentemente, cuando se añadió DTT 25 mM o PLP 0,2 mM, la tasa de conversión de cisteína aumentó 2,3 veces. Es decir, PLP y DTT tienen influencias positivas en la conversión de OPS en cisteína.

Las enzimas Ape-OPSS, Mtb-OPSS, y Mtb-T tienen una temperatura de reacción a 60 °C o 37 °C, con un pH óptimo de 7,4, como se informó anteriormente (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Agren D, Schnell R y Schneider G, FEBS letters, 583: 330-336, 2009). Basándose en el informe, pueden optimizarse las condiciones de la reacción de conversión para los mutantes de OPSS con actividad enzimática mejorada. En una realización de la presente invención, los mutantes de OPSS pueden catalizar la conversión a una temperatura de desde 37 °C a 80 °C. En detalle, la enzima Ape-OPSS de *Archea spp.*, que puede crecer incluso a altas temperaturas, muestra una actividad enzimática más elevada a 60 °C que a 37 °C. También, la estabilidad a alta temperatura de la enzima en sí conduce a una temperatura óptima de 60 °C. Por otro lado, Msm-T muestra una actividad enzimática óptima a 37 °C y es vulnerable al tratamiento con calor a 60 °C. Se descubrió que las enzimas de OPSS retenían la actividad de conversión a lo largo de un intervalo de pH de desde 6,0 a 10. La actividad enzimática óptima se detectó a un pH de 7,4 en Ape-OPSS y un pH de 8,0 a 9,0 en Msm-T. Por lo tanto, Msm-T es estable a lo largo de un intervalo más amplio de pH de lo que lo es Ape-OPSS.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" está concebida para abarcar moléculas de ADN y ARN. Los nucleótidos, que componen las unidades estructurales de las moléculas de ácido nucleico, incluyen no solamente los nucleótidos de origen natural, sino los análogos modificados con un resto de azúcar o con un resto básico (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York (1980), Uhlman y Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990)).

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona un vector de expresión que porta la molécula de ácido nucleico.

Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación de y/o transferencia de un ácido nucleico a una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que se puede unir otro segmento de ADN con el fin de producir la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, capaz de replicarse bajo su propio control. El término "vector" incluye tanto vehículos virales como no virales para introducir el ácido nucleico en una célula huésped *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. El término "vector" también puede incluir ADN minicirculares. Por ejemplo, el vector puede ser un plásmido sin secuencias de ADN bacteriano. Se ha mostrado que la eliminación de secuencias de ADN bacteriano que son ricas en regiones CpG disminuye el silenciamiento de la expresión de transgenes y da como resultado la expresión más persistente de los vectores plasmídicos de ADN (véase, por ejemplo, Ehrhardt, A. y col., (2003) Hum Gene Ther 10: 215-25; Yet, N. S. (2002) Mol Ther 5: 731-38; Chen, Z. Y. y col., (2004) Gene Ther 11: 856-64). El término "vector" también puede incluir transposones tales como

Sleeping Beauty (Izsvak y col. J. Mol. Biol. 302:93-102 (2000)), o cromosomas artificiales.

Como vector, el sistema pET (Novagen) que usa un promotor de T7 se conoce bien en la técnica. En la presente invención, se pueden usar, sin limitación, diversos sistemas de expresión conocidos en la técnica.

5 En una realización de la presente invención, se empleó un sistema de expresión que usaba un promotor de CJ1, desarrollado por los presente inventores, para expresar un gen exógeno (véase, la publicación de Patente coreana abierta a inspección pública N° 10-2006-0068505, FIG. 7).

10 En una realización de la presente invención, los niveles de expresión de OPSS entre el sistema pET que comprende un promotor de T7 y el sistema CJ1 que comprende un promotor de CJ1 se compararon dadas las mismas condiciones. Como resultado, el sistema CJ1 mostró un nivel de expresión de OPSS más elevado que el que mostró el sistema pET (FIG. 3). Además, la sobreexpresión de OPSS requirió una temperatura baja (18 °C) y un largo periodo de tiempo en el sistema pET, pero una temperatura elevada (37 °C) y un corto periodo de tiempo en el sistema CJ1. Por lo tanto, es preferible que el promotor CJ1 se use para obtener OPSS de un modo efectivo, pero la presente invención no se limita al mismo.

15 De acuerdo con un aspecto aún adicional de la misma, la presente invención proporciona un transformante transformado con el vector de expresión.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" en todas sus formas gramaticales y variantes ortográficas se refiere a la alteración genética artificial de una célula resultante de la introducción de un gen ajeno a la célula huésped de modo que el gen introducido se pueda replicar por sí mismo o como un factor incorporado en el cromosoma.

20 El vector de la presente invención puede introducirse en células huésped por técnicas convencionales adecuadas que se conocen en la materia, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a, electroporación, co-precipitación con fosfato de calcio, infección retroviral, microinyección, DEAE-dextrano, y calcio liposoma catiónico.

25 La expresión "célula huésped transformada con un vector recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un célula huésped que se ancla a un vector recombinante en el que se porta un gen de interés. La célula huésped adecuada, para su uso en la presente invención, puede ser procariota o eucariota. Los ejemplos incluyen enterobacterias y bacterias corineformes, con preferencia por *Escherichia* spp. y *Serratia* spp., siendo *E.coli* la de mayor preferencia.

30 De acuerdo con otro aspecto adicional de la misma, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de cisteína, que comprende convertir OPS con un sulfuro en presencia del mutante de OPSS de la presente invención.

El mutante de la presente invención puede aplicarse para la producción masiva de cisteína. Cuando se usa el transformante que expresa la mutación, la producción masiva de cisteína puede llevarse a cabo en condiciones óptimas de cultivo que se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, el procedimiento para la producción masiva de cisteína comprende cultivar el transformante unas condiciones óptimas bien conocidas en la técnica.

35 Para su uso como un sustrato, la OPS puede estar en forma pura o puede estar en la forma de un cultivo de fermentación que contiene OPS. La OPS pura puede estar comercialmente disponible, como se identifica en el N° de catálogo P0878 de Sigma-Aldrich o CAS407-41-0 de Wako. Sin embargo, el cultivo que contiene OPS, obtenido por fermentación microbiana, tiene las ventajas económicas sobre la OPS pura comercialmente disponible de que el cultivo que contiene OPS puede usarse sin purificación adicional y el cofactor PLP necesario para la conversión puede obtenerse en el cultivo fermentado.

Cualquier compuesto de azufre puede usarse en la presente invención, siempre que pueda convertirse en un grupo tiol (SH). Preferentemente puede usarse, Na₂S, H₂S, o S₂O₃, bien en forma líquida o gaseosa.

45 En una realización de la presente invención, se usó Na₂S como una fuente de azufre. El Na₂S puede añadirse a una concentración molar de 0,1 a 3 veces más alta que la de la OPS usada en la conversión enzimática. En detalle, Msm-T-HA2, que tiene una tasa de conversión de cisteína del 80 %, que es equivalente a la de Msm-T, se usa a una concentración de 50 µg/ml en una condición de reacción que comprende caldo de fermentación de OPS 50 mM o caldo de fermentación de OPS 60 mM purificado, Na₂S 100 mM o 120 mM, y PLP 0,2 mM.

50 Será obvio, y entenderán fácilmente los expertos en la materia, que un proceso de conversión enzimática se puede optimizar y ampliar con enzimas altamente activas. En una realización, cuando se incubaron 19,317 g/l de caldo de fermentación de OPS en presencia de 50 mg de Msm-T-HA2, se produjo cisteína a una concentración de hasta 9,075 g/l. En un frasco de 1 l, la OPS se convirtió en cisteína a una tasa del 71,83 % en presencia del mutante (FIG. 6).

Abreviaturas y terminología

Para explicar mejor la presente invención e instruir a aquellos técnicos en la materia a realizar la presente invención, se da una descripción de las siguientes palabras y procedimientos. A menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de toda la descripción y reivindicaciones, las palabras "comprende", "comprender" y similares se interpretarán en un sentido inclusivo como oposición a un sentido exclusivo o exhaustivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no se limita a". Los términos singulares, "un" o "una" y "el", "la", incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "que comprende una célula" significa "que incluye una célula o una pluralidad de dichas células, pero no se limita a la misma".

Cuando se usa en referencia a una lista de dos o más elementos, la palabra "o" cubre todas las siguientes interpretaciones de la palabra: cualquiera de los elementos de la lista, todos los elementos de la lista, y cualquier combinación de los elementos de la lista. A menos que se declare lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados como se entienden por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. Los procedimientos y materiales pertinentes se desvelan a continuación, pero se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes en las prácticas o experimentos de la presente invención. Los materiales, procedimientos, y ejemplos que se dan a continuación se exponen para ilustrar, pero no se interpretan como limitativos de la presente invención. Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Deleción: Una mutación en la que uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos se han eliminado de una molécula de ácido nucleico o de una proteína, respectivamente.

Modo para la invención

Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1: Desarrollo de OPSS

Se ha informado de que *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Trichomonas vaginalis* tienen OPSS, una enzima que usa OPS, en lugar de OAS en *E. coli*, como un sustrato para la síntesis de cisteína (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW, y Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC, y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006). Basándose en el informe, los presentes inventores descubrieron dos tipos de OPSS que convierten la OPS en cisteína, la de *Aeropyrum pernix* y la de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Entre ellas, la enzima OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se usó para explorar la homología de los aminoácidos. Como resultado, tres mutantes de OPSS, Msm-OPSS, Rjo-OPSS y Nfa-OPSS, se recogieron de la cepas MC2 155 de *Mycobacterium smegmatis*, RHA1 de *Rhodococcus jostii*, e IFM 10152 *Nocardia farcinica*, respectivamente.

