

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 683**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012** **PCT/KR2012/010900**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13089478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012** **E 12858268 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2792748**

54 Título: **Método de preparación de cisteína o de un derivado de la misma utilizando una nueva O-fosfoserina sulfhidrilasa**

30 Prioridad:

15.12.2011 KR 20110135665

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

28.09.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330 Dongho-ro Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**SONG, BYEONG CHEOL;
CHANG, JIN SOOK;
JO, JAE HYUN y
KIM, HYE WON**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 634 683 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

Método de preparación de cisteína o de un derivado de la misma utilizando una nueva O-fosfoserina sulfhidrilasa

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere, en líneas generales, a un método de producción de cisteína o de derivados de la misma utilizando una nueva O-fosfoserina sulfhidrilasa. En particular, la presente invención se refiere a un método de producción de cisteína o de derivados de la misma, que comprende la etapa de hacer reaccionar O-fosfoserina (OPS) como un sustrato, con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) que tiene una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 1 o 2, o de un microorganismo que la expresa, mediante lo cual se produce cisteína o derivados de la misma, en el que dichos derivados se seleccionan en grupo que consiste en N-acetilcisteína (NAC) y S-carboximetilcisteína (SCMC).

15 **Técnica anterior**

La cisteína es un aminoácido importante en el metabolismo del azufre de todos los seres vivos. Se utiliza en la biosíntesis de proteínas, tales como la queratina del cabello, glutatión, biotina, metionina y otros metabolitos que contienen azufre, o se utiliza como un precursor de coenzima A. Además, se sabe que la biosíntesis de la cisteína está estrechamente asociada a la biosíntesis de otros aminoácidos tales como serina, glicina y metionina. Desde el punto de vista industrial, la cisteína y sus derivados se utilizan en diversos campos, incluyendo la industria farmacéutica (para el tratamiento de enfermedades bronquiales), la industria de cosméticos (en champú, composiciones para ondas permanentes) y la industria alimentaria (antioxidantes, potenciadores de sabor, suavizantes de masa).

Hasta ahora, la cisteína se había producido químicamente por hidrólisis ácida de materias primas tales como cabello humano o plumas de animales. Sin embargo, no sólo un rendimiento de la producción de cisteína a partir de cabello es tan bajo como de 7~8 %, sino también el uso de ácido clorhídrico o de ácido sulfúrico causa una gran cantidad de residuos que producen contaminación ambiental. Además, el uso de cabello como materia prima puede inducir al usuario a tener una fuerte aversión a dicho uso. Estos problemas han impulsado el desarrollo de procesos de producción ecológicos de la cisteína. Por lo tanto, se ha desarrollado un método de producción de cisteína utilizando microorganismos.

La producción microbiana representativa de cisteína es 1) la conversión biológica de D, L-ATC utilizando un microorganismo. Sin embargo, este proceso de conversión es difícil de aplicar industrialmente debido a la baja solubilidad del precursor D, L-ATC. 2) Otro método de producción de cisteína es la fermentación directa utilizando *E. coli*. En este método, la acumulación excesiva de cisteína en los organismos puede incurrir a toxicidad intracelular, y hay una limitación en la producción de cisteína a una alta concentración utilizando microorganismos.

En lo que respecta a una de las rutas de biosíntesis de la cisteína en microorganismos y plantas, la O-acetil-serina (OAS) actúa como un precursor intermedio que proporciona el esqueleto de carbono de cisteína. La O-acetilserina sulfhidrilasa (OASS), utilizando sulfuro de hidrógeno como donante de azufre, cataliza la conversión de OAS en cisteína. Por lo tanto, la cisteína puede producirse a partir de microorganismos que acumulan OAS y de diversos donantes de azufre que utilizan OASS (Patente de Estados Unidos N.º 6.579.705).

Los documentos WO-A2 2006/138689 y EP-A1 0 272 365 desvelan métodos de producción de cisteína o derivados de la misma haciendo reaccionar O-acetilserina (OAS) como un sustrato con un sulfuro en presencia de una cisteína sintasa (CysK).

Ågren *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 283 (46) (2008), 31567-31574, desvelan que la cisteína sintasa (CysM) de *Mycobacterium tuberculosis* es una O-fosfoserina sulfhidrilasa. Otras bases de datos UniProt N.º C8W164 y UniProt N.º COGC27 describen cisteína sintetasas que son 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 1 y 2 de la presente invención. Sin embargo, la función de las secuencias de aminoácidos (como se describe en la Base de Datos UniProt N.º C8W164 y UniProt N.º COGC27) como enzimas que convierten OPS en cisteína, no se conocía ni se había descrito.

Los autores de la presente invención han investigado un nuevo método de producción de cisteína, distinto del método convencional, y han descubierto la existencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) que cataliza la síntesis de cisteína a partir de O-fosfoserina (OPS) en un microorganismo particular. La OPS es un precursor intermedio de L-serina y tiene una ruta metabólica más corta que la de la OAS. Por tanto, el uso de OPS también puede ser ventajoso, en comparación con el uso de OAS. En particular, se descubrió que la OPSS de *Trichomonas vaginalis* no requiere coenzimas transferidoras de azufre, tales como mec⁺ y cys0, a diferencia de la OPSS de *Mycobacterium tuberculosis*, y también muestra actividad óptima a 37 °C, a diferencia de la OPSS procedente de *Aeropyrum pernix*.

Divulgación

Problema técnico

5 Los autores de la presente invención han realizado muchos esfuerzos para desarrollar un método de producción de cisteína a alto rendimiento y como resultado han identificado una nueva OPSS que tiene una actividad para sintetizar cisteína utilizando OPS como un sustrato a partir de diversos microorganismos y han descubierto que esta nueva OPSS tiene una mayor actividad sintetizadora de cisteína que la OPSS conocida de *Trichomonas vaginalis*, completando de este modo la presente invención.

Solución técnica

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de cisteína o derivados de la misma que comprende la etapa de hacer reaccionar O-fosfoserina (OPS) con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o 2 o de un microorganismo que la expresa, produciendo de este modo cisteína o derivados de la misma, en el que dichos derivados se seleccionan del grupo que consiste en N-acetilcisteína (NAC) y S-carboximetilcisteína (SCMC).

