

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 642**

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 14171034 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2796549**

54 Título: **Mutantes de O-fosfoserina sulfhidrilasas y procedimiento de producción de cisteína utilizando los mismos**

30 Prioridad:

20.10.2010 KR 20100102665

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

07.06.2018

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

Observaciones:

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

ES 2 671 642 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-fosfofoserina sulfhidrilasas y procedimiento de producción de cisteína utilizando los mismos

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un mutante de O-fosfofoserina sulfhidrilasa (al que se hace referencia también como "OPSS") que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de *Mycobacterium smegmatis* que se corresponde con la de SEQ ID NO: 1 excepto por la eliminación de los últimos tres a siete restos de aminoácido del extremo C. La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS, un vector de expresión que lleva la molécula de ácido nucleico, y un transformante transformado con el vector de expresión. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de cisteína haciendo reaccionar la O-fosfo-L-serina (OPS) con un sulfuro en presencia del mutante de OPSS.

Técnica antecedente

La L-cisteína es un aminoácido que tiene un papel importante en el metabolismo del azufre en todos los organismos vivos. Se utiliza en la biosíntesis de proteínas, tal como la queratina capilar, glutatión, biotina, metionina, y otros metabolitos que contienen azufre, así también sirve como precursor de la coenzima A. Además, se sabe que la biosíntesis de cisteína está asociada estrechamente con la biosíntesis de otros aminoácidos que incluyen L-serina, L-glicina, y L-metionina. Industrialmente, la L-cisteína y sus derivados tienen aplicaciones en una variedad de campos incluyendo la industria farmacéutica (para el tratamiento de enfermedades bronquiales), la industria cosmética (en champú capilar, composiciones para ondas permanentes, etc.), y la industria alimentaria (antioxidantes, potenciadores del sabor, aditivos de masa, etc.).

Tradicionalmente, la L-cisteína se obtenía industrialmente por hidrólisis ácida del pelo humano o las plumas de animales (Biotechnology of the Amino Acids Production editado por Ko Aida, p 217-223, 1986). Sin embargo, la producción de cisteína a partir del pelo o las plumas no solo asegura un rendimiento bajo del 7-8 %, sino que también el uso del ácido clorhídrico o ácido sulfúrico produce una cantidad significativa de desechos contaminantes para el medio ambiente. Además, los consumidores pueden tener una fuerte aversión a la extracción a partir de pelo o plumas. Estos problemas han causado un empuje en el desarrollo de procedimientos de producción de L-cisteína que respeten el medio ambiente, dando lugar a la fermentación de L-cisteína utilizando microorganismos.

Ente la producción microbiana de L-cisteína representativa es la conversión biológica de D, L-ATC utilizando un microorganismo (Ryu OH, Ju JY, y Shin CS, Process Biochem., 32:201-209, 1997). Este procedimiento de conversión, sin embargo, es difícil de aplicar de manera industrial debido a la baja solubilidad del precursor D, L-ATC. Otro procedimiento de producción de L-cisteína es la fermentación directa utilizando *E. coli* (Patente N.º EP 0885962B; Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). La acumulación excesiva de L-cisteína en el microorganismo da lugar a toxicidad intracelular, lo que da como resultado la producción de L-cisteína a altas concentraciones. Para superar este obstáculo, se emplearon proteínas que exportan L-cisteína, sin embargo no ha habido una mejoría significativa de la productividad.

En referencia a la ruta de biosíntesis de la L-cisteína en bacterias y plantas, la O-acetil-serina (OAS) actúa como un precursor intermedio proporcionando el armazón carbónico de la L-cisteína (Kredich NM y Tomkins GM, J. Biol. Chem., 241: 4955-4965, 1966). La enzima O-acetilserina sulfhidrilasa (OASS), que utiliza sulfuro de hidrógeno como donante de azufre, cataliza la conversión de O-acetilserina en S-sulfocisteína y finalmente en cisteína, liberando acetato. De manera alternativa, el SO₄ se puede reducir a tiosulfato para su uso como donante de azufre en la producción de cisteína (akamura T, Kon Y, Iwahashi H, y Eguchi Y, J. Bacteriol., 156: 656-662, 1983). La ruta de biosíntesis de cisteína mediante el uso de OAS utiliza las dos enzimas de serina acetiltransferasa (CysE), que cataliza la conversión de serina en OAS, y la cisteína sintasa (CysK), que cataliza la conversión de OAS en cisteína. De manera notable entre ellas la serina acetiltransferasa (CysE) es altamente sensible a la inhibición por retroalimentación por el producto cisteína final (Wada M y Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006). Por lo tanto, es necesaria una enzima que no sea sensible a la inhibición por retroalimentación, sin embargo, es difícil de desarrollar.

Divulgación

[Problema técnico]

Lo que da lugar a la presente invención, la investigación intensa y exhaustiva en la producción de L-cisteína con alto rendimiento que llevaron a cabo los presentes inventores que tenía como objetivo superar los problemas encontrados en la técnica anterior, dio como resultado el hallazgo de que existe una O-fosfofoserina sulfhidrilasa (OPSS) en *Aeropyrum permix*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Trichomonas vaginalis* que toman una ruta específica de O-fosfo-L-serina (OPS), mejor que 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 en cisteína con las enzimas adicionales mec⁺ y cysO, pueden utilizar el Na₂S como donante de azufre en la conversión de OPS en

cisteína incluso en ausencia de enzimas adicionales cuando se han retirado cinco aminoácidos del extremo C de las mismas (Agren D, Schnell R y Schneider G, FEBS letters, 583: 330-336 2009).

La secuencia de la cisteína sintasa (Cys11) de *Mycobacterium smegmatis* de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 se conocía por la base de datos UniProt (nº de acceso A0R1X2).

5 **[Solución técnica]**

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un mutante de la o-fosfoserina sulfhidrilasa (a la que también se hace referencia como "OPSS") que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de *Mycobacterium smegmatis* que se corresponde con la de SEQ ID NO: 1 excepto por la eliminación de los últimos tres a siete restos de aminoácido del extremo C.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un vector de expresión que lleva la molécula de ácido nucleico.

15 Un objetivo adicional más de la presente invención es proporcionar un transformante transformado con el vector de expresión.