Para obtener OPSS de cada cepa, se construyó un sistema de vectores pET28a (Novagen), que típicamente se usa para la expresión de enzimas. Cada uno de los moldes y cebadores para su uso en la clonación de las cinco enzimas OPS sulfhidrilasa y los plásmidos recombinantes resultantes se resumen en la Tabla 1, indicada más adelante. Las combinaciones adecuadas de moldes y cebadores, como se dan en la Tabla 1, se usaron para la PCR para amplificar cada uno de los genes OPSS. Los productos de PCR y el vector pET28a se digirieron con NdeI y HindIII (37 °C durante 3 horas). Cada uno de los fragmentos génicos se ligó al vector pET28a digerido (Novagen). La secuenciación de las bases confirmó la construcción de los vectores de expresión que portan cada uno de los genes OPSS. Los vectores de expresión de las enzimas se introdujeron en *E. coli* (DE3) para producir cepas capaces de expresar las cinco enzimas OPSS. En la siguiente Tabla 1 se ofrecen los nombres de las enzimas.

[Tabla 1]

Enzima	Vector	Molde	Cebador
Ape-OPSS	pET28a-Ape-OPSS	ADN sintético	SEC ID Nos: 7 y 8
Mtb-OPSS	pET28a-Mtb-OPSS	ADN genómico Mtb	SEC ID Nos: 9 y 10
Msm-OPSS	pET28a-Msm-OPSS	ADN genómico Msm	SEC ID Nos: 11 y 12
Rjo-OPSS	pET28a-Rjo-OPSS	ADN genómico Rjo	SEC ID Nos: 13 y 14
Nfa-OPSS	pET28a-Nfa-OPSS	ADN genómico Nfa	SEC ID Nos: 15 y 16

La expresión de las enzimas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del sistema pET (Novagen). Las colonias individuales de cada cepa de las placas de LB se inocularon en 5 ml de caldo LB y se incubaron a 37 °C durante 16 horas mientras que se agitaban a 200 rpm. Los cultivos se transfirieron a 25 ml de caldo LB reciente (en matraces de 250 ml) y se incubaron a una DO₆₀₀ de 0,5 ~ 0,6 (durante 2 ~ 3 horas) en las mismas condiciones, inmediatamente después de lo cual se añadió IPTG 1 mM a los medios para inducir la expresión de las enzimas durante la incubación a 18 °C durante 18 horas mientras que se agitaban a 120 rpm. Las enzimas se

purificaron usando columnas de Ni-NTA para el marcaje His, con la ayuda de las His SpinTrap (GE Healthcare). Se descubrió que de las cinco enzimas OPSS aisladas, cuatro estaban en forma soluble, siendo una (Rjo-OPSS) un cuerpo de inclusión, como se analizó por electroforesis en SDS-PAGE al 14 %.

Ejemplo 2: Ensayo de OPSS para la actividad de la síntesis de cisteína

- 5 Las cuatro enzimas OPSS obtenidas de diversas cepas de microorganismos se ensayaron con relación a la capacidad de catalizar la conversión de OPS a cisteína. Con respecto a las condiciones y procedimientos del ensayo (ensayo enzimático cysM), se hizo mención a informes anteriores (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003; Burns KE, Baumgart S, Dorrestein PC, Zhai H, McLafferty FW, y Begley TP, J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005; Westrop GD, Goodall G, Mottram JC y Coombs GH, J. Biol. Chem., 281: 25062-25075, 2006). La cantidad de sustrato usada se representa mediante una unidad de ml. La Tabla 2 siguiente resume las condiciones del ensayo para la actividad enzimática.

[Tabla 2]

Solución madre	Concentración final	Blanco	OPS sulfhidrasa
enzima-his 6x		-	40 (50mg)
HEPES 1M (pH7, 4)	Hepes 100 mM	100	100
Na ₂ S 0,5 M	Na ₂ S 10mM	20	20
PLP 10 mM	PLP 0,2 mM	20	20
OPS 100mM	OPS 5mM	0	50
AD		790	750
Total		1000	1000

- 15 Las soluciones de reacción, exceptuando las enzimas, se incubaron a 37 °C durante 5 min, después de lo cual se añadieron 50 mg de OPSS purificada a la solución de reacción. A tiempos predeterminados durante la incubación a 37 °C, se tomaron 100 ml de las reacciones enzimáticas y se mezclaron con 100 ml de TCA al 33,2 % para parar la reacción enzimática. Las concentraciones de cisteína de las reacciones enzimáticas se analizaron cuantitativamente midiendo la absorbancia a DO₅₆₀ de acuerdo con el procedimiento de Gaitonde. Las actividades de síntesis de cisteína de las cuatro enzimas OPS sulfhidrilasas distintas se resumen en la Tabla 3, a continuación. Los títulos de la síntesis de cisteína de las enzimas OPSS se expresan como tasas de conversión de cisteína con el tiempo de reacción.

[Tabla 3]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
Ape-OPSS	63,4	89,7	97,4
Mtb-OPSS	1,7	4,8	10,1
Msm-OPSS	12,8	25	43,7
Nfa-OPSS	0,1	0,1	0,2

- 25 Como puede observarse en la Tabla 3, se confirmó que las enzimas OPSS derivadas de *Aeropyrum pernix* y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tenían la actividad de usar OPS como un sustrato para sintetizar cisteína. La actividad de síntesis de cisteína de las nuevas OPSS derivadas de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatis*, se obtuvieron explorando la homología de los aminoácidos con los de la enzima Mtb-OPSS, descubierta anteriormente. Por otra parte, las nuevas OPSS derivadas de *Nocardia farcinica* IFM 10152, obtenidas por la exploración de la homología, mostraron una actividad de conversión insuficiente de O-fosfoserina en cisteína.

Como se observa en los datos de la Tabla 3, la tasa de conversión de OPS en cisteína de Ape-OPSS alcanzó aproximadamente el 100 % en una hora.

- 30 La tasa de conversión final de la enzima Msm-OPSS, que se seleccionó de nuevo a través de la exploración de las enzimas basándose en la OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de la que se informó anteriormente, fue del 43,7 % que es 4,3 veces más alta que la de Mtb-OPSS.

Ejemplo 3: Preparación de los mutantes Mtb-T y Msm-T, con delección en los 5 restos de aminoácidos del extremo C-terminal de Mtb-OPSS y Msm-OPSS

- 35 La OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb-OPSS), que cataliza la conversión de OPS a cisteína con la ayuda de las enzimas adicionales mec+ y cysO, es capaz de usar una fuente de azufre que contiene S²⁻ en la conversión de OPS a cisteína incluso en ausencia de las enzimas adicionales cuando se eliminan los cinco restos de aminoácidos del extremo C-terminal de la misma. Basándose en este hecho, se obtuvo Mtb-T (SEC ID N°: 24), que convierte rápidamente la OPS en presencia de S²⁻ como una fuente de azufre. De Msm-OPSS que comparte una

alta homología en los aminoácidos con Mtb-OPSS, también se obtuvo Msm-T eliminando 5 restos de aminoácidos del extremo C-terminal. Se construyeron vectores de expresión que portan las dos enzimas mutantes. En este sentido, la PCR con pfu se realizó en el ADN genómico de las cepas H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* y MC2 155 de *Mycobacterium smegmatis* en presencia de los pares de cebadores de las SEC ID N°: 17 y 18 y las SEC ID N°: 19 y 20. Los fragmentos génicos de OPSS obtenidos de este modo se trataron con NdeI y HindIII y se clonaron en el vector pET28a digerido con las mismas enzimas de restricción para construir vectores recombinantes de expresión denominados pET28a-Mtb-T y pET28a-Msm-T, respectivamente. Los vectores de expresión los recombinante se introdujeron en *E.coli* (DE3). La expresión de los dos mutantes de OPSS obtenidos en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1 se confirmaron por SDS PAGE al 14 %. Como resultado, se obtuvieron Mtb-T (SEC ID N°: 5) y Msm-T (SEC ID N°: 2).

Ejemplo 4: Ensayo de Mtb-T y Msm-T para la actividad de síntesis de cisteína

Las Mtb-T y Msm-T, obtenidas anteriormente, se evaluaron con respecto a su actividad enzimática midiendo las tasas de conversión de cisteína finales. La actividad enzimática se ensayó del mismo modo que en el Ejemplo 2. La cisteína convertida se analizó cuantitativamente usando el procedimiento de Gaitonde y los resultados se resumen en la siguiente Tabla 4.

[Tabla 4]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
Mtb-T	9,5	18,6	37,1
Msm-T	20,3	54,6	100

Como se observa en la Tabla 4, el mutante de Msm-T permitió la conversión de cisteína a partir del sustrato a una tasa del 100 % en una hora.

Ejemplo 5: Ensayo para la actividad de síntesis de cisteína de los mutantes derivados de Msm-T-AH2 y Msm-T-EP3

Basándose en que Msm-T, que puede convertir OPS en cisteína a una tasa del 100 %, se obtuvieron dos mutantes enzimáticos con actividad mejorada usando un procedimiento enzimático evolutivo, y se denominaron Msm-T-HA2 (SEC ID N°: 25) y Msm-T-HA3 (SEC ID N°: 26). La mutagénesis aleatoria que usa un tratamiento con hidroxilamina y un kit de PCR propensa a error (kit de PCR de mutagénesis aleatoria Diversity de Clontech) se introdujeron en Msm-T para construir una biblioteca de mutantes de Msm-T que después se exploraron para seleccionar mutantes de OPSS con actividad enzimática mejorada.

Se descubrió que los mutantes de OPSS, Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3, obtenidos mediante una exploración EAR en un gen Msm-T, tenían la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente, como se analizó por secuenciación de bases.

Los mutantes Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3 y el Msm-T control se ensayaron con respecto a su actividad enzimática, y los resultados se resumen en las Tablas 5 y 6. El ensayo de actividad enzimática se realizó del mismo modo que en el Ejemplo 2.