Efectos Ventajosos

20 La presente invención proporciona un método de producción de cisteína mediante una nuevas O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) utilizando como sustrato O-fosfoserina y este método es ventajoso ya que la cisteína puede producirse ecológicamente a alto rendimiento mediante un método sencillo.

25 La FIG. 1 muestra el resultado de la medición de las tasas de conversión de cisteína de tres tipos de OPSS a los 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos;
La FIG. 2 muestra el resultado de la medición de las tasas de conversión de cisteína de acuerdo con el pH para examinar la sensibilidad del pH de Dal-OPSS;
La FIG. 3 muestra el resultado de la medición de las tasas de conversión de cisteína de tres tipos de OPSS al
30 cabo de 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos utilizando un caldo de fermentación OPS y sulfuro como sustratos;
y
La FIG. 4 muestra el resultado de la medición de las tasas de conversión de cisteína de Dal-OPSS de acuerdo con la temperatura.

Mejor modo

35 En un aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de cisteína o derivados de la misma, que comprende la etapa de hacer reaccionar O-fosfoserina (OPS) como sustrato con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o 2, o de un microorganismo que la expresa, produciendo de este modo cisteína o los derivados de la misma, en el que dichos derivados se seleccionan del grupo que consiste en N-acetilcisteína (NAC) y S-carboximetilcisteína (SCMC).

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "O-fosfoserina sulfhidrilasa" (en lo sucesivo en el presente documento denominada OPSS) se refiere a una enzima que transfiere un grupo tiol (grupo SH) a O-fosfoserina (en lo sucesivo en el presente documento denominada OPS), que convierte OPS en cisteína.

45 En la presente invención, la OPSS se representa por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, que es una enzima con una actividad OPSS recientemente detectada que identificaron los autores de la presente invención. Algunas modificaciones en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o 2 son posibles, siempre que tenga actividad OPSS y la mantenga. Los expertos en la técnica entenderán rápidamente que una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70 % o mayor, especialmente de 80 % o mayor, más específicamente de 90 % o mayor, y lo más específicamente de 95 % o mayor, con la secuencia de aminoácidos por modificación artificial, es equivalente a la secuencia de aminoácidos de la presente invención, siempre que tenga la actividad deseada.

50 En un aspecto específico Dal-OPSS, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y Dal-OPSS, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se utilizaron para evaluar sus actividades para sintetizar cisteína utilizando como sustrato OPS purificada o caldo de fermentación OPS. Como resultado, mostraron mayores tasas de conversión de cisteína que las del grupo de control, Tva-OPSS, por lo tanto se sugirió que la OPSS que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 podía producir cisteína a un alto rendimiento (FIGS. 1 y 3, y Tablas 3 y 4).

60 Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a un porcentaje de la similitud de secuencia entre dos restos polipeptídicos. La correspondencia entre las secuencias de un resto con otro puede determinarse por técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la homología puede determinarse mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas polipeptídicas alineando la información de

secuencia y utilizando programas informáticos fácilmente disponibles. Adicionalmente, la homología puede detectarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de desintegración con una o más nucleasas específicas monocatenarias y determinación del tamaño de los fragmentos desintegrados.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "similitud de secuencia" se refiere al grado de coincidencia o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de proteínas que pueden compartir, o no, un origen evolutivo común. En un aspecto específico, dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares", cuando al menos aproximadamente el 21 % (específicamente al menos
10 aproximadamente el 50 %, y más específicamente al menos aproximadamente el 75 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 99 %) de los polipéptidos coinciden sobre la longitud definida de las secuencias de aminoácidos. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias utilizando programas informáticos convencionales disponibles en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación en condiciones, por ejemplo, rigurosas, como se definan para ese sistema particular. Las condiciones de hibridación apropiadas definidas se encuentran dentro de la experiencia de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *infra*).

Como se usa en el presente documento, la expresión "conversión de cisteína" pretende referirse a la reacción catalítica de OPSS que da como resultado la conversión del sustrato OPS en el producto cisteína, es decir, se
20 refiere a reacción catalítica de convertir OPS en cisteína. Además, como se usa en el presente documento, la expresión "tasa de conversión de cisteína" se refiere al porcentaje de OPS convertido en cisteína. En condiciones de reacción óptimas, 1 mol de OPS se convierte en 1 mol de cisteína. Por ejemplo, si 100 moles de OPS se convierten en 100 moles de cisteína, la tasa de conversión de cisteína es de 100 %. La OPSS como se usa en la presente invención, cataliza la conversión de OPS en cisteína, que muestra una ruta metabólica más corta que la ruta metabólica utilizando OAS, y por tanto es ventajosa en la producción de precursores. Adicionalmente, existe la
25 ventaja de que la propia OPSS como se usa en la presente invención, es capaz de producir cisteína sin coenzimas transferidoras de azufre (mec⁺ y cys0 de *M. tuberculosis*), a diferencia de la OPSS convencional.

La OPSS como se usa en la presente invención, puede estar codificada por un polinucleótido que tiene una
30 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 a 12. La OPSS que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 de la presente invención, puede estar codificada por un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 o 10, respectivamente. Más específicamente, para aumentar la expresión proteica heterogénea en *E. coli*, esta puede estar codificada por un polinucleótido que tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 o 12 que está optimizada para *E. coli* como un uso de optimización de codones.

35 Los microorganismos que expresan OPSS, como se usa en la presente invención, puede ser un microorganismo que expresa endógenamente OPSS, como se usa en la presente invención, o un microorganismo en el que una secuencia de nucleótidos que codifica OPSS, como se usa en la presente invención, se introduce en forma de un vector o se integra en el cromosoma. Adicionalmente, la actividad OPSS del microorganismo que expresa OPSS
40 puede potenciarse. Un método de potenciación de la actividad OPSS incluye un método para aumentar el número de copias introduciendo un vector que incluya un polinucleótido que tenga la secuencia de nucleótidos que codifica OPSS en el microorganismo, un método de uso de optimización de codones de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con el uso de codones favorecido por el microorganismo, un método de sustitución del promotor del gen que codifica OPSS con un fuerte promotor en el microorganismo que expresa OPSS, un método de introducción de una mutación en el promotor, un método de introducción de una mutación en el gen que codifica la OPSS
45 recientemente aislada para potenciar la actividad OPSS, o similar.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón que esté unido a otro
50 segmento de ADN para inducir la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (p. ej., un plásmido, un fago, un cósmido, un cromosoma, un virus) que actúe como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, en otras palabras, que sea capaz de replicarse bajo su propio control.