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

[Efectos ventajosos]

20 Como se ha descrito anteriormente, el mutante de OPSS con la actividad enzimática mejorada que es esencial para la conversión enzimática de O-fosfoserina en L-cisteína se puede utilizar para producir L-cisteína a partir de OPS a gran escala con un alto rendimiento de una manera simple.

[Descripción de los dibujos]

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la actividad de OPSS según la temperatura.

La FIG. 2 es un conjunto de gráficos que muestra la sensibilidad de la OPSS al pH.

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

La FIG. 4 es un gráfico que muestra la actividad enzimática de OPSS para convertir un caldo de fermentación con OPS purificado en cisteína.

30 La FIG. 5 es un gráfico que muestra la actividad enzimática de la OPSS para convertir un caldo de fermentación con OPS en cisteína.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la producción de OPS y cisteína que se convierte mediante la OPSS utilizando OPS como sustrato a escala de una jarra de 1 l.

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

35 **[Mejor modo]**

De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención proporciona un mutante de OPSS derivado de *Mycobacterium smegmatis* con la misma secuencia de aminoácidos que la de SEQ ID NO: 1, con la excepción de que carece de 3 a 7 restos de aminoácidos del extremo C de la secuencia de aminoácidos de la O-fosfoserina sulfhidrilasa de tipo silvestre.

40 En una realización de la presente divulgación, el mutante de OPSS de la presente invención puede tener una de las tres secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El mutante de OPSS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 puede modificarse adicionalmente para que tenga una sustitución del resto de prolina (Pro) de la posición 77 por un resto de serina (Ser). Además, el mutante de OPSS que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 puede modificarse adicionalmente para que tenga una sustitución del resto treonina (Thr) en la

45 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) de la posición 238 por un resto de serina (Ser). Además, se desvelan en el presente documento las secuencias de aminoácidos que comparten una homología de al menos un 50 %, preferentemente un 60 %, 70 %, 75 %, y 80 %, más preferentemente del 85 %, 90 % y 95 %, y más preferentemente del 97 % al 99 % con los mutantes mencionados anteriormente.

50 La expresión "*Mycobacterium smegmatis*" se refiere a una cepa con forma de bacilo del filum Actinobacteria que es fino, recto o ligeramente curvado, tiene ramas irregulares, y se pueden teñir con el colorante básico anilina. En la presente invención, se descubrió que cuando esta secuencia de aminoácidos se modificaba, la O-fosfoserina sulfhidrilasa derivada de la cepa podía catalizar la biosíntesis de L-cisteína con un aumento de rendimiento.

Como se utiliza en el presente documento "O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS)" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de OPS en cisteína. La enzima se encontró por primera vez en *Aeropyrum pernix* y se le puso el nombre (Mino K e Ishikawa K, FEBS letters, 551: 133-138, 2003, SEQ ID NO: 6).

Se pueden utilizar distintos procedimientos bien conocidos para obtener OPSS. Ejemplos ilustrativos de los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, técnicas de síntesis genética basadas en optimización del codón por las que se pueden obtener las enzimas de interés con alto rendimiento, y procedimientos de exploración bioinformática de fuentes de enzimas útiles basados en los almacenamientos masivos de información genética de microorganismos. En una realización de la presente invención, las enzimas OPSS que utilizan la OPS como sustrato para sintetizar cisteína se seleccionaban de entre distintos microbios. A este respecto, los aglomerados obtenidos utilizando un medio y condiciones de cultivo adecuados conocidos en la técnica se lisaron, seguido por purificación del sobrenadante que contiene la enzima para conseguir la enzima OPSS.

Como se utiliza en el presente documento, el término "mutante" se refiere a un cultivo o un individuo que muestra una alteración estable del fenotipo heredable o no heredable. Cuando se utiliza en conjunción con OPSS (O-fosfoserina sulfhidrilasa), el término "mutante" quiere significar una enzima OPSS que está alterada genéticamente de manera que su actividad se puede mejorar eficazmente en comparación con el tipo silvestre.

Basándose en el informe de que el mutante de OPSS derivado del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con cinco restos de aminoácidos del extremo C eliminados mostraba un aumento de afinidad por una fuente de azufre que contenía un grupo S^{2-} incluso en ausencia de enzimas adicionales, se preparó un mutante de OPSS eliminando cinco restos de aminoácidos del extremo C de la OPSS de *Mycobacterium smegmatis*. El mutante de OPSS de acuerdo con la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos derivada de *Mycobacterium smegmatis* que se corresponde con la SEQ ID NO: 1 en la que se han eliminado de tres a siete, preferentemente cinco, restos de aminoácidos del extremo C.

En una realización de la presente divulgación, se observó que el mutante que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 presentaba una tasa de conversión del 100 % en una hora después de aplicarse a la conversión de OPS en cisteína (Tabla 5).

La sustitución de aminoácidos puede aumentar adicionalmente la actividad enzimática del mutante de OPSS de la presente invención. A condición de que sea bien conocido en la técnica, se puede utilizar cualquier procedimiento para mejorar la enzima. En la presente divulgación, preferentemente, se empleó mutagénesis aleatoria para obtener una mejora de la actividad enzimática del mutante de OPSS. En detalle, después de permitir que la OPSS se sometiera a mutagénesis aleatoria, se seleccionaron los mutantes con actividad enzimática mejorada utilizando el sistema de exploración desarrollado basándose en HTS (exploración de alto rendimiento) por los presentes inventores. Como resultado, se obtuvieron los mutantes de OPSS, Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3, que tenían una actividad enzimática mejorada llevando a cabo la exploración HTS en un gen Msm-T. La Msm-T-HA2 es un mutante de OPSS que tiene la misma secuencia de SEQ ID NO: 2, con la excepción de que el resto prolina (Pro) de la posición 77 se sustituyó con un resto de serina (Ser). La Msm-T-EP3 es un mutante de OPSS que tiene los mismos restos de aminoácidos que la SEQ ID NO: 2, con la excepción de que la mutación de sustitución se produce con un resto de alanina (A) para el resto de treonina (Thr) de la posición 131, con un resto de asparagina (Asp) para el resto lisina (Lys) de la posición 137, y con un resto de serina (Ser) para el resto de treonina (Thr) en la posición 238. También se desvelan en el presente documento los mutantes de OPSS Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3 que tienen secuencias de aminoácidos representados por las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

En una realización de la presente divulgación, se descubrió que tanto Msm-T-HA2 como Msm-T-EP3 presentaban una actividad enzimática mayor que la de Msm-T que tiene los restos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (Tablas 5 y 6). En detalle, se midió que los mutantes de OPSS Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3 que presentaban tasas de conversión con un aumento de 5 veces y 1,2 veces en un estadio temprano de la reacción de conversión, en comparación con la Msm-T de control. Además, incluso cuando se utilizaba la Msm-T-HA2 mutante cuya actividad de síntesis de cisteína es 4 veces mayor que la de la enzima Msm-T y en una cantidad que correspondía a un 40 % de la Msm-T, la tasa de conversión en cisteína era similar.