[Tabla 5]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
Msm-T	20,3	54,6	100
Msm-T-HA2	101,6	101,2	97,5
Msm-T-EP3	24	65,7	100,7

[Tabla 6]

	Msm-T	Msm-T-HA2	Msm-T-EP3
Actividad específica (Cisteína (μmol / min / mg))	14,96	44,82	16,72

5 Como puede observarse en las Tablas 5 y 6, los mutantes de OPSS, Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3, obtenidos por un procedimiento enzimático evolutivo, se midieron para que mostraran tasas de conversión aumentadas 5 veces y 1,2 veces, respectivamente, 10 min después del inicio de la reacción, en comparación con la Msm-T control. También, se compararon en cuanto a la actividad específica (concentración de producto/tiempo/cantidad de enzima), que se usa generalmente en la determinación de la actividad enzimática. La actividad enzimática específica de Msm-HA2 aumentó 3 veces en comparación con la de la Msm-T control, indicando que el mutante de OPSS mejoró en la actividad enzimática, con la capacidad de sintetizar cisteína en cantidades más elevadas por tiempo por unidad de enzima.

Ejemplo 6: Requerimiento de cofactor para la actividad de OPSS

10 Para examinar el efecto de cofactores en la conversión de cisteína de OPSS, la tasa de conversión de cisteína de Msm-T se midió en ausencia o presencia de PLP y DTT. En este sentido, los sustratos de caldo de OPSS 50 mM y Na₂S 100 mM reaccionaron a 37 °C durante 30 min en presencia de DTT 25 mM o PLP 0,2 mM. La cisteína producida de este modo se analizó cuantitativamente usando el procedimiento de Gaitonde. Los resultados se resumen en la Tabla 7, a continuación.

[Tabla 7]

Msm-T	Tasa de conversión de cisteína (%)
(-) PLP, (-) DTT	23,62
(+) PLP, (-) DTT	33,21
(-) PLP, (+) DTT	40,08
(+) PLP, (+) DTT	54,65

15 Como se observa en la Tabla 7, la tasa de conversión de cisteína en presencia tanto de PLP como de DTT fue 2,3 veces mayor que en ausencia tanto de PLP como de DTT. Por lo tanto, se observó que tanto PLP como DTT tenían una influencia positiva en la conversión.

Ejemplo 7: Actividad de OPSS por Temperatura

20 Se examinaron las tasas de conversión de cisteína de Ape-OPSS y Msm-T de acuerdo con las temperaturas. La actividad enzimática a 37 °C y a 60 °C se midió a los 2, 5, 10, 30, y 60 min después de la reacción. La reacción se realizó en las condiciones de HEPES 100 mM (pH 7,4), OPS 5 mM, Na₂S 10 mM, PLP 0,2 mM y CysM a 50 µg/ml. La cantidad de cisteína producida se determinó usando el procedimiento de Gaitonde. Los resultados se muestran en la FIG. 1.

25 En las condiciones de un tampón, como se muestra en la FIG. 1, Ape-OPSS mostró una tasa de reacción inicial más rápida a 37 °C así como reactividad más elevada a 60 °C que la que tuvo Msm-T.

Ejemplo 8: Estabilidad térmica de OPSS

30 Se analizó la estabilidad térmica de Ape-OPSS y Msm-T. Cada una de las enzimas se diluyó a una concentración de 2 mg/ml en un caldo de OPS y se trataron térmicamente a 37 °C y 60 °C durante 10, 30, 60, 120, y 240 min, seguido de la reacción a 37 °C durante 30 min en las condiciones de OPS 5 mM, Na₂S 10 mM, PLP 0,2 mM, y HEPES 100 mM (pH 7,4). Para esta reacción, se emplearon 10 µg/ml de Ape-OPSS y 50 µg/ml de Msm-T. Las cantidades de la cisteína producidas se midieron usando el procedimiento de Gaitonde y se resumen en la Tabla 8, a continuación.

[Tabla 8]

Tiempo de calentamiento (min)	Actividad relativa (%)					
	(-)	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Ape-OPSS	100	102	107	100	107	101
Msm-T	100	82	50	32	19	8

35 A pesar del tratamiento térmico a 60 °C durante 4 horas, como observa en la Tabla 8, se observó que Ape-OPSS retenía su actividad intacta mientras que la actividad de Msm-T se mantuvo a 37 °C, pero disminuyó el 50 % después del tratamiento a 60 °C durante 30 min.

40 Se hizo un examen de la retención de la actividad enzimática a 37 °C cuando se usó Msm-T en una cantidad de 50 µg/ml, que es una concentración práctica en caldo de OPS. En ausencia de Na₂S, se trataron 50 µg/ml de Msm-T, junto con caldo de OPS 50 mM y PLP 0,2 mM, a 37 °C durante 0,5, 1, 2, 4, y 6 horas, después de lo cual se añadió Na₂S para inducir la reacción enzimática. Después de reaccionar durante 30 minutos, se midió la actividad de Msm-T. Las cantidades de cisteína producidas se determinaron usando el procedimiento de Gaitonde y se ofrecen

en la Tabla 9, a continuación.

[Tabla 9]

Tiempo	(-)	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
Tasa de conversión de cisteína (%)	100	88	73	47	11	3

Como puede observarse en la Tabla 9, la actividad de Msm-T se redujo por debajo del 50 % 2 horas después de la reacción a 37 °C en caldo de OPS.

5 Ejemplo 9: sensibilidad al pH de OPSS

Se midieron las tasas de conversión de cisteína de Ape-OPSS y Msm-T de acuerdo con el pH. En 100 mM de tampón, Ape-OPSS y Msm-T, que tenían cada una concentración de aproximadamente de 50 µg/ml, se sometieron a una reacción a 37 °C durante 10 min. En este aspecto, se usaron un tampón K-fosfato con un pH de 6,4 / 7,0 / 7,4 / 8,0, un tampón Tris-HCl con un pH de 7,0 / 7,4 / 8,0 / 8,5 / 8,8 y un tampón Na-carbonato con un pH de 8,0 / 8,5 / 9,0 / 10,0. El análisis cuantitativo de la cisteína producida se realizó usando el procedimiento de Gaitonde. Los resultados se resumen en la FIG. 2.

Como se observa en la FIG. 2, Msm-T mostró la actividad más elevada a un pH de desde 8,0 hasta 9,0 independientemente del tampón. Así como para Ape-OPSS, su actividad más elevada se detectó en K-fosfato (pH 7,4), con un pH óptimo que difería de un tampón a otro.

15 Ejemplo 10: Efecto de los iones sobre la actividad de OPSS

Los efectos de los iones sobre la actividad de las enzimas OPSS se examinaron de la siguiente manera. En una mezcla de reacción que contenía OPS 5 mM, Na₂S 10 mM, PLP 0,2 mM, y HEPES 100 mM (pH 7,4), las enzimas se sometieron a una reacción a 37 °C durante 30 min en presencia de (NH₄)₂SO₄ [1, 3, 5, 10, 20 g/l], KH₂PO₄ [0,5, 1, 2, 4, 8 g/l], o NH₄Cl [0,2, 0,5, 1,2 g/l]. Ape-OPSS y Msm-T se usaron a una concentración de 10 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente. Las cantidades de la cisteína producida se determinaron usando el procedimiento de Gaitonde y se resumen en la Tabla 10, a continuación.

[Tabla 10]

	Actividad relativa (%)	
NH ₄ Cl	Ape-OPSS	Msm-T
0	100,00	100,00
0,2	86,26	91,49
0,5	73,35	91,30
1	49,11	67,11
2	27,72	47,12

No se detectaron cambios en la tasa de conversión de cisteína cuando se añadió (NH₄)₂SO₄ o KH₂PO₄ a la mezcla de reacción. Por otra parte, como puede observarse en la Tabla 10, la tasa de conversión de cisteína disminuyó con un aumento de la concentración de NH₄Cl. En particular, la actividad enzimática máxima disminuyó más del 70 % cuando se añadieron 2 g/l de NH₄. Por lo tanto, se observó que NH₄Cl y NH₄ tenían un efecto negativo en la actividad de conversión de OPSS.

Ejemplo 11: Efecto de la fuente de azufre sobre la actividad de síntesis de OPSS

Se realizó un experimento para examinar el efecto de las fuentes de azufre en la actividad de síntesis de cisteína de cada enzima. En una mezcla de reacción que contenía OPS 5 mM, PLP 0,2 mM, y HEPES 100 mM, cada enzima (50 µg/ml de Ape-OPSS, 50 µg/ml de Msm-T) se sometió a una reacción a 37 °C durante 1 hora en presencia de Na₂S, NaSH, o Na₂S₂O₃ 10 mM. Las cantidades de la cisteína producidas se midieron usando el procedimiento de Gaitonde. Se observó que Ape-OPSS prefería Na₂S₂O₃ como una fuente de azufre, mientras que Msm-T prefiere Na₂S. Los resultados se resumen en la Tabla 11, a continuación.

[Tabla 11]

	Actividad relativa (%)		
Enzima	Na ₂ S	NaSH	Na ₂ S ₂ O ₃
Ape-OPSS	100,0	95,2	142,3
Msm-T	106,7	98,3	66,2

35

Ejemplo 12: Construcción del vector de expresión que porta OPSS (sistema pCL-Pcj1) y expresión de la enzima

La PCR se realizó usando los cebadores de las SEC ID N°: 21 y 22, con el vector pET28a-Msm-T sirviendo como un molde. El producto de la PCR obtenido de este modo se trató con EcoRV y HindIII, y se clonó para construir un vector recombinante denominado pCL-P(CJ1)-Msm-T (pCJI-MsmTCysM, FIG. 7). Para examinar una diferencia en el nivel de expresión de Msm-tc entre el sistema pET y el sistema pCL-Pcj1, se prepararon cepas para expresar la enzima. El sistema pET se introdujo en Rosetta (DE3) mientras que el sistema pCL-Pcj1 empleó la cepa K12G. Las colonias individuales tomadas de las placas de LB se inocularon en 5 ml de caldo LB y se cultivaron a 37 °C durante 16 horas mientras que se agitaban a 200 rpm. Estos cultivos se transfirieron a 25 l de caldo LB reciente que contenía kanamicina o espectinomicina y glucosa al 0,2 % (en matraces de 250 ml) y se incubaron a una DO600 de 0,5 - 0,6, inmediatamente después de lo cual, se añadió IPTG 1 mM al medio para inducir la expresión de las enzimas. Durante la incubación a 37 °C, mientras que se agitaban a 200 rpm, los niveles de expresión de la enzima se midieron a diversos tiempos de cultivo (8, 16, 24 horas). Los niveles de expresión de las enzimas de los dos sistemas se analizaron en SDS PAGE al 14 % y se muestran en la FIG. 3.