En la presente invención, el microorganismo que expresa OPSS puede ser un microorganismo que se obtenga por
55 transformación del vector que incluya OPSS. El método de transformación puede incluir cualquier método que introduzca el ácido nucleico en las células y puede realizarse seleccionando una técnica convencional adecuada conocida en la materia. Por ejemplo, puede incluirse la electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, infección retroviral, microinyección, DEAE-dextrano, liposoma catiónico o similar, pero no se limita a estos métodos.

60 El microorganismo que expresa OPSS puede ser procariota o eucariota, específicamente, enterobacterias o bacterias corineformes, más específicamente, un microorganismo perteneciente a *Escherichia sp.*, *Serratia sp.*, o similar, y más específicamente *E. coli*.

La OPSS puede aislarse de un caldo de cultivo que se obtiene cultivando el microorganismo que expresa la enzima
65 con la actividad OPSS recientemente detectada.

Puede utilizarse cualquier método típicamente conocido en la técnica y en un caso específico se utilizó un sistema manual de expresión pET (Novagen Inc.) para cultivar el microorganismo, seguido del aislamiento utilizando columnas de Ni-NTA.

- 5 En la presente invención, la OPS que se utiliza como un sustrato de la enzima con la actividad OPSS recientemente detectada, puede ser un caldo de fermentación de un microorganismo que incluya OPS o puede ser una OPS purificada, tal como la OPS pura disponible en el comercio.

- 10 Un Ejemplo de la OPS pura puede incluir el producto n.º PO878 de Sigma-Aldrich o el producto n.º CAS407-41-0 de Wako. Adicionalmente, el caldo de fermentación de OPS puede prepararse cultivando un microorganismo que tenga productividad OPS, por ejemplo, el microorganismo depositado como n.º KCCM 11103P (CA07-0022/pCL-prmf-serA* (G336V) -serC; véase la Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115).

- 15 Como se usa en el presente documento, la expresión "sulfuro" se refiere a un compuesto de azufre y a un elemento más electropositivo que el azufre, y con respecto al objeto de la presente invención, el sulfuro se utiliza en la preparación de cisteína o derivados de la misma. El sulfuro puede proporcionarse en forma sólida típicamente utilizada en la técnica, así como en forma líquida o en forma de gas, debido a la diferencia en el pH, presión o solubilidad. Siempre que pueda convertirse en un grupo tiol (grupo SH), tal como sulfuro (S^2-), tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), etc.; es posible utilizar cualquier compuesto de azufre. Específicamente, puede utilizarse Na_2S , H_2S , $NaSH$, $(NH_4)_2S$ y S_2O_3 . En una reacción específica de la presente invención, se utilizó Na_2S como una fuente de azufre. La reacción de la presente divulgación es una reacción que proporciona un grupo tiol a un grupo reactivo de OPS para producir una cisteína o un derivado de cisteína. En esta reacción, el sulfuro puede añadirse específicamente a una concentración molar de 0,1 a 3 veces, y más específicamente de 1 a 2 veces más alta que la de la OPS añadida, pero sin limitarse a esta.

- 25 La optimización de la conversión enzimática de OPSS como se usa en la presente invención, puede realizarse utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la optimización puede basarse, pero sin limitación, en un conocimiento completo de las características de la enzima OPSS, específicamente, la temperatura y pH óptimos, inhibición frente a sustratos, concentración de sustratos, termoestabilidad de la propia enzima OPSS, etc. Además, la optimización puede determinarse por condiciones óptimas para la conversión enzimática, en particular, la concentración de OPSS óptima, los equilibrios óptimos de las concentraciones de los sustratos utilizados, una preferencia por el sulfuro utilizado en la conversión enzimática excepto el sustrato OPS, una preferencia por los tampones utilizados en la reacción de conversión, la influencia de los iones generados y la presencia de cofactores y sus concentraciones óptimas, o etc..

- 35 En un caso específico se examinó la tasa de conversión de cisteína dependiendo del pH y de la temperatura utilizando Dal-OPSS. Como resultado se observó la actividad óptima a un pH de 7,0 a 7,4 (FIG. 2) y a una temperatura de 37°C (FIG. 4).

- 40 En la presente invención, pueden añadirse cofactores adicionales para la reacción de conversión de cisteína, por ejemplo, PLP (piridoxal-5'-fosfato), DTT (ditiotreitól) o PLP y DTT. Estos cofactores pueden mejorar la eficiencia de la reacción de conversión de cisteína. En un caso específico se confirmó que la adición de PLP 0,2 mM, de DTT 25 mM, o de ambos cofactores, aumentaba la tasa de conversión de cisteína (Tabla 5). EL PLP puede, pero sin limitación, añadirse específicamente de 0,001 a 2 mM, y más específicamente, de 0,01 a 1 mM. Además, el DTT puede, pero sin limitación, añadirse de 0,001 a 100 mM, y más específicamente, de 0,01 a 50 mM.

- 50 El método de la presente invención puede incluir adicionalmente la etapa de separar y purificar la cisteína o sus derivados producidos en la etapa de reacción. En esta etapa, la cisteína deseada puede recogerse aislando y purificando la cisteína a partir de una mezcla de reacción utilizando un método adecuado conocido en la técnica.

- Los expertos en la técnica pueden sintetizar fácilmente derivados de cisteína utilizando el método sintético químico conocido a partir de cisteína preparada por el método de la presente invención. La cisteína puede reaccionar fácilmente con un agente de acetilación para sintetizar NAC (N-acetilcisteína) y con ácido haloacético en condiciones básicas para sintetizar SCMC (S-carboximetilcisteína). Estos derivados de cisteína se utilizan como materiales farmacéuticos para tratar tos, bronquitis, asma bronquial, dolor de garganta o etc.

Modo para llevar a cabo la invención

- 60 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos.