El término "homología", como se utiliza en el presente documento, quiere referirse al porcentaje de identidad entre dos polipéptidos. La correspondencia entre una secuencia y la otra se pueden determinar por técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar la homología por comparación directa de la información de secuencia entre las dos moléculas polipeptídicas alineando la información de secuencia y utilizando programas de computadora fácilmente disponibles. De manera alternativa, la homología se puede determinar por hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre las regiones homólogas, seguido por la digestión con una nucleasa específica de cadena única, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "homólogo" y todas sus formas gramaticales y variaciones se refiere a la relación entre proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo las proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de las inmunoglobulinas) y las proteínas homólogas de diferentes especies (por ejemplo, la cadena ligera de miosina, etc.). Dichas proteínas (y sus genes codificantes) tienen una homología de secuencia, 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”, se puede referir a una similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen evolutivo común.

Como se utiliza 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 ácido nucleico 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 un 21 % (preferentemente al menos aproximadamente un 50 %, y más preferentemente aproximadamente un 75 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, o 99 %) de los aminoácidos coinciden durante una longitud definida de las secuencias de aminoácidos. Las secuencias que son sustancialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias utilizando un software convencional disponible en los bancos de datos de secuencias o en un experimento de hibridación de Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas como se defina para el sistema en particular. Las condiciones de hibridación definidas están en el ámbito de la técnica (por ejemplo, Sambrook y col., 1989, *infra*).

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

Un ensayo para la actividad enzimática de OPSS que cataliza la síntesis de cisteína transfiriendo un grupo tiol al sustrato con OPS se desveló junto con la nomenclatura de Ape-OPSS (Ape-O-fosfoserina sulfhidrilasa). Particularmente, debido a que la Ape-OPSS tiene la actividad de convertir OAS en cisteína transfiriendo un grupo TIOL, el ensayo se basa en la medición de la actividad de la enzima de síntesis 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, se añade PLP que proporciona un grupo tiol para la OAS (O-acetilserina) u OPS, que sirve como cofactor de OASS u OPSS en la conversión en cisteína a una concentración de 0,2 mM. También se añade DTT no solo para evitar la oxidación de la cisteína expuesta al aire en cisteína, sino también para cuantificar la cantidad de cisteína oxidada, gracias a su poder reductor. Preferentemente, cuando se añaden 25 mM de DTT o 0,2 Mm de PLP, la conversión en cisteína aumentaba unas 2,3 veces. Es decir, PLP y DTT tienen una influencia positiva en la conversión de OPS en cisteína.

Las enzimas Ape-OPSS, Mtb-OPSS, y Mtb-R tienen una temperatura de reacción óptima de 60 °C o 37 °C, con un pH óptimo de 7,4, como se había informado 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, se pueden optimizar las condiciones de 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 pueden crecer incluso a altas temperaturas, muestra una actividad enzimática más alta a 60 °C que a 37 °C. También, la estabilidad a alta temperatura de la propia enzima da lugar a una temperatura óptima de 60 °C. Por otro lado, la Msm-R muestra una actividad enzimática óptima a 37 °C y es vulnerable al tratamiento por calor a 60 °C. Se descubrió que las enzimas OPSS mantienen la actividad de conversión en un intervalo de pH de desde 6,0 a 10,0. La actividad enzimática óptima se detectó a un pH 7,4 en Ape-OPSS y un pH de 8,0 a 9,0 en Msm-T. Por lo tanto, la Msm-T es estable en un intervalo más amplio de pH que la 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 utiliza en el presente documento, la expresión “molécula de ácido nucleico” pretende englobar moléculas de ADN y ARN. Los nucleótidos, que constituyen las unidades estructurales de las moléculas de ácido nucleico, incluyen no solamente los nucleótidos de origen natural, sino análogos modificados en un resto de azúcar o un resto de base (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New 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 lleva la molécula de ácido nucleico.

Un “vector” se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico dentro de una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que se ha unido otro segmento de ADN de manera que dé lugar a la replicación del segmento unido. Un “replicón” se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, un plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, se capaz de replicación bajo su propio control. El término “vector” incluye tanto vehículos víricos y no víricos para introducir el ácido nucleico en una célula y huésped *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. El término “vector” puede incluir también ADN minicirculares. Por ejemplo, el vector puede ser un plásmido sin secuencias de ADN bacteriano. La retirada de las secuencias de ADN bacteriano que son ricas en regiones CpG han demostrado que disminuyen el silenciamiento de expresión transgénica resulta en una expresión más persistente a partir de vectores de ADN

plasmídico (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” puede incluir también transposones tales como Sleeping Beauty (Izsvak y col. *J. Mol. Biol.* 302:93-102 (2000)), o cromosomas artificiales.

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

En una realización de la presente invención, se empleó un sistema de expresión que utiliza un promotor CJ1, desarrollado por los presentes inventores, para la expresión de 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 T7 y el sistema CJ1 que comprende un promotor CJ1 se compararon dando las mismas condiciones. Como resultado el sistema CJ1 presentaba un nivel de expresión más alto de OPSS que el sistema pET (FIG. 3). Además, la sobreexpresión de OPSS necesitaba una temperatura baja (18 °C) y un largo periodo de tiempo en el sistema pET, pero una alta temperatura (37 °C) y un corto periodo de tiempo en el sistema CJ1. Por lo tanto, se prefiere utilizar el promotor CJ1 para obtener OPSS eficazmente, aunque la presente invención no se limita a este.