En las mismas condiciones, como puede observarse en la FIG. 3, el sistema pCL-Pcj1 aseguró un nivel de expresión más elevado de la enzima de lo que lo hizo el sistema pET. Además, hay una mejora en las condiciones del cultivo que se debió a que una temperatura tan alta como 37 °C y una concentración de IPTG tan baja como 0,1 mM permitieron que el sistema expresara la enzima. Por lo tanto, el sistema pCL-Pcj1 pudo funcionar suficientemente en sustitución del pET.

Ejemplo 13: Síntesis de cisteína de OPSS con el uso de caldo de fermentación de OPS purificado como sustrato

Se determinaron las tasas de conversión de la OPS purificada para la cisteína de Msm-T y Ape-OSS. En presencia de 75 µg/ml de cada una de las enzimas y PLP 0,2 mM, la OPS 60 mM purificada del caldo de fermentación de OPS reaccionó con Na₂S 120 mM a 37 °C o 70 °C durante 30, 60, 90, y 120 min. La reacción solamente se realizó a 37 °C para Msm-T, pero tanto a 37 °C como a 70 °C para Ape-OPSS. Las cantidades de la cisteína producida se midieron usando el procedimiento de Gaitonde. Los resultados se muestran en la FIG. 4.

Como se observa en la FIG. 4, un caldo de fermentación de OPS purificado sirvió bien como un sustrato para la conversión enzimática en cisteína. En particular, la tasa de conversión de cisteína de Ape-OPSS aumentó a 70 °C incluso después del uso del caldo de fermentación de OPS purificado.

Ejemplo 14: Síntesis de cisteína de OPSS con el uso de caldo de fermentación de OPS como sustrato

Cuando se usó un caldo de fermentación de OPS como un sustrato, las tasas de conversión de cisteína de Msm-T y Ape-OPSS se midieron de acuerdo con las concentraciones de las enzimas. En presencia de 5 µg/ml o 50 µg/ml de cada una de las Msm-T y Ape-OPSS y PLP 0,2 mM, el caldo de fermentación de OPS 50 mM reaccionó con Na₂S 100 mM a 37 °C. Las cantidades de cisteína producida se midieron usando el procedimiento de Gaitonde. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

Como se observa en la FIG. 5, la tasa de conversión más elevada se detectó en Msm-T a 50 µg/ml. Además, después del uso del caldo de fermentación de OPS como un sustrato, la actividad de Msm-T fue más elevada que la de Ape-OPSS.

Ejemplo 15: Tasa de conversión de cisteína mediante concentraciones de OPSS

A un caldo de OPS que contenía OPS a una concentración de 9,76 g/l, se le añadió Na₂S en una cantidad dos veces mayor que el número de moles de OPS, seguido por incubación a 30 °C durante 5 min. Posteriormente, se añadió Msm-T purificada en una cantidad de 50 mg mientras que la Msm-T-HA2 purificada se usó en una cantidad de 5 µg, 10 µg, 20 µg, y 50 µg. A tiempos predeterminados durante la incubación a 37 °C, se tomaron 100 ml de la mezcla de reacción enzimática y se mezclaron con 100 ml de TCA al 33,2 % para detener la reacción enzimática. Las concentraciones de cisteína de las reacciones enzimáticas se analizaron cuantitativamente midiendo la absorbancia a DO₅₆₀ de acuerdo con el procedimiento de Gaitonde. Las actividades de síntesis de las enzimas OPSS de acuerdo con las concentraciones de las enzimas se resumen en la Tabla 12, a continuación.

[Tabla 12]

Tasa de conversión de cisteína (%)					
Tiempo	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
Msm-T 50 µg	0,00	20,69	48,45	62,68	59,82
Msm-T-HA2 5 µg	0,00	0,00	4,77	10,66	27,23
Msm-T-HA2 10 µg	0,00	10,46	24,78	37,43	57,32
Msm-T-HA2 20 µg	0,00	14,90	31,31	48,09	59,94
Msm-T-HA2 50 µg	2,33	44,02	56,72	62,17	63,52

Como puede observarse en la Tabla 12, incluso cuando el mutante Msm-T-HA2 cuya actividad de síntesis de cisteína ha mejorado y que se usó en una cantidad que corresponde al 40 % de la de Msm-T, la tasa de conversión de cisteína final (%) fue similar. Además, cuando se usaba en la misma cantidad, el mutante Msm-T-HA2 mostró una actividad de reacción inicial más rápida en comparación con Msm-T.

5 Ejemplo 16: Tasa de conversión de cisteína mediante concentraciones de OPSS

Para examinar el efecto de la concentración de OPS en la tasa de conversión de Msm-T y Msm-T-HA2, se añadieron cantidades predeterminadas de OPS purificada al caldo de fermentación de OPS para inducir la reacción de conversión. La enzima se usó en una cantidad de 50 µg para Msm-T y 20 µg para Msm-T-HA2. Las cantidades de cisteína de la solución de reacción se midieron usando el procedimiento de Gaitonde. Los resultados se resumen en las Tablas 13 a 15.

[Tabla 13]

Tasa de conversión de cisteína (OPS medida 10,65 g/l)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Msm-T 50 ug	0	23,03	65,38	65,70	61,95	55,35
Msm-T-HA2 20 ug	0	13,70	43,82	61,32	63,77	53,74

[Tabla 14]

Tasa de conversión de cisteína (OPS medida 36,09 g/l)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Msm-T 50 ug	0	1,15	10,23	28,07	97,84	100,34
Msm-T-HA2 20 ug	0	2,33	12,04	27,57	77,65	80,01

[Tabla 15]

Tasa de conversión de cisteína (OPS medida 55,6 g/l)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Msm-T 50 ug	0	0	2,36	7,41	42,69	66,67
Msm-T-HA2 20 ug	0	0,32	4,76	12,15	50,16	62,46

15 Cuando la concentración de OPS fue de aproximadamente 30 g/l, como observa en las Tablas 13 a 15, las tasas de conversión más elevadas que se detectaron fueron del 100 % para la Msm-T y el 80 % para la Msm-T-HA2. Cuando la concentración de OPS superó los 50 g/l, se descubrió que tanto la tasa de conversión como el porcentaje de conversión disminuyeron.

20 Los datos de las Tablas 13 a 15 se usaron para seleccionar una relación de concentración óptima entre OPS y Msm-T-HA2 para un proceso de conversión que usaba una concentración elevada de OPS, y para reducir el tiempo de reacción de Msm-T-HA2 en comparación con el de Msm-T.

Ejemplo 17: Tasa de conversión de cisteína mediante concentraciones de Na₂S

25 Para examinar el efecto de la cantidad de Na₂S usada como una fuente de azufre en la tasa de conversión de cisteína, se realizaron reacciones de conversión de OPS en presencia de 20 µg de Msm-T-HA2 cuando se usó Na₂S a una concentración de 160 mM, 320 mM, y 480 mM, que correspondía a las cantidades equivalentes y dos y tres veces mayores que el número de moles de OPS, respectivamente. Las tasas de conversión de cisteína resultantes se resumen en la Tabla 16, a continuación.

[Tabla 16]

Tasa de conversión de cisteína (OPS medida 29,76 g/l)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
Na ₂ S 160 mM	0	0	0	0	0	0
Na ₂ S 320 mM	0	13,43	34,58	78,78	67,76	74,95
Na ₂ S 480 mM	0	14,90	25,99	54,42	51,24	58,25

30 Como puede observarse en la Tabla 16, la tasa de conversión de cisteína alcanzó su máximo cuando el número de moles de Na₂S fue dos veces mayor que el de la OPS usada. A partir de los resultados, se entiende que se establecen unas condiciones óptimas cuando la relación molar del Na₂S respecto a OPS es 2.

Ejemplo 18: Tasa de conversión de cisteína mediante el pH

Para examinar el efecto del pH en la conversión enzimática de OPS en cisteína, se realizó una reacción de conversión en presencia de 20 µg de Msm-T-HA2 a diversos valores de pH. Los resultados se resumen en la Tabla 17, a continuación.

[Tabla 17]

Tasa de conversión de cisteína (%)					
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min
pH 8,5 (OPS 35,02 g/l)	0,24	4,74	20,74	40,19	69,13
pH 9 (OPS 34,59 g/l)	0,19	6,00	24,03	43,86	63,88
pH 9,5 (OPS 35,34 g/l)	0,26	9,85	28,48	44,82	64,68
pH 10 (OPS 34,59 g/l)	0,25	10,97	28,54	40,19	58,14

5

Como puede observarse, un pH óptimo para la reacción de conversión se midió que era entre 8,5 y 9,5.

Ejemplo 19: Proceso de conversión a una escala de un frasco de 1 l

El proceso de reacción para convertir caldo de OPS en cisteína se amplió hasta un frasco de 1 l. Basándose en las características de OPSS y en los datos de la reacción de conversión establecidos en las condiciones del tubo de 1 ml, se estableció un proceso de reacción de conversión para Msm-T-HA2.