Ejemplo 1: Identificación de la enzima O-fosfoserina Sulfhidrilasa (OPSS)

- 65 Se ha notificado que la OPSS procedente de *Trichomonas vaginalis* tiene una actividad sin cofactores, a diferencia de la OPSS procedente de *Mycobacterium tuberculosis* que requiere dos tipos de cofactores además de OPSS y que tiene una actividad óptica a 37 °C, a diferencia de la OPSS procedente de *Aeropyrum pernix* que presenta una

actividad óptica a 60 °C. Basándose en esto, los autores de la presente invención aislaron nuevas OPSS procedentes de microorganismos, que mostraban alta homología de secuencia de la secuencia de aminoácidos de OPSS procedente de *T. vaginalis*. Las enzimas con la actividad OPSS recientemente detectada tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, y se denominan Dac-OPSS o Dal-OPSS, respectivamente.

Adicionalmente, la enzima con la actividad OPSS recientemente detectada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 está codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 o 10, respectivamente.

Dado que estas dos OPSS no proceden de *E. coli*, su expresión en *E. coli* puede ser dificultosa. Para facilitar su expresión en *E. coli*, la optimización de codones de las enzimas con la actividad OPSS recientemente detectada, se realizó utilizando Jcat que es una herramienta de optimización del uso de codones (www.jcat.de). A través de este procedimiento, la optimización del uso de codones de los polinucleótidos de SEQ ID NO: 9 y 10 se realizó para dar las SEQ ID NO: 11 y 12. Los polinucleótidos que tienen las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y 12 se proporcionaron y sintetizaron por Genotech Corp., y se recibieron en forma de vectores por clonación con Topo TA. Para obtener la enzima OPSS de cada cepa, se construyó un vector pET28a (novagen), típicamente utilizado para la expresión de enzimas.

Los 3 tipos de vectores que expresan OPSS y los moldes y cebadores utilizados para la construcción de los vectores son los mismos que los mostrados en la Tabla 1 siguiente. La PCR se realizó utilizando combinaciones de los moldes y cebadores para amplificar cada uno de los genes de OPSS. Los fragmentos génicos resultantes y el vector, PET28a, se trataron con las enzimas de restricción, NdeI y HindIII (a 37 °C durante 3 horas). Después de esto, cada fragmento génico se insertó en el vector pET28a mediante un método de ligamiento típico. Los vectores que expresan la enzima y sus secuencias génicas se examinaron por secuenciación. Los vectores preparados que expresan la enzima se introdujeron en *E. coli* que tenía el genotipo de DE3 para preparar tres tipos de cepas que expresan la enzima OPSS.

[Tabla 1]

Nombre de la enzima	Nombre del vector	Molde utilizado	Cebador utilizado
Tva-OPSS	pET28a-Tva-OPSS	ADN Sintético	SEQ ID NO: 3(D) y 4(I)
Dac-OPSS	pET28a-Dac-OPSS	ADN Sintético	SEQ ID NO: 5(F) y 6(I)
Dal-OPSS	pET28a-Dal-OPSS	ADN Sintético	SEQ ID NO: 7(D) y 8(I)

La expresión de la enzima se realizó con referencia al manual del sistema pET (novagen). Se seleccionaron colonias sencillas de cada cepa de una placa con LB y se inocularon en 5 ml de medio líquido LB, seguido de cultivo a 37 °C y 200 rpm durante 16 horas. Las cepas se volvieron a inocular en 25 ml de medio líquido LB reciente (matraces de 250 ml de volumen) y se cultivaron hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5~0,6 (2~3 horas) en las mismas condiciones de cultivo. Después, se añadió IPTG 1 mM a los medios, seguido de cultivo a 18 °C y a 120 rpm durante 18 horas para la inducción de la expresión de la enzima. La purificación de las enzimas se realizó utilizando columnas de etiquetas de His y Ni-NTA. La purificación se realizó utilizando His Spintrap (GE Healthcare).

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

Las actividades convertidoras de cisteína de los 3 tipos de enzimas OPSS anteriormente obtenidos se midieron para examinar si la cisteína podía sintetizarse utilizando OPS como sustrato. Las condiciones y los métodos para el ensayo de la actividad convertidora de cisteína (ensayo de enzima cysM), se realizó con referencia a informes previos (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). Las condiciones de ensayo para determinar la actividad enzimática son las mismas que las mostradas en la siguiente Tabla 2:

[Tabla 2]

Soluc. de reserva	Conc. final.	Blanco	OPSS
Enzima – 6 His		-	40 (50 µg)
HEPES 1M (pH 7,4)	HEPES 100 mM	100	100
Na ₂ S 0,5 M	Na ₂ S 10 mM	20	20
PLP 10 mM	PLP 0,2 mM	20	20
OPS 100 mM	OPS 5 mM	0	50
AD		790	750
Total		1000	1000

Las soluciones de reacción, excepto las enzimas, se incubaron a 37 °C durante 5 min. Después de lo cual, a la solución de reacción se añadieron 50 µg de OPSS purificada, se cultivó a 37 °C. Cien (100) ml de las soluciones de la reacción enzimática se tomaron después de 10 min, 30 min, 60 min, y se mezclaron con 100 ml de TCA al 33,2 % para detener la reacción enzimática. Las concentraciones de cisteína en la solución de reacción enzimática se cuantificaron midiendo la absorbancia a una DO₅₆₀ según el método de Gaitonde. Las actividades de síntesis de cisteína de las tres OPSS diferentes se muestran en la FIG. 1 y en la siguiente Tabla 3. Los títulos de la síntesis de las OPSS se ensayaron comparando las tasas de conversión de cisteína durante el tiempo de reacción.

[Tabla 3]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 minutos	30 minutos	60 minutos
Tva-OPSS	5,94	11,48	19,32
Dac-OPSS	19,47	26,47	40,26
Dal-OPSS	94,98	95,52	98,65

Los resultados anteriores mostraron que Tva-OPSS tiene una actividad para sintetizar cisteína utilizando OPS como sustrato, y por primera vez se descubrieron actividades de síntesis de cisteína de las OPSS, Dac-OPSS y Dal-OPSS. En comparación con Tva-OPSS, se descubrió que Dac-OPSS y Dal-OPSS aumentaban las tasas de conversión de cisteína, y en particular, se descubrió que Dal-OPSS tenía una actividad notablemente alta.