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

20 Como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” en todas sus formas gramaticales y variaciones se refiere a la alteración genética de una célula que resulta de la introducción de un gen ajeno en la célula huésped de manera que el gen introducido se pueda replicar por sí mismo o como un factor incorporado en el cromosoma.

El vector de la presente invención se puede introducir en células huésped por técnicas convencionales adecuadas conocidas en la técnica, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a electroporación, co-precipitación en fosfato cálcico, infección retroviral, microinyección, DEAE-dextrano, y calcio catiónico en liposomas.

25 La expresión “célula transformada con un vector recombinante”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula huésped que tiene anclado un vector recombinante en la misma que lleva un gen de interés. La célula huésped adecuada para su uso en la presente invención puede ser procariota o eucariota. Ejemplos incluyen, bacterias enterobacterias y corineformes, con preferencia por *Escherichia* spp. y *Serratia* spp., teniendo la mayor preferencia por la *E. coli*.

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

35 El mutante de la presente invención se puede aplicar a la producción en masa de cisteína. Cuando se utiliza el transformante que expresa el mutante, la producción en masa de cisteína se puede conseguir en condiciones de cultivo óptimas que se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, el procedimiento de producción en masa de cisteína comprende el cultivo de los transformantes en condiciones óptimas que son bien conocidas en la técnica.

40 Para su uso como sustrato, la OPS tiene que estar en forma pura o puede estar en forma de un cultivo de fermentación que contienen OPS. La OPS pura puede estar disponible en el mercado, como se identifica en el N.º de catálogo P0878 de Sigma-Aldrich o CAS407-41-0 de Wako. Sin embargo, el cultivo que contiene OPS que se obtiene por fermentación microbiana tiene ventajas económicas sobre la OPS pura disponible en el mercado ya que el cultivo que contiene OPS se puede utilizar sin purificación adicional y el cofactor PLP necesario para la conversión se puede obtener en el cultivo fermentado.

Se puede utilizar cualquier compuesto de azufre en la presente invención, a condición de que se pueda convertir en un grupo tiol (SH). Preferentemente, se puede utilizar Na₂S, H₂S, o S₂O₃, sea en forma de líquido o gas.

45 En una realización de la presente invención, se utilizó Na₂S como fuente de azufre. El Na₂S se puede añadir a una concentración molar de 0,1 a 3 veces tan alta como la de OPS utilizada en la conversión enzimática. En detalle, la Msm-T-HA2, que tiene una tasa de conversión en cisteína del 80 % que es equivalente a la de la Msm-T, se utiliza a una concentración de 50 µg/ml en condiciones de reacción que comprenden caldo de fermentación con 50 mM de OPS y caldo de fermentación con 60 mM de OPS purificada, 100 o 120 mM de Na₂S, y 0,2 mM de PLP.

50 Será evidente y fácilmente entendible por los expertos en la técnica que el procedimiento de conversión enzimática se puede optimizar y aumentar de escala con enzimas altamente activas. En una realización, cuando se incuban 19,317 g/l de caldo de fermentación con OPS en presencia de 50 mg de Msm-T-HA2, se produjo cisteína a una concentración de hasta 9,075 g/l. En una jarra de 1 l, se convirtió OPS en cisteína con una tasa del 71,83 % en presencia del mutante (FIG. 6).

Abreviaturas y terminología

Para explicar mejor la presente invención y para instruir a los técnicos en la técnica para llevar a cabo la presente invención, se da una descripción de las siguientes palabras y procedimientos. A menos de que el contexto necesite otra cosa, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras “comprende”, “comprendiendo”, y similares se consideran en un sentido incluyente en oposición a un sentido excluyente o exhaustivo, esto quiere decir, en el sentido de “que incluye, pero no se limita a”. Los términos singulares de “un”, “una” y “el” incluyen las referencias en plural a menos de que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión “que comprende una célula” significa “que incluye una célula o una pluralidad de dichas células, pero no se limita a estas”.

Cuando se utiliza en referencia a una lista de dos o más artículos, la palabra “o” cubre todas las siguientes interpretaciones de la palabra: cualquiera de los artículos de la lista, todos los artículos en la lista, y cualquier combinación de artículos en la lista. A menos de que se establezca otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entienden los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Se desvelan posteriormente los procedimientos y materiales pertinentes, 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 posteriormente serán evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

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

Modo de la invención

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

Ejemplo 1: Desarrollo de OPSS

Se ha informado que *Aeropyrum pernix*, *Mycobacterium tuberculosis*, y *Trichomonas vaginalis* tienen OPSS, una enzima que utiliza la OPS, en vez de la OAS de *E. coli*, como 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 de *Aeropyrum pernix* y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Entre ellas, la enzima OPSS derivada del *Mycobacterium tuberculosis* se utilizó para explorar la homología de aminoácidos. Como resultado, se aseguraron tres mutantes de OPSS, Msm-OPSS, Rjo-OPSS y Nfa-OPSS de *Mycobacterium smegmatis* cepa 155, *Rhodococcus jostii* RHA1, y *Nocardia farcinica* IFM 10152, respectivamente.

Para obtener la OPSS de cada cepa, se construyó un sistema de vector pET28a (Novagen), que se utiliza normalmente para la expresión enzimática. Cada una de las matrices y cebadores para su uso en la clonación de las cinco enzimas OPS sulfhidrilasa diferentes y los plásmidos recombinantes resultantes se resumen en la Tabla 1, posterior. Las combinaciones adecuadas de matriz y los cebadores, como se dan en la Tabla 1, se utilizaron para la PCR para la amplificación de cada uno de los genes de OPSS. Los productos de la PCR y el vector pET28a se digirieron con NdeI e HindIII (a 37 °C durante 3 horas). Cada uno de los fragmentos genéticos se ligaron al vector pET28a digerido (Novagen). La secuenciación de bases confirmó la construcción de los vectores de expresión que llevaban cada uno de los genes OPSS. Los vectores de expresión enzimática se introdujeron en *E. coli* (DE3) para producir cepas capaces de expresar las enzimas OPSS. Los nombres de las enzimas se dan en la Tabla 1, posteriormente.