10

Previo a una reacción de conversión a una escala de un frasco de 1 l, el caldo de fermentación de OPS obtenido en un frasco de 1 l se centrifugó (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante se pasó a través de una membrana (0,45 µm) para eliminar las células. Se añadieron 72 g de Na₂S al caldo de OPS filtrado (19,317 g/l), seguido de la filtración del precipitado a través de un papel de filtro Whatman (6 µm). Después de la adición de PLP 10 mM, la mezcla de reacción se preincubó a 37 °C durante 5 min, mientras que se agitaba a 200 rpm. Finalmente, se realizó una reacción de conversión en presencia de 50 mg de Msm-T-HA2 a una escala de un frasco de 1 l. A los 0, 10, 30, 60, 120, y 180 min durante la incubación a 37 °C, se tomaron 100 µL de las reacciones enzimáticas y se mezclaron con 100 µl de TCA al 33,2 % para detener la reacción enzimática. Las muestras tomadas se diluyeron en HCl 0,1 N y se analizó el contenido en cisteína y cistina usando CL. También se usó el procedimiento de Gaitonde para determinar la cantidad de cisteína. Las concentraciones de los sustratos y la enzima que se usan en el procedimiento de la reacción de conversión se resumen en la Tabla 18, a continuación. La cantidad de los sustratos usada se representa mediante una unidad de ml.

15

20

[Tabla 18]

Caldo de fermentación de OPS	pH 9,01 después de la adición de Na ₂ S, pH 9,16 después de la filtración	
	Final	volumen
Concentración final de OPS	101,47 mM.	
Msm-T-HA2 (2,59 µg/µl)	50 µg	19
Na ₂ S (72 g)	300 mM.	0
PLP 10 mM	0,1 mM.	10
caldo de OPS (19,317 g/l)	104,42 mM.	1000
A.D.		0
Total		1029

25

Las concentraciones de cisteína en la mezcla de reacción obtenida después de la reacción de conversión realizada en las condiciones de la Tabla 18 se analizaron cuantitativamente por el procedimiento de Gaitonde y CL, y los resultados se muestran en la FIG. 6. Cuando se incubaron 19,317 g/l de caldo de OPS durante dos horas en presencia de 50 mg de Msm-T-HA2, como se observa en la FIG. 6, la cantidad de cisteína o cistina producida alcanzó un máximo a los 9,075 g/l, indicando que la cisteína y la cistina pueden producirse a partir de OPS a una tasa del 71,83 % por un proceso de conversión enzimática a una escala de un frasco de 1 l.

[Tabla 19]

Tasa de conversión de cisteína (%)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
caldo de OPS	10,81	28,08	51,26	67,21	71,83	69,45

30

[Tabla 20]

Cisteína/cistina (g/l)						
Tiempo	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
caldo de OPS	1,366	3,548	6,476	8,492	9,075	8,775

Aplicabilidad industrial

- 5 Como se ha descrito en lo que antecede, los mutantes de OPSS de la presente invención pueden ser útiles para la producción masiva de L-cisteína, la cual y cuyos derivados pueden encontrar aplicaciones en una variedad de campos, incluyendo la industria farmacéutica (para el tratamiento de enfermedades bronquiales), la industria cosmética (en champú para el cabello, composiciones para ondulados permanentes, etc.), y la industria alimentaria (antioxidantes, potenciadores del sabor, adyuvantes de la masa, etc.).
- 10 <110> CJ CheilJedang Corporation
- <120> MUTANTES DE O-FOSFOSERINA SULFHIDRILASA Y PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE CISTEÍNA USANDO LOS MISMOS
- 15 <130> T3049 EP S3
- <150> KR10-2010-0102665
- <151> 20-10-2010
- 20 <160> 26
- <170> KopatentIn 1.71
- 25 <210> 1
- <211> 323
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Msm-OPSS de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*
- <400> 1

ES 2 533 561 T3

Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
 1 5 10 15

Val Gly Leu Gln Asn Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Glu Asp Gly Lys
 20 25 30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
 35 40 45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Leu Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Arg
 50 55 60

Asp Gly Leu Leu Gln Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
 65 70 75 80

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Leu Leu Lys Gly Tyr Asn
 85 90 95

Met Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Ile Glu Arg Arg Gln Ile
 100 105 110

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly
 115 120 125

Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro
 130 135 140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala
 145 150 155 160

His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
 165 170 175

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
 180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala
 195 200 205

Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Ile Asp Glu
 210 215 220

Gly Phe Ile Pro Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Val Leu Thr Thr Arg Phe
 225 230 235 240

Ser Val Gly Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val Thr
 245 250 255

Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
 260 265 270

Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp
 275 280 285

Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
 290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu Gly Gln
 305 310 315 320

Leu Trp Ala

<210> 2
 <211> 318

ES 2 533 561 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Msm-T de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

<400> 2

```

Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
 1                    5                      10                15

Val Gly Leu Gln Asn Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Glu Asp Gly Lys
                20                      25                30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
          35                      40                45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Leu Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Arg
 50                    55                      60

Asp Gly Leu Leu Gln Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
 65                    70                      75                80

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Leu Leu Lys Gly Tyr Asn
          85                      90                95

Met Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Ile Glu Arg Arg Gln Ile
          100                    105                110

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly
          115                    120                125

Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro
 130                    135                140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala
 145                    150                155                160

His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
          165                    170                175

```

ES 2 533 561 T3

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
 180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala
 195 200 205

Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Ile Asp Glu
 210 215 220

Gly Phe Ile Pro Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Val Leu Thr Thr Arg Phe
 225 230 235 240

Ser Val Gly Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val Thr
 245 250 255

Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
 260 265 270

Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp
 275 280 285

Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
 290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu
 305 310 315

- <210> 3
- <211> 318
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Msm-T-HA2 de *Mycobacterium smegmatics* CC1
- <400> 3

ES 2 533 561 T3

Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
 1 5 10 15
 Val Gly Leu Gln Asn Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Glu Asp Gly Lys
 20 25 30
 Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
 35 40 45
 Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Leu Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Arg
 50 55 60
 Asp Gly Leu Leu Gln Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Ser Thr Ser Gly
 65 70 75 80
 Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Leu Leu Lys Gly Tyr Asn
 85 90 95
 Met Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Ile Glu Arg Arg Gln Ile
 100 105 110
 Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly
 115 120 125
 Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro
 130 135 140
 Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala
 145 150 155 160
 His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
 165 170 175
 Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
 180 185 190
 Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala
 195 200 205
 Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Ile Asp Glu
 210 215 220
 Gly Phe Ile Pro Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Val Leu Thr Thr Arg Phe
 225 230 235 240
 Ser Val Gly Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val Thr
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
 260 265 270
 Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp
 275 280 285
 Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
 290 295 300
 Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu
 305 310 315

<210> 4
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 533 561 T3

<220>

<223> Msm-T-EP3 de *Mycobacterium smegmatics* CC2

<400> 4

5

```

Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
 1           5           10           15

Val Gly Leu Gln Asn Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Glu Asp Gly Lys
          20           25           30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
          35           40           45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Leu Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Arg
 50           55           60

Asp Gly Leu Leu Gln Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
 65           70           75

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Leu Leu Lys Gly Tyr Asn
          85           90           95

Met Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Ile Glu Arg Arg Gln Ile
          100           105           110
    
```

ES 2 533 561 T3

Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Arg Ile Ile Phe Ser Pro Ala Glu Gly Gly
 115 120 125

Ser Asn Ala Ala Val Ala Thr Ala Asp Glu Leu Ala Ala Gln Asn Pro
 130 135 140

Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Ser Asp Ala
 145 150 155 160

His Tyr Phe Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
 165 170 175

Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
 180 185 190

Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Pro Gly Val Gln Ile Val Ala Ala
 195 200 205

Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Ile Asp Glu
 210 215 220

Gly Phe Ile Pro Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Val Leu Thr Ser Arg Phe
 225 230 235 240

Ser Val Gly Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val Thr
 245 250 255

Arg Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
 260 265 270

Ala Leu Gly Met Ala Ala Lys Ala Val Lys Ala Gly Glu Arg Ala Asp
 275 280 285

Ile Ala Phe Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
 290 295 300

Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Asp Ala Leu Glu
 305 310 315

<210> 5
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Mtb-T de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

10

<400> 5

Met Thr Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Ala Leu Gly Asn Thr Pro Leu
 1 5 10 15

Val Gly Leu Gln Arg Leu Ser Pro Arg Trp Asp Asp Gly Arg Asp Gly
 20 25 30

Pro His Val Arg Leu Trp Ala Lys Leu Glu Asp Arg Asn Pro Thr Gly
 35 40 45

Ser Ile Lys Asp Arg Pro Ala Val Arg Met Ile Glu Gln Ala Glu Ala
 50 55 60

Asp Gly Leu Leu Arg Pro Gly Ala Thr Ile Leu Glu Pro Thr Ser Gly
 65 70 75 80

ES 2 533 561 T3

Asn Thr Gly Ile Ser Leu Ala Met Ala Ala Arg Leu Lys Gly Tyr Arg
 85 90 95
 Leu Ile Cys Val Met Pro Glu Asn Thr Ser Val Glu Arg Arg Gln Leu
 100 105 110
 Leu Glu Leu Tyr Gly Ala Gln Ile Ile Phe Ser Ala Ala Glu Gly Gly
 115 120 125
 Ser Asn Thr Ala Val Ala Thr Ala Lys Glu Leu Ala Ala Thr Asn Pro
 130 135 140
 Ser Trp Val Met Leu Tyr Gln Tyr Gly Asn Pro Ala Asn Thr Asp Ser
 145 150 155 160
 His Tyr Cys Gly Thr Gly Pro Glu Leu Leu Ala Asp Leu Pro Glu Ile
 165 170 175
 Thr His Phe Val Ala Gly Leu Gly Thr Thr Gly Thr Leu Met Gly Thr
 180 185 190
 Gly Arg Phe Leu Arg Glu His Val Ala Asn Val Lys Ile Val Ala Ala
 195 200 205
 Glu Pro Arg Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Ala Leu Arg Asn Met Asp Glu
 210 215 220
 Gly Phe Val Pro Glu Leu Tyr Asp Pro Glu Ile Leu Thr Ala Arg Tyr
 225 230 235 240
 Ser Val Gly Ala Val Asp Ala Val Arg Arg Thr Arg Glu Leu Val His
 245 250 255
 Thr Glu Gly Ile Phe Ala Gly Ile Ser Thr Gly Ala Val Leu His Ala
 260 265 270
 Ala Leu Gly Val Gly Ala Gly Ala Leu Ala Ala Gly Glu Arg Ala Asp
 275 280 285
 Ile Ala Leu Val Val Ala Asp Ala Gly Trp Lys Tyr Leu Ser Thr Gly
 290 295 300
 Ala Tyr Ala Gly Ser Leu Asp Asp Ala Glu Thr Ala Leu Glu
 305 310 315