Ejemplo 3: Sensibilidad al pH de la enzima OPSS

Para examinar el efecto del pH sobre la síntesis de cisteína, se midieron las tasas de conversión de cisteína de Dal-OPSS de acuerdo con el pH. En 100 mM de tampón, 50 µg/ ml del mismo se sometieron a reacción a 37 °C durante 30 minutos. En este sentido, se utilizó tampón de fosfato de potasio (K) con un pH de 6,4/ 7,0/ 7,4/ 8,0, tampón de Tris-HCl con un pH de 7,0 / 7,4 / 8,0 / 8,5 / 8,8, tampón de carbonato de sodio (Na) con un pH de 8,0/ 8,5/9,0/10,0, tampón HEPES con un pH de 7,4 y tampón de citrato de sodio (Na) con un pH de 4,0 / 5,0 / 6,0. El análisis cuantitativo de la cisteína producida se realizó utilizando el método de Gaitonde. Como se muestra en la FIG. 2, la actividad más alta se observó a un pH de 7,0 ~ 7,4, y la actividad más alta se detectó en tampón de Tris-HCl (pH 7,0), detectándose la actividad más baja en los tampones de citrato-Na y carbonato-Na. Adicionalmente, un pH óptimo difería de un tampón a otro.

Ejemplo 4: Reacción de conversión de cisteína de la enzima OPSS utilizando como sustrato caldo de fermentación OPS

El microorganismo KCCM 11103P (CA07-0022/pCL-prmf-serA* (G336V) -serC; Publicación de Patente Coreana N.º 10-2012-0041115) que tiene productividad OPS, que se preparó introduciendo la delección serB y serA * mutada en la cepa W3110 de *E. coli*, se sembró en placas en medio sólido MMYE y se cultivó a 30 °C durante una noche. Un asa de platino de la cepa cultivada en medio sólido MMYE durante una noche, se inoculó en 25 ml de medio de titulación y después se cultivó en una incubadora a 30 °C a 200 rpm durante 48 horas. Las tasas de conversión de cisteína de Tva-OPSS, Dac-OPSS y Dal-OPSS, se examinaron utilizando el caldo de fermentación OPS preparado como sustrato. La reacción de conversión de cisteína se realizó en presencia de caldo de fermentación OPS 5,4 mM, Na₂S 10 mM y PLP 0,2 mM a cada concentración de OPSS de 50 µg/ml a 37 °C. Las cantidades de la cisteína producida se midieron utilizando el método de Gaitonde. La FIG. 3 y la Tabla 4 muestran las tasas de conversión de cisteína de tres tipos de OPSS a 37 °C a lo largo del tiempo. Entre los tres tipos de OPSS, se descubrió que Dal-OPSS mostraba la tasa de conversión más alta en las condiciones de reacción de conversión anteriores.

[Tabla 4]

	Tasa de conversión de cisteína (%)		
	10 minutos	30 minutos	60 minutos
Tva-OPSS	10,23	15,62	17,44
Dac-OPSS	10,87	17,43	21,11
Dal-OPSS	8,93	29,88	38,64

Mientras tanto, para examinar el efecto de la temperatura sobre la síntesis de cisteína, se midieron las tasas de conversión de cisteína de Dal-OPSS de acuerdo con la temperatura. Las tasas de conversión de cisteína se midieron en las mismas condiciones que las indicadas anteriormente, excepto que la temperatura variaba a 30 °C, 37 °C, 50 °C, 65 °C y 80 °C. Como resultado, como se muestra en la FIG. 4, cuando Dal-OPSS reaccionó a cada temperatura durante 30 minutos, mostró la actividad más alta a 37 °C.

Ejemplo 5: Necesidad de cofactor de OPSS

Para examinar la necesidad de cofactor en la reacción de conversión de cisteína, se midió la tasa de conversión de cisteína de Dal-OPSS en ausencia o en presencia de PLP (Piridoxal-5'-fosfato) y DTT (ditiotreitól). En este sentido, el caldo de fermentación OPS 5,4 mM y Na₂S 10 mM, utilizados como sustratos, reaccionaron a 37 °C durante 30 minutos en presencia de DTT 25 mM y/o PLP 0,2 mM. La cisteína producida se cuantificó utilizando el método de Gaitonde. A continuación en la Tabla 5 se muestran los resultados.

[Tabla 5]

Dal-OPSS				Tasa de conversión de cisteína (%)
(-)	PLP,	(-)	DTT	12,88
(+)	PLP,	(-)	DTT	20,15
(-)	PLP,	(+)	DTT	24,32
(+)	PLP,	(+)	DTT	31,54

Como se muestra en la Tabla 5, la tasa de conversión de cisteína de un grupo experimental al cual se añadió tanto PLP como DTT, era aproximadamente 2,4 veces tal alta como la del grupo de control al cual no se añadió ni PLP ni DTT. Además, la tasa de conversión de cisteína también aumentó en un grupo experimental al cual se añadió PLP o DTT respectivamente. Por tanto, se observó que tanto PLP como DTT tenían una influencia positiva sobre la conversión de cisteína.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Método de producción de cisteína o derivados de la misma utilizando una nueva O-fosfoserina sulfhidrilasa

5 <130> OPA12188/PCT

<150> KR10-2011-0135665

<151> 15-12-2011

10 <160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

15 <211> 318

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Dac-OPSS

<400> 1

```

Met  Ile  Cys  Asp  Asn  Ile  Leu  Lys  Thr  Ile  Cys  Asn  Thr  Pro  Met  Ile
  1              5              10              15

Arg  Ile  Asn  Arg  Leu  Asn  Pro  Asn  Pro  Asn  Val  Glu  Ile  Tyr  Ala  Lys
              20              25              30

Phe  Glu  Gly  Thr  Asn  Pro  Gly  Gly  Ser  Ile  Lys  Asp  Arg  Ile  Ala  Leu
              35              40              45

Lys  Met  Ile  Glu  Gln  Ala  Glu  Ala  Glu  Gly  Val  Leu  Asn  Arg  Lys  Lys
  50              55              60

Thr  Ile  Ile  Glu  Ala  Thr  Ser  Gly  Asn  Thr  Gly  Ile  Ala  Leu  Ala  Met
  65              70              75              80

Ile  Gly  Ala  Val  Lys  Asp  Tyr  Lys  Val  Glu  Ile  Val  Met  Ser  Glu  Ala
              85              90              95

Val  Ser  Ile  Glu  Arg  Arg  Lys  Met  Ile  Gln  Ala  Phe  Gly  Ala  Lys  Val
              100             105             110

Ile  Leu  Thr  Asp  Pro  Glu  Phe  Gly  Thr  Asp  Gly  Ala  Ile  Leu  Lys  Val
              115             120             125

Arg  Lys  Leu  Leu  Glu  Gln  Tyr  Pro  Asp  Arg  Tyr  Phe  Cys  Thr  Asp  Gln
              130             135             140

Phe  Thr  Asn  Lys  Tyr  Asn  Lys  Leu  Ala  His  Ser  Glu  Ile  Thr  Ala  Glu
              145             150             155             160

Glu  Ile  Trp  Phe  Gln  Thr  Asn  Gly  Arg  Val  Asp  Tyr  Phe  Val  Ser  Gly
              165             170             175

Leu  Gly  Thr  Ser  Gly  Thr  Leu  Met  Gly  Val  Gly  Ala  Gly  Leu  Lys  Lys
              180             185             190

Tyr  Asn  Pro  Lys  Ile  Lys  Ile  Ile  Ser  Ala  Glu  Pro  Val  Ala  Gly  His
              195             200             205