[Tabla 1]

Enzima	Vector	Matriz	Cebador
Ape-OPSS	pET28a-Ape-OPSS	ADN sintético	SEQ ID NO: 7 y 8
Mtb-OPSS	pET28a-Mtb-OPSS	ADN genómico de Mtb	SEQ ID NO: 9 y 10
Msm-OPSS	pET28a-Msm-OPSS	ADN genómico de Msm	SEQ ID NO: 11 y 12
Rjo-OPSS	pET28a-Rjo-OPSS	ADN genómico de Rjo	SEQ ID NO: 13 y 14
Nfa-OPSS	pET28a-Nfa-OPSS	ADN genómico de Nfa	SEQ ID NO: 15 y 16

La expresión de las enzimas se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante del sistema pET (Novagen). Las colonias únicas de cada cepa de las placas LB se inocularon en 5 ml de caldo LB y se incubaron a 37 °C durante 16 horas mientras se agitaba a 200 rpm. Los cultivos se transfirieron a 25 ml de caldo LB reciente (en matraces de 250 ml) y se incubaron hasta una DO₆₀₀ de 0,5 ~ 0,6 (durante 2 ~ 3 horas) en las mismas condiciones,

inmediatamente después de lo cual se añadió 1 mM de IPTG al medio para inducir que se expresaran las enzimas durante la incubación a 18 °C durante 18 horas mientras se agitaba a 120 rpm. Las enzimas se purificaron utilizando columnas Ni-NTA por marcador His, con la ayuda de His SpinTrap (GE Healthcare). De las cinco enzimas OPSS aisladas, se encontró que cuatro eran en forma soluble, siendo una (Rjo-OPSS) un cuerpo de inclusión según se analizó por electroforesis en un 14 % SDS-PAGE.

Ejemplo 2: Ensayo de OPSS respecto a la actividad de síntesis de cisteína

Las cuatro enzimas OPSS obtenidas por distintas cepas de microorganismos se ensayaron en cuanto a la capacidad para catalizar la conversión de la OPS en cisteína. Con respecto a las condiciones de ensayo y procedimientos (ensayo enzimático cysM), se hizo 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). La cantidad de sustrato utilizada está representada por una unidad en ml. Las condiciones de ensayo para la actividad enzimática se resumen en la Tabla 2, a continuación.

[Tabla 2]

Sol. de materia prima	Conc. Final	Blanco	OPS sulfhidrilasa
Enzima 6xHis		-	40 (50 mg)
1 M HEPES (pH 7, 4)	100 mM HEPES	100	100
0,5 M Na ₂ S	10 mM Na ₂ S	20	20
10 mM PLP	0,2 mM PLP	20	20
100 mM OPS	5 mM OPS	0	50
AD		790	750
Total		1000	1000

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. En los momentos predeterminados durante la incubación a 37 °C, se tomaron 100 ml de las reacciones enzimáticas y se mezclaron con 100 ml de 33,2 % de TCA 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 Gaitonde. Las actividades de síntesis de cisteína de las cuatro enzimas OPS sulfhidrilasas diferentes se resumen en la Tabla 3, posteriormente. Los títulos de síntesis de cisteína de las enzimas OPSS se expresan como las tasas de conversión en cisteína en el tiempo de reacción.

[Tabla 3]

	Tasa de conversión en 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

Como se puede ver en la Tabla 3, se confirmó que las enzimas OPSS derivadas de *Aeropyrum pernix* y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tenían la actividad de utilización de la OPS como sustrato para sintetizar cisteína. La actividad de síntesis de cisteína de la nueva OPSS derivada de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155, que se obtuvo explorando la homología de aminoácidos con la enzima Mtb-OPSS, se encontró primero. Por otra parte, la nueva OPSS derivada de *Nocardia farcinica* IFM 10152, obtenida por la exploración de homología, presentaba una actividad insuficiente para convertir la O-fosfoserina en cisteína.

Como se ve en los datos de la Tabla 3, la tasa de conversión a partir de OPS en cisteína de la Ape-OPSS alcanzaba cerca del 100 % en una hora.

La tasa de conversión de la enzima Msm-OPSS, que se seleccionó recientemente mediante la exploración

enzimática basándose en la OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv expuesta previamente, era del 43,7 % que es 4,3 veces mayor que la de Mtb-OPSS.

Ejemplo 3: Preparación de Mtb-T y Msm-T, mutantes con 5 restos de aminoácido del extremo C de Mtb-OPSS y Msm-OPSS

La OPSS derivada de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb-OPSS), que cataliza la conversión de OPS en cisteína con la ayuda de las enzimas adicionales mec⁺ y cysO, es capaz de utilizar una fuente de azufre que contiene S²⁻ en la conversión de OPS en cisteína incluso en ausencia de las enzimas adicionales cuando se retiraban de la misma cinco restos de aminoácido del extremo C. Basándose en este hecho, se obtuvo la Mtb-T (SEQ ID NO: 24), que puede convertir rápidamente la OPS en presencia de S²⁻ como fuente de azufre. A partir de la Msm-OPSS que comparte una alta homología de aminoácidos con la Mtb-OPSS, se obtuvo también la Msm-T eliminado 5 restos de aminoácido del extremo C. Los vectores de expresión que llevaban los dos mutantes enzimáticos se construyeron. A este respecto, se llevó a cabo una PCR pfu sobre el ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155 en presencia de cada uno de los pares de cebadores de SEQ ID NO: 17 y 18 y SEQ ID NO: 19 y 20. Los fragmentos genéticos de OPSS así obtenidos se trataron con NdeI e HindIII y se clonaron en el vector pET28a digerido con las mismas enzimas de restricción para construir los vectores de expresión recombinante llamados pET28a-Mtb-T y pET28a-Msm-T, respectivamente. Los vectores de expresión recombinantes se introdujeron en *E. coli* (DE3). La expresión de los dos mutantes de OPSS obtenidas en las mismas condiciones como en el Ejemplo 1 se confirmó por un 14 % de SDS-PAGE. Como resultado se obtuvieron Mtb-T (SEQ ID NO: 5) y Msm-T (SEQ ID NO: 2).