<210> 6
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Ape-OPSS de *Aeropyrum pernix* (ADN sintético)

<400> 6

5

10

ES 2 533 561 T3

Met Ala Leu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Leu Asp Val Leu Asp Ser Val
1 5 10 15
Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Glu Asn Ala Arg Glu Val Leu Arg Ser Gly
20 25 30
Glu Ala Arg Cys Leu Gly Asn Pro Arg Ser Glu Pro Glu Tyr Val Lys
35 40 45

ES 2 533 561 T3

Ala Leu Tyr Val Ile Gly Ala Ser Arg Ile Pro Val Gly Asp Gly Cys
50 55 60

Ser His Thr Leu Glu Glu Leu Gly Val Phe Asp Ile Ser Val Pro Gly
65 70 75 80

Glu Met Val Phe Pro Ser Pro Leu Asp Phe Phe Glu Arg Gly Lys Pro
85 90 95

Thr Pro Leu Val Arg Ser Arg Leu Gln Leu Pro Asn Gly Val Arg Val
100 105 110

Trp Leu Lys Leu Glu Trp Tyr Asn Pro Phe Ser Leu Ser Val Lys Asp
115 120 125

Arg Pro Ala Val Glu Ile Ile Ser Arg Leu Ser Arg Arg Val Glu Lys
130 135 140

Gly Ser Leu Val Ala Asp Ala Thr Ser Ser Asn Phe Gly Val Ala Leu
145 150 155 160

Ser Ala Val Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Arg Ala Arg Val Tyr Leu Pro
165 170 175

Gly Ala Ala Glu Glu Phe Gly Lys Leu Leu Pro Arg Leu Leu Gly Ala
180 185 190

Gln Val Ile Val Asp Pro Glu Ala Pro Ser Thr Val His Leu Leu Pro
195 200 205

Arg Val Met Lys Asp Ser Lys Asn Glu Gly Phe Val His Val Asn Gln
210 215 220

Phe Tyr Asn Asp Ala Asn Phe Glu Ala His Met Arg Gly Thr Ala Arg
225 230 235 240

Glu Ile Phe Val Gln Ser Arg Arg Gly Gly Leu Ala Leu Arg Gly Val
245 250 255

Ala Gly Ser Leu Gly Thr Ser Gly His Met Ser Ala Ala Ala Phe Tyr
260 265 270

Leu Gln Ser Val Asp Pro Ser Ile Arg Ala Val Leu Val Gln Pro Ala
275 280 285

Gln Gly Asp Ser Ile Pro Gly Ile Arg Arg Val Glu Thr Gly Met Leu
290 295 300

Trp Ile Asn Met Leu Asp Ile Ser Tyr Thr Leu Ala Glu Val Thr Leu
305 310 315 320

Glu Glu Ala Met Glu Ala Val Val Glu Val Ala Arg Ser Asp Gly Leu
325 330 335

Val Ile Gly Pro Ser Gly Gly Ala Ala Val Lys Ala Leu Ala Lys Lys
340 345 350

Ala Ala Glu Gly Asp Leu Glu Pro Gly Asp Tyr Val Val Val Val Pro
355 360 365

Asp Thr Gly Phe Lys Tyr Leu Ser Leu Val Gln Asn Ala Leu Glu Gly
370 375 380

Ala Gly Asp Ser Val

ES 2 533 561 T3

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> cebador directo para Ape-OPSS de *Aeropyrum pernix* (ADN sintético)
<400> 7
10 gtcatatgat ggctctggct gacatctct 29
<210> 8
<211> 29
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador inverso para Ape-OPSS de *Aeropyrum pernix* (ADN sintético)
20 <400> 8
gtaagctttt aaacagagtc accagcacc 29
<210> 9
<211> 29
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador directo para Mtb-OPSS de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
30 <400> 9
gtcatatgat gacacgatac gactcgctg 29
<210> 10
<211> 29
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador inverso para Mtb-OPSS de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
40 <400> 10
gtaagctttc atgcccatag ttgcccttc 29
45 <210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> cebador directo para Msm-OPSS de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*
<400> 11
55 ataagctttc atgcccatag ctgcccttc 29
<210> 12
<211> 29
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador inverso para Msm-OPSS de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*
65 <400> 12
ataagctttc attccagcgc gtcctcggc 29

ES 2 533 561 T3

<210> 13
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador directo para Rjo-OPSS de ADN sintético
 <400> 13
 10 gtcatatgat ggcgcggttc gattcgctg 29
 <210> 14
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para Rjo-OPSS de ADN sintético
 20 <400> 14
 tagcggccgc tcatgcccac aactgcctt c 31
 <210> 15
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para Nfa-OPSS de ADN sintético
 30 <400> 15
 gtcatatgat ggcacgctac gaatcgctg 29
 <210> 16
 <211> 28
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para Nfa-OPSS de ADN sintético
 40 <400> 16
 gtaagctttc aggcccagag ctggcctt 28
 <210> 17
 <211> 29
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> cebador directo para Mtb-T de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
 <400> 17
 gtcatatgat gacacgatac gactcgctg 29
 <210> 18
 <211> 29
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador inverso para Mtb-T de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
 <400> 18
 gtaagctttc attccagagc ggtctcggc 29

ES 2 533 561 T3

<210> 19
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> cebador directo para Msm-T, Msm-HA2, Msm-EP3 de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

<400> 19
gtcatatgat gacgcgctac gactccctg 29

10

<210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> cebador inverso para Msm-T, Msm-HA2, Msm-EP3 de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

20

<400> 20
ataagctttc attccagcgc gtcctcggc 29

25

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo de pCL-P(CJ1)-Msm-T de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

30

<400> 21
gatatcgag cagccatcat c 21

35

<210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de pCL-P(CJ1)-Msm-T de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

40

<400> 22
cccaagcttt cattccagcgc cgtcctcg 28

45

<210> 23
<211> 972
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Msm-OPSS de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

<400> 23

ES 2 533 561 T3

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag 60
 aacctgtcgc cccgggtgga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggct gtgggccaag 120
 ctogaggacc gcaaccogac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgategaa 180
 caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc gggccacga tectggaacc caccagcggc 240
 aacaccggca tctcgtggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg 300
 atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcac 360
 atcttcagcc ccgccgaggg cggtccaac accgcggctc cgaccgcgaa agagcttgcc 420
 ggcgagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccggccaa cagcgtatgcg 480
 cactacttcg gcaccggccc cgaactgctc ggggacctgc ccgagatcac ccacttcgtc 540
 gcggggctcg gcaccaccgg gaccctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcacggt 600
 cccggcgtgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc 660
 aacatcgacg agggcttcat ccccgagttg taogacgccg acgtgctcac cacccggttc 720
 tcgggtgggt cgttcgacgc cgtgcgccgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata 780
 ttccggggca tctcgaccgg cgcgggtgtg caogccgcgc tggggatggc cgccaaggcc 840
 gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgccgg atggaagtat 900
 ctgtcgaccg gcgcgtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaagggcag 960
 ctatgggcat ga 972

<210> 24
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Msm-T de la cepa MC2 155 de *Mycobacterium smegmatics*

10

<400> 24

ES 2 533 561 T3

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag 60
aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggt gtgggccaag 120
ctcgaggacc gcaacccgac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgatcgaa 180
caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaacc caccagcggc 240
aacaccggca tctcgctggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg 300
atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcac 360
atcttcagcc ccgccgaggg cggctccaac accgcggtcg cgaccgcgaa agagcttgcc 420
gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccggccaa cagcgtgcg 480
cactacttcg gcaccggccc cgaactgctc gcggacctgc ccgagatcac ccacttcgtc 540
gcggggctcg gcaccaccgg gaccctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcaagtt 600
cccggcgtgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc 660
aacatcgacg agggcttcat ccccgagttg tacgacgccg acgtgctcac cacccggttc 720
tcgggtgggt cgttcgacgc cgtgcgccgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata 780
ttcgcgggca tctcgaccgg cgcggtggtg caccgccgcgc tggggatggc cgccaaggcc 840
gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgcgg atggaagtat 900
ctgtcgaccg gcgcgtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaa 954

<210> 25
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Msm-T-HA2 de *Mycobacterium smegmatics* CC1

10

<400> 25

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag 60
aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggt gtgggccaag 120
ctcgaggacc gcaacccgac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgatcgaa 180
caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaatc caccagcggc 240
aacaccggca tctcgctggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg 300

ES 2 533 561 T3

atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcate 360
 atcttcagcc ccgccgaggg cggctccaac accgcggtcg cgaccgcgaa agagcttgcc 420
 gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccggccaa cagcgatgcg 480
 cactacttgc gcaccggccc cgaactgctc ggggacctgc ccgagatcac ccaacttctc 540
 gcggggctcg gcaccaccgg gaccctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcacggt 600
 cccggcgtgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc 660
 aacatcgacg agggcttcat ccccagttg tacgacgccg acgtgctcac caccgggttc 720
 tcggtgggct cgttcgacgc cgtgcgccgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata 780
 ttccgggca tctcgaccgg cgcggtgtg caogccgcgc tggggatggc cgccaaggcc 840
 gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgccgg atggaagtat 900
 ctgtcgaccg gcggtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaa 954

<210> 26
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Msm-T-EP3 de *Mycobacterium smegmatics* CC2