```

Tyr	Ile	Gln	Gly	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu	Ala	Ile	Val	Pro	Gly	Ile
210						215					220				
Tyr	Asn	Glu	Ala	Glu	Leu	Asp	Glu	Ile	Ile	Met	Ile	Glu	Thr	Glu	Glu
225					230					235					240
Ala	Phe	Glu	Met	Ala	Arg	Gln	Ile	Val	Arg	Lys	Glu	Gly	Ile	Phe	Val
				245					250					255	
Gly	Met	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Met	Leu	Gly	Ala	Val	Lys	Ile	Ala	Arg
			260					265					270		
Lys	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	Ile	Val	Thr	Ile	Phe	Pro	Asp	Arg	Gly	Glu
	275						280					285			
Lys	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Phe	Lys	Ser	Glu	Ala	Gly	Asp	Gly	Lys
	290					295					300				
Leu	Gly	Arg	Met	Glu	Ala	Asp	Arg	Phe	Cys	Arg	Lys	Tyr	Lys		
305					310					315					

<210> 2
 <211> 314
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dal-OPSS

10 <400> 2

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

	<210> 3		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador directo para Tva-OPSS		
	<400> 3		
10	ggtcatatgt tatttttagcg atctcta	27	
	<210> 4		
	<211> 30		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador inverso para Tva-OPSS		
20	<400> 4		
	gtaggatcca agtgcagatt cgaacaattt	30	
	<210> 5		
	<211> 27		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador inverso para Dac-OPSS		
30	<400> 5		
	ggtcatatga tctgcgacaa catcctg	27	
	<210> 6		
35	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
40	<223> cebador inverso para Dac-OPSS		
	<400> 6		
	gtaggatcct tatttgtatt tacggcagaa acggt	35	
45	<210> 7		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> cebador inverso para Dal-OPSS		
	<400> 7		
	ggtcatatga aagctaacat cctggaagct	30	
55	<210> 8		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> cebador inverso para Dal-OPSS		

	<400> 8		
	gtactcgagt tagaacaggt ttccggtcag ca		32
	<210> 9		
5	<211> 957		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Dac-OPSS		
	<400> 9		
	atgatttgcg ataataact caagaccata tgcaatacgc cgatgatcag aattaatcgg	60	
	ctgaatccaa acccaaagt ggagatctat gcaaaatttg aaggcacaaa tcccggagga	120	
	agcataaaag atcggattgc gcttaagatg atcgagcagg ccgaggccga aggtgtactt	180	
	aacaggaaaa aaaccatcat agaggcaact tctggcaata caggcattgc gctggcgatg	240	
	atcggagcgg tcaaggacta caaggtggaa attgttatga gtgaagccgt atcgatcgaa	300	
	aggcgcaaga tgatacaggc attcggcgcg aaggtcatcc tgaccgatcc ggaatttgga	360	
	acggacggtg ctattcttaa agtacgcaag ttgctggagc aatatccgga tgcgtatttc	420	
	tgcacagatc agttcacgaa taagtacaat aaactcgccc atagtgaaat tactgccgaa	480	
	gagatctggt tccaaacgaa tggcagagtt gattatttcg ttccagggtt gggaacatcg	540	
	ggaaccttga tgggggttg tgccggcctg aaaaagtaca atcctaaaat aaaaatcatc	600	
	agtgcggaac cggttgcgg gcattatatt cagggtctga aaaatcttca ggaagcgatt	660	
	gttccgggca ttataatga agctgaactg gatgaaatta ttatgatcga aactgaggaa	720	
	gccttcgaga tggcccgta gattgtccgc aaggaaggga tctttgtcgg catgagcagt	780	
	ggtgcgtcca tgtaggagc ggttaaaatt gcccgcaagc ttcttcagg tgtaattgtt	840	
	actatttttc ctgatcgtgg agaaaaatat ttaagcacgg atctcttcaa gtctgaggca	900	
15	ggtgatggaa aattaggacg gatggaggca gacagatttt gccgcaata caataa	957	
	<210> 10		
	<211> 945		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Dal-OPSS		
25	<400> 10		

atgaaagcta atattctgga agccattggc gaaacgcctt tggtagcaat caatcgttta	60
cataccaatc cacaggttac cctggctgta aagctggagg gcaacaatcc gggcggaagt	120
gttaaggacc ggattgccta ctacatgctg cgaaaagctg aagaaaaagg tgaactgacc	180
aaaaataaaa ttatcctgga gccaccagc ggcaacaccg gcatcggcct ggccatggct	240
gcctcgggtga tgggctatcg cctgggtggtg accatgtctg aaaagatgag cagtgcgcga	300
cgcaaatgc tggaggtgtt tggcgccgaa ttagtactga ctccaggcga gttgggcacc	360
gatgggtgcc ttatgaaggc ccgggaaatg atagccaagg acccgaccg ctactatatg	420
cctaaccaat ttgccaatga aaacaactat atggtacact atgaaacaac cgctgaagaa	480
atctggcgac aaaccgataa taaggtaaca cactttgtgg ccggtatggg gaccaccggc	540
acattaatgg ggcgttctag acgcctcaaa gaactgaatc ccgacattaa gattatcggc	600
gtagagcctt atatgaacca taaaatccag ggactcaaga acatggaaga ggccattaaa	660
ccggccatat atgattccaa acgactggat gaaaaataa atgtcagcga tgaagatgct	720
tttgaaatgg ccttcctgtc caccgggaa gaaggaaatc ttgccggaat ttctgcagga	780
gcagccatgc atgcagcaat cagtgtggcc aataaactca cctcaggctt tgtggttggc	840
attattccag accgcggtga taagtatatg tccacgatt tattctgtgc tgaacgttgc	900
aaaaggcgca gaccgactg cctgttgacg gagaatctct tttaa	945