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

Las Mtb-T y Msm-T, obtenidas anteriormente, se evaluaron respecto a la actividad enzimática midiendo las tasas de conversión en cisteína finales. La actividad enzimática se ensayó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La cisteína convertida se analizó cuantitativamente utilizando el procedimiento de Gaitonde y los resultados se resumen en la Tabla 4, a continuación.

[Tabla 4]

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

Como se ve en la Tabla 4, la Msm-T mutante permitía la conversión en cisteína a partir del sustrato con una tasa del 100 % en una hora.

Ejemplo 5: Ensayo de actividad de síntesis de cisteína de Los mutantes derivados de Msm-T, Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3

Basándose en la Msm-T, que puede convertir la OPS en cisteína con una tasa del 100 %, se obtuvieron dos enzimas mutantes con actividad mejorada utilizando un procedimiento enzimático evolutivo, y se llamaron Msm-T-HA2 (SEQ ID NO: 25) y Msm-T-EP3 (SEQ ID NO: 26). Se introdujeron mutagénesis aleatorias utilizando el tratamiento con hidroxilamina y un kit de PCR tendente a error (kit de mutagénesis aleatoria de diversidad de PCR. Clontech) en la Msm-T para construir una biblioteca de Msm-T mutantes que se exploraron entonces para seleccionar los mutantes de OPSS con una actividad enzimática mejorada.

Se descubrió que los mutantes de OPSS Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3, que se obtienen por exploración HTS sobre un gen Msm-T, tenían secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, según se analizaron por secuenciación de bases.

Las Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3 mutantes y la Msm-T de control se ensayaron respecto a la actividad enzimática y los resultados se resumen en las Tablas 5 y 6. El ensayo de actividad enzimática se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 2.

[Tabla 5]

	Tasa de conversión en cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
Msm-T	20,3	54,6	100

	Tasa de conversión en cisteína (%)		
	10 min	30 min	60 min
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 (mmoles)/min/mg)	14,96	44,82	16,72

5 Como se puede ver en las Tablas 5 y 6, los mutantes de OPSS Msm-T-HA2 y Msm-T-EP3, que se obtienen por el procedimiento evolutivo, se midió que presentaban tasas de conversión aumentadas 5 veces y 1,2 veces, respectivamente, a los 10 minutos después del inicio de la reacción, en comparación con la Msm-T de control. También, se compararon en términos de actividad específica (concentración de producto/tiempo/cantidad de enzima), que se utiliza ampliamente en la determinación de la actividad enzimática. La actividad específica de Msm-T-HA2 aumentaba tres veces en comparación con la Msm-T de control, indicando que el mutante de OPSS esta
10 mejorada en actividad enzimática, con una capacidad de sintetizar cisteína en cantidades mayores por tiempo por unidad de enzima.

Ejemplo 6: Necesidad de un cofactor para la actividad de OPSS

15 Para examinar el efecto de los cofactores en la conversión en cisteína de las OPSS, se midió la tasa de conversión en cisteína de Msm-T en ausencia o presencia de PLP y DTT. A este respecto, se hicieron reaccionar los sustratos de 50 mM de caldo con OPS y 100 mM de Na₂S a 37 °C durante 30 min en presencia de 25 mM de DTT o 0,2 mM de PLP. La cisteína así producida se analizó cuantitativamente utilizando el procedimiento Gaitonde. Los resultados se resumen en la Tabla 7, a continuación.

[Tabla 7]

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

20 Como se ve en la Tabla 7, la tasa de conversión en cisteína en presencia de PLP y DTT era 2,3 veces mayor que en ausencia de PLP y DTT. Por lo tanto, se observó que tanto PLP como DTT tenían una influencia positiva sobre la conversión.

Ejemplo 7: Actividad de OPSS por la temperatura

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

30 En condiciones de tampón, como se muestra en la FIG. 1, la Ape-OPSS demostraba una tasa de reacción inicial más rápida a 37 °C así como una mayor reactividad a 60 °C que la Msm-T.

Ejemplo 8: Estabilidad con calor de las OPSS

35 Se analizaron las Ape-OPSS y Msm-T en cuanto a la estabilidad con calor. Cada una de las enzimas se diluyó hasta una concentración de 2 mg/ml en un caldo con OPS y se sometieron a tratamiento térmico a 37 °C y 60 °C durante 10, 30, 60, 120 y 240 min, seguido por la reacción a 37 °C durante 30 min en condiciones de 5 mM de OPS, 10 mM de Na₂S, 0,2 mM de PLP, y 100 mM de HEPES (pH 7,4). Para esta reacción, se emplearon 10 µg/ml de Ape-OPSS y 50 µg/ml de Msm-T. Las cantidades de cisteína producida se midieron utilizando el procedimiento Gaitonde y se

resumen en la Tabla 8, a continuación.

[Tabla 8]

	Actividad relativa (%)					
Tiempo de calentamiento (min)	(-)	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

- 5 A pesar del tratamiento con calor a 60 °C durante 4 horas, como se ve en la Tabla 8, se observó que la Ape-OPSS mantenía su actividad intacta mientras que la actividad de Msm-T se mantenía a 37 °C, pero disminuía un 50 % con el tratamiento por calor a 60 °C durante 30 min.

- 10 Se hizo un examen sobre la retención de la actividad enzimática a 37 °C cuando se utilizó la Msm-T en una cantidad de 50 µg/ml, que es una concentración práctica en el caldo con OPS. En ausencia de Na₂S, se trataron 50 µg/ml de Msm-T, junto con 50 mM de caldo con OPS y 0,2 mM de PLP a 37 °C durante 0,5, 1, 2, 4, y 6 horas, tras lo cual se añadió Na₂S para inducir la reacción enzimática. Después de la reacción durante 30 min, se midió la actividad de la Msm-T. Las cantidades de cisteína producida se determinó utilizando el procedimiento de Gaitonde y se dan en la Tabla 9, a continuación.

[Tabla 9]

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

- 15 Como se puede ver en la Tabla 9, la actividad de Msm-T disminuía por debajo del 50 % dos horas después de la reacción a 37 °C en caldo con OPS.