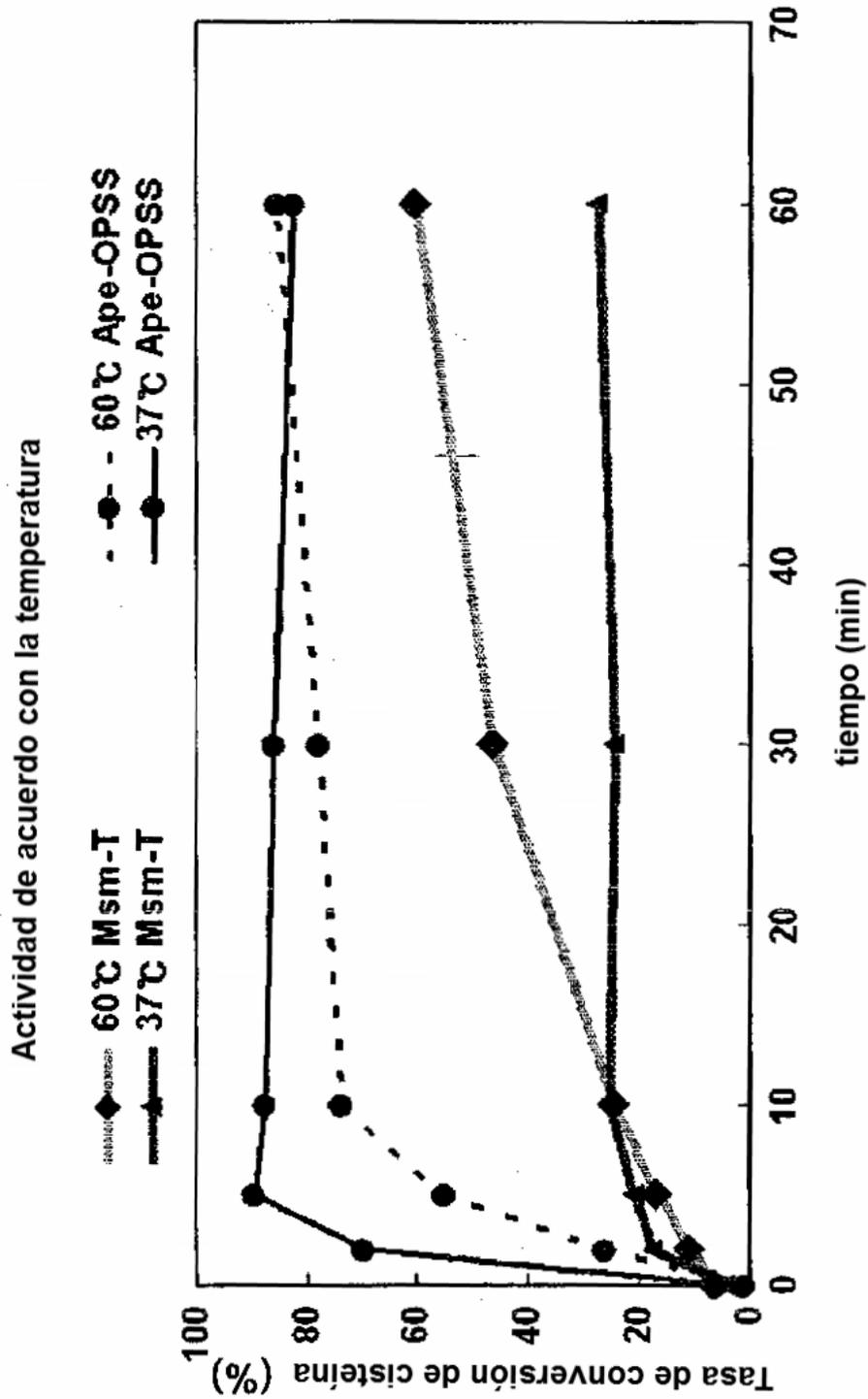
<400> 26

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag 60
 aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggct gtgggccaag 120
 ctcgaggacc gcaaccogac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgatcgaa 180
 caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaacc caccagcggc 240
 aacaccggca tctcgtggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg 300
 atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcate 360
 atcttcagcc ccgccgaggg cggctccaac gccgcggtcg cgaccgcgaa tgagcttgcc 420
 gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccggccaa cagcgatgcg 480
 cactacttgc gcaccggccc cgaactgctc ggggacctgc ccgagatcac ccaacttctc 540
 gcggggctcg gcaccaccgg gaccctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcacggt 600
 cccggcgtgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc 660
 aacatcgacg agggcttcat ccccagttg tacgacgccg acgtgctcac ctcccggttc 720
 tcggtgggct cgttcgacgc cgtgcgccgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata 780
 ttccgggca tctcgaccgg cgcggtgtg caogccgcgc tggggatggc cgccaaggcc 840
 gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgccgg atggaagtat 900
 ctgtcgaccg gcggtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaa 954

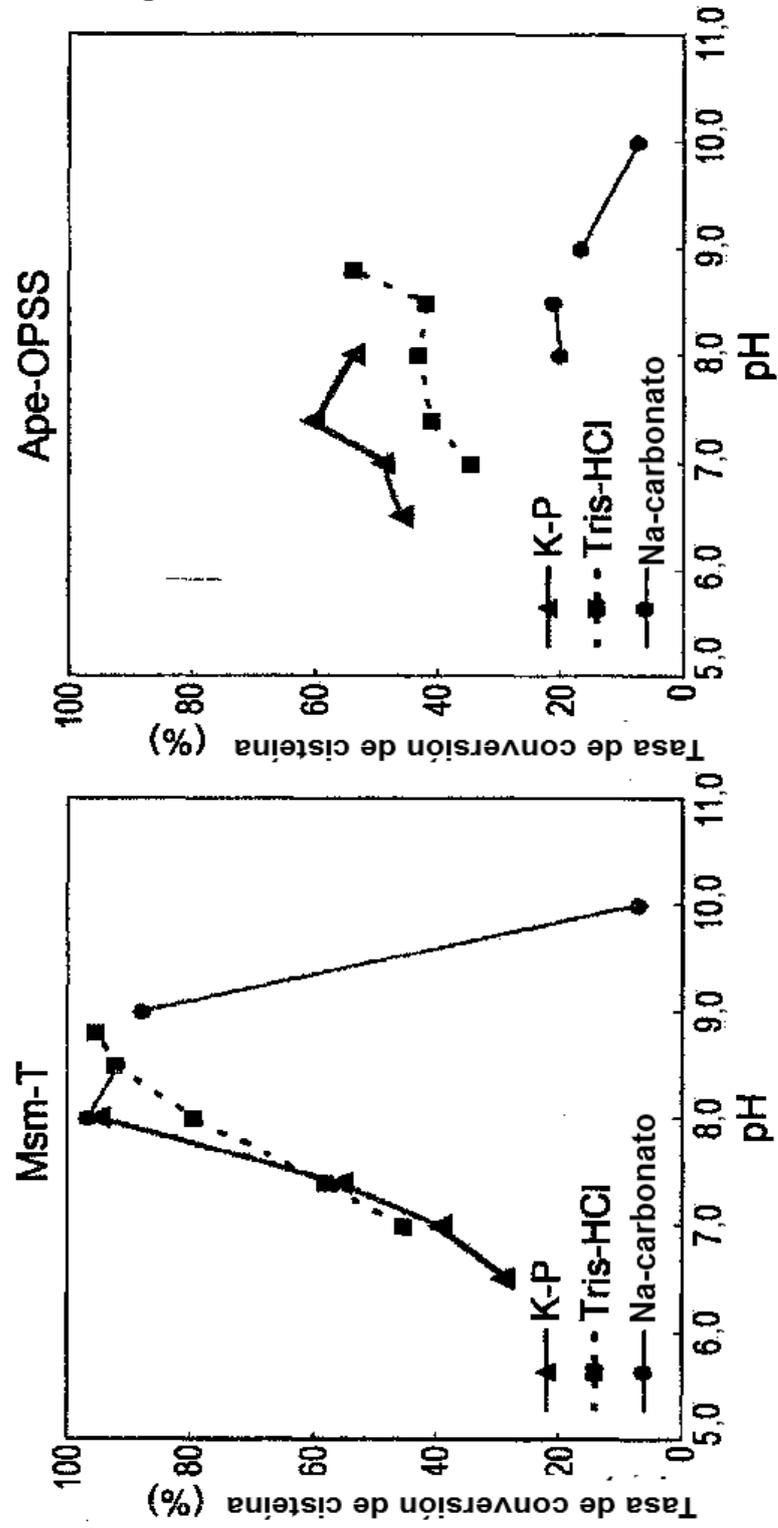
REIVINDICACIONES

1. Un mutante de la O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) de *Mycobacterium smegmatis*, que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3.
- 5 2. Un mutante de la O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) de *Mycobacterium smegmatis*, que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4.
3. El mutante de OPSS de las reivindicaciones 1 o 2, que muestra actividad óptima en condiciones que comprenden:
 - 10 i) la adición de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 2 mM de PLP (piridoxal-5'-fosfato) o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mM de DTT (ditiotreitól) como un cofactor;
 - ii) un intervalo de temperatura de reacción de 25 ~ 60 °C; y
 - iii) un intervalo de pH de 6,0 ~ 10,0.
4. Una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS como en una de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector de expresión que porta una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS como en una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 6. Un transformante transformado con el vector de expresión de la reivindicación 5.
7. Un procedimiento de producción de cisteína que comprende hacer reaccionar O-fosfo-L-serina (OPS) con sulfuros en presencia del mutante de OPSS como en una de las reivindicaciones 1 a 3.
8. El procedimiento de producción de cisteína de la reivindicación 7, en el que la OPS está en una forma purificada o en una forma de cultivo de fermentación que contiene OPS.
- 20 9. El procedimiento de producción de cisteína de la reivindicación 7, que comprende un sulfuro seleccionado del grupo que consiste en: Na₂S, NaSH, (NH₄)₂SH, H₂S, y S₂O₃, estando todos ellos en estado gaseoso o líquido.
10. El procedimiento de producción de cisteína de la reivindicación 7, en el que el sulfuro es usado en una cantidad de 0,1 ~3 veces respecto una concentración molar de OPS.
- 25 11. El uso del mutante de OPSS como en una de las reivindicaciones 1 a 3 en la biosíntesis de cisteína a partir de OPS.