<210> 11

5 <211> 957

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Uso de codones optimizado para Dac-OPSS

<400> 11

atgatctgcg acaacatcct gaaaaccatc tgcaacaccc cgatgatccg tatcaaccgt	60
ctgaaccoga acccgaacgt tgaaatctac gctaaattcg aaggtaccaa cccgggtggt	120
tctatcaaag accgtatcgc tctgaaaatg atcgaacagg ctgaagctga aggtgttctg	180
aaccgtaaaa aaaccatcat cgaagctacc tctggtaaca ccggtatcgc tctggctatg	240
atcgggtgctg ttaaagacta caaagttgaa atcgttatgt ctgaagctgt ttctatcgaa	300
cgtcgtaaaa tgatccaggc tttcgggtgct aaagttatcc tgaccgaccc ggaattcggc	360
accgacggtg ctatcctgaa agttcgtaaa ctgctggaac agtaccgga ccgttacttc	420
tgcaccgacc agttcaccaa caaatacaac aaactggctc actctgaaat caccgctgaa	480
gaaatctggt tocagaccaa cggctcgtgtt gactacttcg tttctggtct gggtaacctc	540
ggtaacctga tgggtgttgg tgctggtctg aaaaaatata acccgaaaat caaaatcatc	600
tctgctgaac cggttgctgg tcaactacatc cagggctctga aaaacctgca ggaagctatc	660
gttccgggta tctacaacga agctgaactg gacgaaatca tcatgatcga aaccgaagaa	720
gctttcgaaa tggtcgtca gatcgttcgt aaagaaggta tcttcgttgg tatgtcttct	780
ggtgcttcta tgctgggtgc tgttaaaatc gctcgtaaac tgtcttctgg tgttatcgtt	840
accatcttcc cggacogtgg tgaaaaatac ctgtctaccg acctgttcaa atctgaagct	900
ggtgacggta aactgggtcg tatggaagct gaccgtttct gccgtaaata caaataa	957

<210> 12
 <211> 945
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Uso de codones optimizado para Dal-OPSS
 10 <400> 12

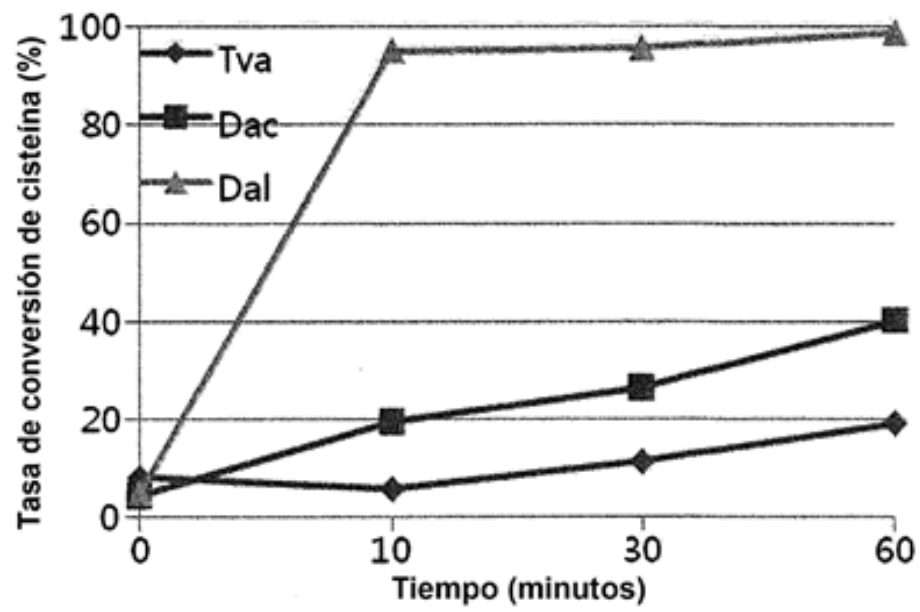
atgaaagcta acatcctgga agctatcggc gaaaccccg cggttcgtat caaccgtctg	60
cacaccaacc cgcaggttac cctggctggt aaactggaag gtaacaaccc ggggtggtct	120
gttaaagacc gtatcgttta ctacatgctg cgtaaagctg aagaaaaagg tgaactgacc	180

aaaaacaaaa tcatacctgga accgacctct ggtaacacog gtatcgggtct ggctatggct	240
gcttctgtta tgggttacog tctggttggt accatgtctg aaaaaatgtc ttctgaacgt	300
cgtaaaatgc tggaagtttt cgggtgctgaa ctggtttctga cccoggggtga actgggtacc	360
gacggtgcta tcatgaaagc tcgtgaaatg atcgctaaag acccggtacog ttactacatg	420
ccgaaccagt tcgctaacga aaacaactac atggttcact acgaaaccac cgctgaagaa	480
atctggcgtc agaccgacaa caaagttacc cacttcggtg ctggtatggg taccaccggt	540
accctgatgg gtgcttctcg tcgtctgaaa gaactgaacc cggacatcaa aatcatcggt	600
gttgaaccgt acatgaacca caaatccag ggtctgaaaa acatggaaga agctatcaaa	660
ccggctatct acgactctaa acgtctggac gaaaaaatca acgtttctga cgaagacgct	720
ttcgaaatgg ctttcggtct gaccogtgaa gaaggtatct tcgctggtat ctctgctggt	780
gctgctatgc acgctgctat ctctgttgct aacaaactga cctctggttt cgttggtgct	840
atcatcccg accgtggtga caaatacatg totacogacc tggtctgcgc tgaacgttgc	900
aaacgtcgtc gtcgggactg cctgctgacc gaaaacctgt totaa	945