Ejemplo 9: Sensibilidad de OPSS al pH

- 20 Se midieron las tasas de conversión en cisteína de Ape-OPSS y Msm-T de acuerdo con el pH. En 100 mM de tampón, se sometieron las Ape-OPSS y Msm-T, teniendo cada una, una concentración de 50 µg/ml, a una reacción a 37 °C durante 10 min. A este respecto, se utilizaron un tampón fosfato k 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 de carbonato Na con un pH de 8,0/8,5/9,0/10,0. Se llevó a cabo el análisis cuantitativo de la cisteína producida utilizando el procedimiento Gaitonde. Los resultados se resumen en la FIG. 2.

- 25 Como se ve en la FIG. 2, la Msm-T presentaba la mayor actividad a un pH de desde 8,0 a 9,0 independientemente del tampón. Para la Ape-OPSS, su mayor actividad se detectó en fosfato K (pH 7,4), con un pH óptimo que diferenciaba un tampón de otro.

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

- 30 Se examinaron los efectos de los iones sobre la actividad de las enzimas OPSS de la siguiente manera. En una mezcla de reacción que contenía 5 mM de OPS, 10 mM de Na₂S, 0,2 mM de PLP, y 100 mM de HEPES (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]. Se utilizaron Ape-OPSS y Msm-T a una concentración de 10 µg/ml, respectivamente. Las cantidades de cisteína producida se determinaron utilizando el procedimiento de Gaitonde 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

	Actividad relativa (%)	
NH ₄ Cl	Ape-OPSS	Msm-T
1	49,11	67,11
2	27,72	47,12

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

Ejemplo 11: Efecto de la fuente de azufre en la actividad de síntesis de cisteína de la OPSS

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

Ejemplo 12: Construcción de un vector de expresión que lleva OPSS (sistema Pcl-Pcj1) y expresión de la enzima

Se llevó a cabo una PCR utilizando cebadores de SEQ ID NO: 21 y 22, sirviendo el vector pET28a-Msm-T como matriz. El producto de la PCR que se obtiene de esta manera se trató con EcoRV e HindIII, y se clonó para construir un vector recombinante llamado pCL-P(CJ1)-Msm-T (pCJ1-MsmT CysM, FIG. 7). Para examinar una diferencia en el nivel de expresión de Msm-T entre el sistema pET y el sistema PCL-Pcj1, se prepararon las cepas para la expresión de la enzima. El sistema pET se introdujo en *Rosetta* (DE3) mientras que el sistema pCL-Pcj1 empleaba la cepa K12G. Las colonias únicas escogidas de las placas LB se inocularon en 5 ml de caldo LB y se cultivaron a 37 °C durante 16 horas mientras se agitaba a 200 rpm. Estos cultivos se transfirieron a 25 ml de caldo LB reciente que contenía kanamicina y espectinomicina y un 0,2 % de glucosa (en matraces de 250 ml) y es incubaron hasta una DO600 de 0,5-0,6, inmediatamente después de lo cual se añadió 1 mM de IPTG al medio para inducir que se expresaran las enzimas. Durante la incubación a 37 °C mientras se agitaba a 200 rpm, se midieron los niveles de expresión de la enzima en distintos momentos del cultivo (8, 16, 24 horas). Los niveles de expresión enzimática de los dos sistemas se analizaron en un 14 % de SDS-PAGE y se muestran en la FIG. 3.

En las mismas condiciones, como se ve en la FIG. 3, el sistema pCL-Pcj1 asegura un nivel de expresión más alto de la enzima que el sistema pET. Además, hay una mejora en las condiciones del cultivo debido a una temperatura tan alta como de 37 °C y una concentración de IPTG tan baja como de 0,1 mM que permitía al sistema expresar la enzima. Por lo tanto, el sistema pCL-Pcj1 puede funcionar suficientemente en sustitución del pET.

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

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

Como se ve en la FIG. 4, un caldo de fermentación de OPS purificada servía bien como sustrato para la conversión enzimática en cisteína. Particularmente, la tasa de conversión en cisteína de Ape-OPSS aumentaba a 70 °C incluso al utilizar el caldo de fermentación de OPS purificada.

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

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

Como se ve en la FIG. 5, la mayor tasa de conversión se detectó con 50 µg/ml de Msm-T. Además, al utilizar el caldo de fermentación con OPS como sustrato, la actividad de Msm-T era mayor que la de Ape-OPSS.

Ejemplo 15: Tasa de conversión en cisteína de acuerdo con la concentración de OPSS

A un caldo de OPS que contenía OPS a una concentración de 9,76 g/l, se añadió Na₂S en una cantidad dos veces mayor que el número molar de OPS, seguido por la incubación a 37 °C durante 5 min. A continuación, se añadió Msm-T purificado en una cantidad de 50 mg mientras que se utilizaba Msm-T-HA2 en una cantidad de 5 µg, 10 µg, 20 µg, y 50 µg. En momentos 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 parar la reacción enzimática. Las concentraciones de cisteína de las reacciones enzimáticas se analizaron cuantitativamente midiendo la absorbancia a una DO560 de acuerdo con el procedimiento Gaitonde. Las actividades de síntesis de cisteína de las enzimas OPSS de acuerdo con las concentraciones enzimáticas se resumen en la Tabla 12, a continuación.

[Tabla 12]

Tasa de conversión en 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 se ve en la Tabla 12, incluso cuando la Msm-T-HA2 mutante cuya actividad de síntesis de cisteína se había mejorado y se utilizaba en una cantidad correspondiente a un 40 % de la de Msm-T, la tasa de conversión en cisteína (%) final era similar. Además, cuando se utilizaban en la misma cantidad, la Msm-T-HA2 mutante presentaba una actividad de reacción inicial más rápida en comparación con la Msm-T.

Ejemplo 16: Tasa de conversión en cisteína por concentraciones de OPS

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

[Tabla 13]

Tasa de conversión en 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 en 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

Tasa de conversión en cisteína (OPS medida 36,09 g/l)						
Msm-T-HA2 20 ug	0	2,33	12,04	27,57	77,65	80,01

[Tabla 15]

Tasa de conversión en 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

5 Cuando la concentración de OPS era aproximadamente 30 g/l, como se ve en las Tablas 13 a 15, las mayores tasas de conversión que se detectaron eran del 100 % para Msm-T y del 80 % para Msm-T-HA2. Se descubrió que cuando la concentración de OPS excedía 50 g/l, la tasa de conversión y el porcentaje de conversión disminuían.