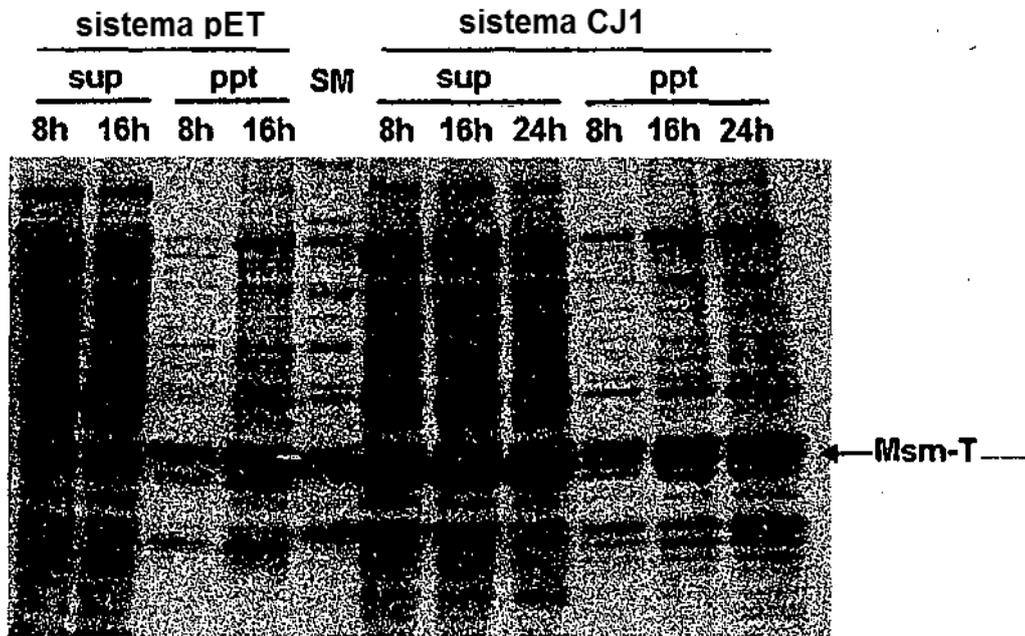
[Figura 1]



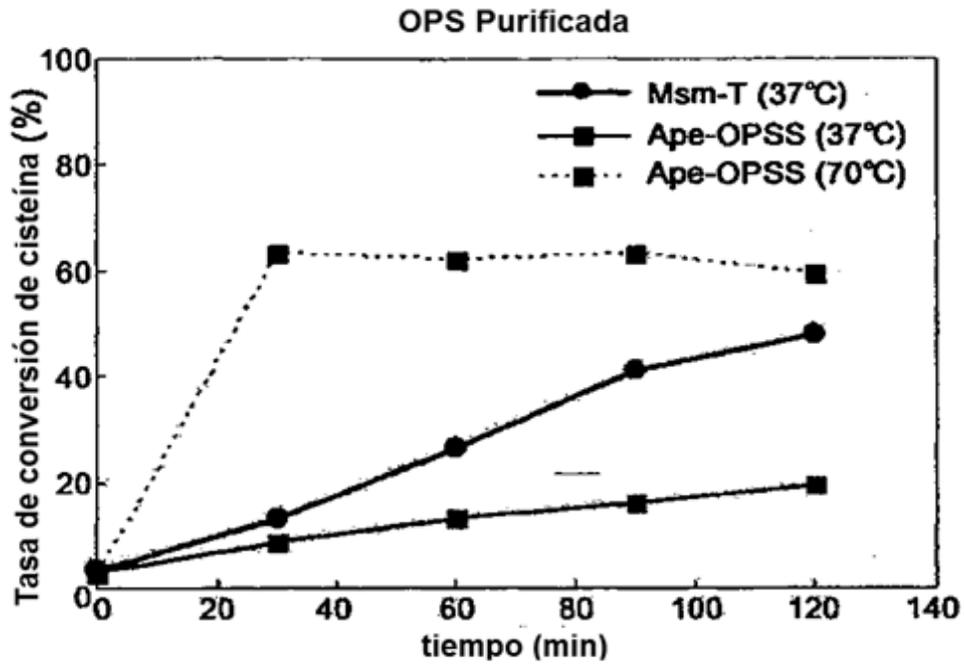
[Figura 2]



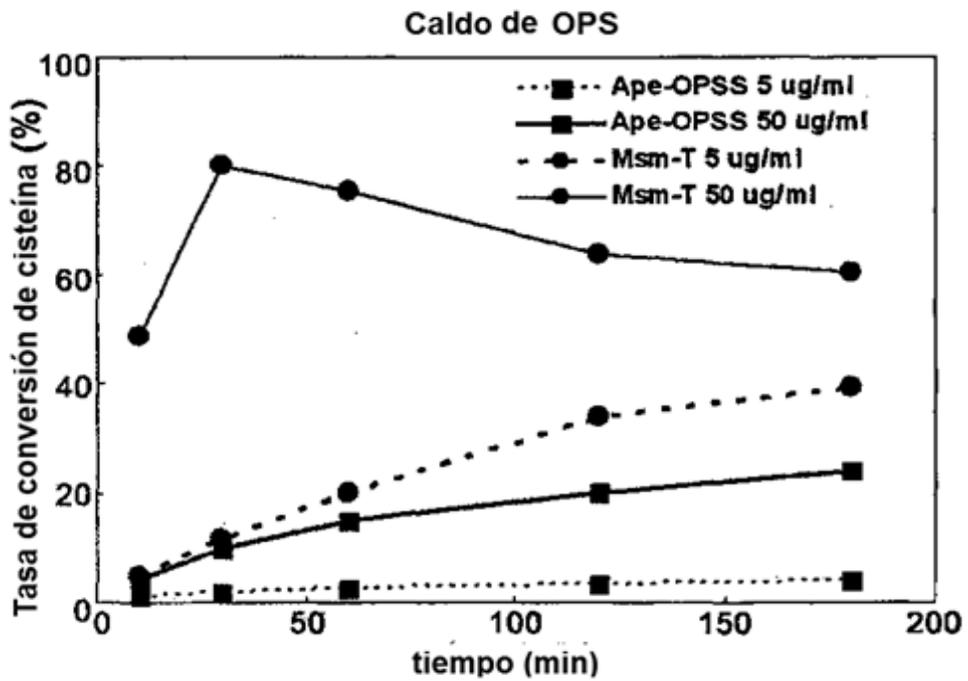
[Figura 3]



[Figura 4]

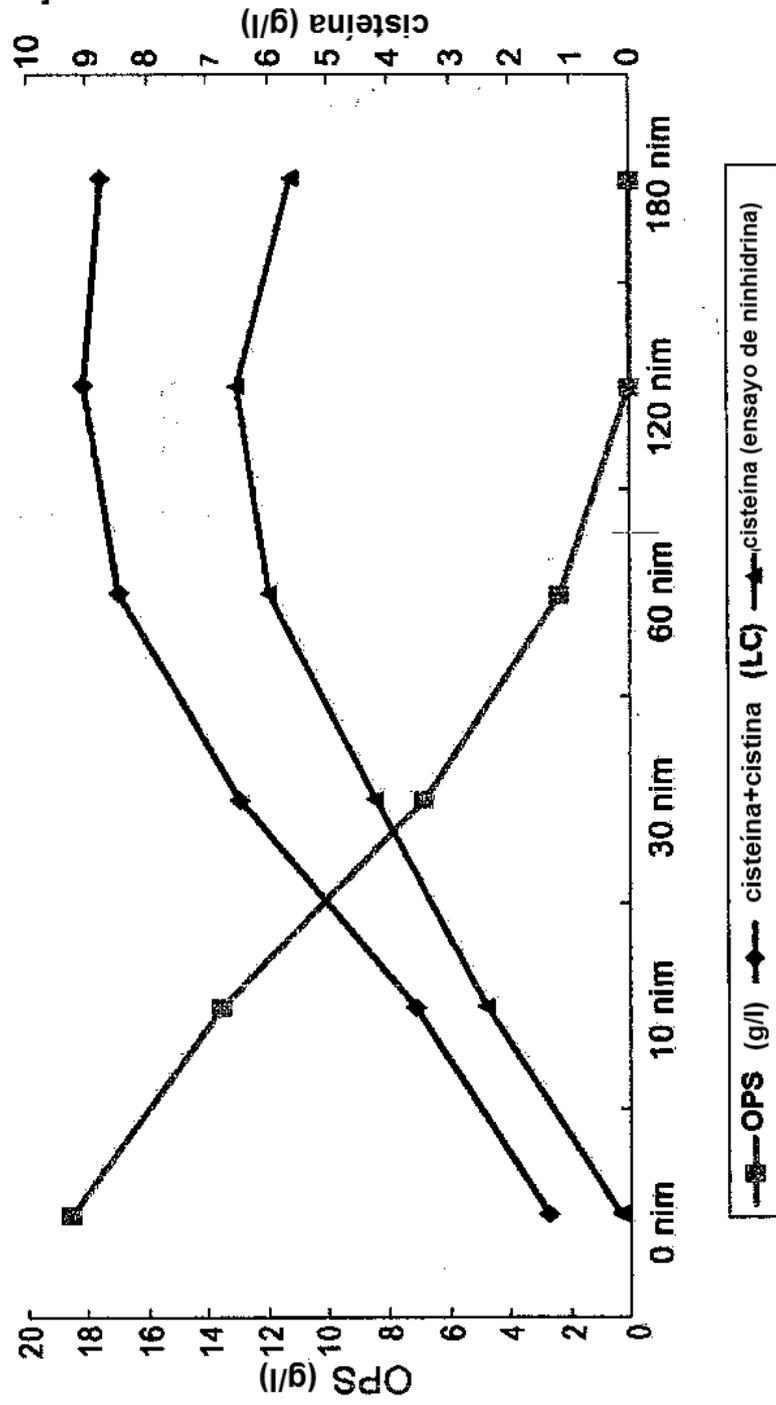


[Figura 5]



[Figura 6]

Reacción de conversión 1L (Msm-HA2)



[Figura 7]