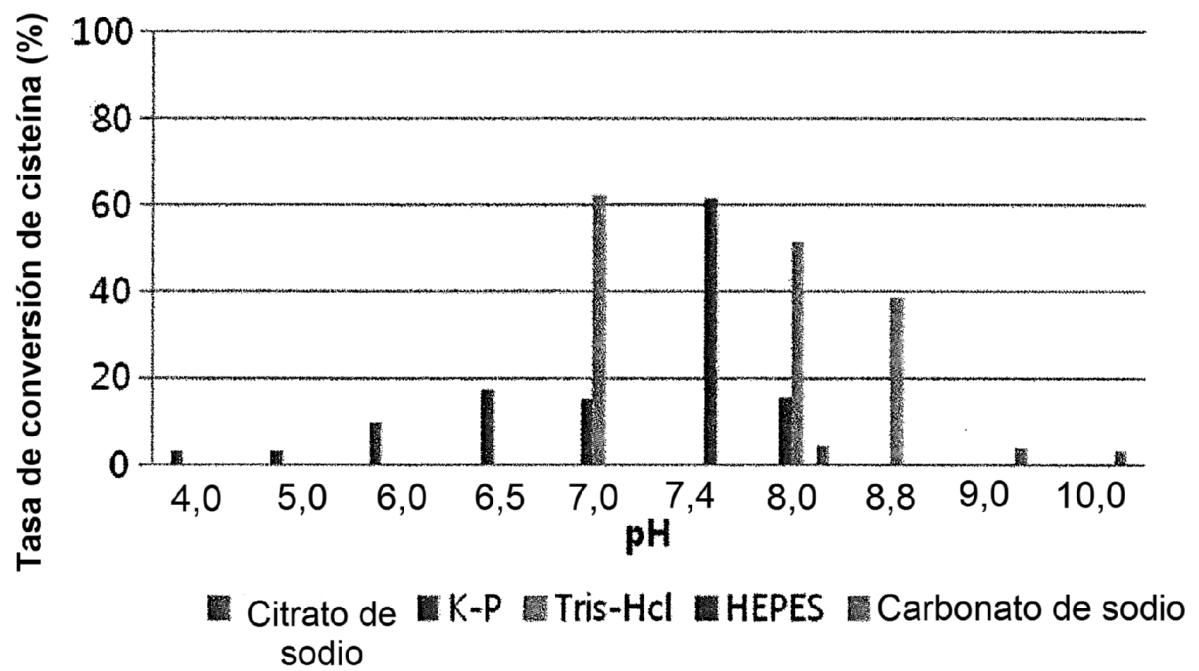
REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de cisteína o de derivados de la misma, que comprende la etapa de hacer reaccionar O-fosfoserina (OPS) como un sustrato con un sulfuro en presencia de O-fosfoserina sulhidrilasa (OPSS) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o 2, o de un microorganismo que la expresa, produciendo de este modo cisteína o los derivados de la misma, en el que dichos derivados se seleccionan del grupo que consiste en N-acetilcisteína (NAC) y S-carboximetilcisteína (SCMC).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la OPSS está codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 a 12.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la OPS es OPS purificada o un caldo de fermentación de un microorganismo que incluye OPS.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sulfuro se selecciona del grupo que consiste en Na₂S, H₂S, NaSH, (NH₄)₂S y S₂O₃.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sulfuro se añade a una concentración molar que es de 0,1 a 3 veces tan alta como la de la OPS añadida en la reacción.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que durante la reacción se añade adicionalmente un cofactor tal como piridoxal-5'-fosfato (PLP), de 0,001 a 2 mM o ditioneitol (DTT), de 0,001 a 100 mM.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente comprende la etapa de separar y purificar la cisteína o derivados de la misma.

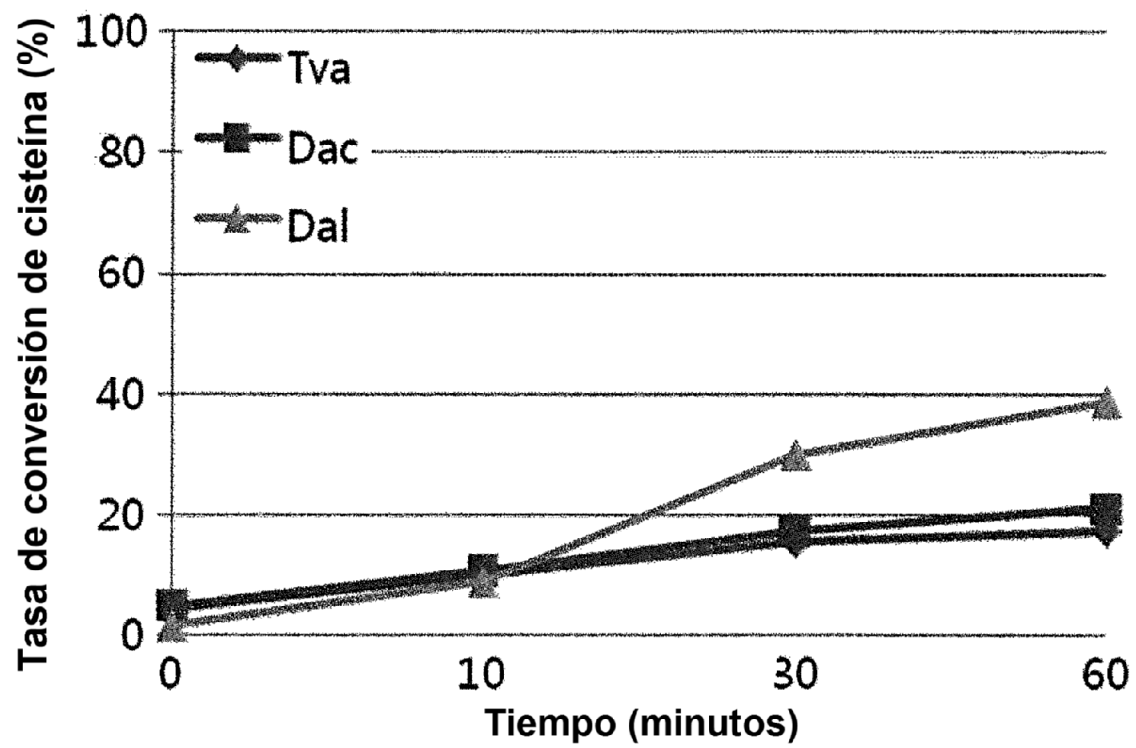
[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]



[Figura 4]