Los datos de las Tablas 13 a 15 se utilizaron para seleccionar una relación de concentración óptima entre OPS y Msm-T-HA2 para un procedimiento de conversión utilizando una alta concentración de OPS, y para reducir el tiempo de reacción de Msm-T-HA2 en comparación con la de Msm-T.

10 Ejemplo 17: Tasa de conversión en cisteína por las concentraciones de Na₂S

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

[Tabla 16]

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

20 Como se ve en la Tabla 16, la tasa de conversión en cisteína tenía un pico cuando el número molar de Na₂S era dos veces mayor que el de la OPS utilizada. A partir de los resultados, se entiende que una condición óptima se fija cuando la relación molar de Na₂S respecto a OPS es de 2.

Ejemplo 18: Tasa de conversión en cisteína por el pH

Para examinar el efecto de pH en la conversión enzimática de OPS en cisteína, se llevó a cabo una reacción de conversión en presencia de 20 µg de Msm-T-HA2 a distintos valores de pH. Los resultados se resumen en la tabla 17, a continuación.

[Tabla 17]

Tasa de conversión en 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

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

Ejemplo 19: Procedimiento de conversión a escala de una jarra de 1 l

El procedimiento de reacción para convertir un caldo con OPS en cisteína se escaló hasta una jarra de 1 l. Basándose en las características de OPSS y el conjunto de datos de la reacción de conversión en condiciones de un tubo de 1 ml, se estableció un procedimiento de reacción de conversión para Msm-T-HA2.

Precediendo la reacción de conversión en una escala de una jarra de 1 l, el caldo de fermentación con OPS obtenido en una jarra 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 retirar las células. Se añadieron 72 g de Na₂S al caldo con OPS filtrado (19,317 g/l), seguido filtrando el precipitado a través de un papel de filtro Whatman (6 µm). Después de la adición de 10 mM de PLP, la mezcla de reacción se pre-incubó a 37 °C durante 5 min, mientras se agitaba a 200 rpm. Finalmente, se llevó a cabo una reacción de conversión en presencia de 50 mg de Msm-T-HA2 en una escala de una jarra 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 mezcló con 100 µl de TCA al 33,2 % para detener la reacción enzimática. Las muestras que se tomaron se diluyeron en HCl 1 N y se analizaron en cuanto a los contenidos en cisteína y cistina utilizando LC. También, se utilizó el procedimiento Gaitonde para determinar la cantidad de cisteína. La concentración de los sustratos y las enzimas utilizadas en el procedimiento de reacción de conversión se resumen en la Tabla 18, a continuación. La cantidad de los sustratos utilizados se representan por una unidad de ml.

[Tabla 18]

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

Las concentraciones de cisteína en la mezcla de reacción obtenida después de la reacción de conversión que se lleva a cabo en las condiciones de la Tabla 18 se analizaron cuantitativamente por el procedimiento Gaitonde y LC, y los resultados se muestran en la FIG. 6. Cuando se incubó el caldo con OPS a 19,317 g/l se incubó durante 2 horas en presencia de 50 mg de Msm-T-HA2, como se ve en la FIG. 6, la cantidad de cisteína o cistina producida tenía un pico de hasta 9,075 g/l, indicando que la cisteína y cistina se puede producir a partir de OPS a una tasa del 71,83 % mediante un procedimiento de conversión enzimática a escala de una jarra de 1 l.

[Tabla 19]

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

[Tabla 20]

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

Aplicabilidad industrial

Como se describe en el presente documento, los mutantes de OPSS de la presente invención puede ser útil para la producción en masa de L-cisteína, cuyos y de cuyos derivados pueden encontrar aplicaciones en una variedad de campos incluyendo la industria farmacéutica (para el tratamiento de enfermedades bronquiales), la industria cosmética (en champús capilares, composiciones para ondas permanentes, etc.), y la industria alimentaria (antioxidantes, potenciadores del sabor, aditivos de masa, etc.).

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> MUTANTES DE O-FOSFOSERINA SULFHIDRILASAS Y PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE CISTEÍNA UTILIZANDO LAS MISMAS

<130> T3049 EP/1 S3

<150> KR10-2010-0102665

<151> 20-10-2010

<150> EP 11 18 5853.6

<151> 19-10-2011

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 323

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Msm-OPSS de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155

<400> 1

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	

ES 2 671 642 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Msm-T de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155

<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

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>

ES 2 671 642 T3

<223> Msm-T-HA2 de *Mycobacterium smegmatis* CC1

<400> 3

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

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

<400> 4

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 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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<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
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)

5

<400> 6

```

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

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
 385

5 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> cebador directo para Ape-OPSS de *Aeropyrum pernix* (ADN sintético)

 <400> 7
 gtcataatgat ggctctggct gacatctct 29

 15 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador inverso para Ape-OPSS de *Aeropyrum pernix* (ADN sintético)

 <400> 8
 gtaagctttt aaacagagtc accagcacc 29

 25 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> cebador directo para Mtb-OPSS *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

 <400> 9
 gtcataatgat gacacgatac gactcgctg 29

 35 <210> 10
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> cebador inverso para Mtb-OPSS de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

 <400> 10
 gtaagctttc atgccatag ttgcccttc 29
 45

5
 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para Msm-OPSS de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155
 <400> 11
 10 ataagcttc atgcccatag ctgccctc 29
 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para Msm-OPSS de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155
 20 <400> 12
 ataagcttc attccagcgc gtctcggc 29
 <210> 13
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para Rjo-OPSS de ADN sintético
 30 <400> 13
 gtcatatgat ggcgcgggtc gattcgctg 29
 <210> 14
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para Rjo-OPSS de ADN sintético
 40 <400> 14
 tagcgccgc tcatgccac aactgccctt c 31
 <210> 15
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador directo para Nfa-OPSS de ADN sintético
 <400> 15
 55 gtcatatgat ggcacgctac gaatcgctg 29
 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador inverso para Nfa-OPSS de ADN sintético
 <400> 16

gtaagctttc aggccagag ctggcctt 28

5 <210> 17
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador directo para Mtb-T de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

<400> 17
gtcatatgat gacacgatac gactcgctg 29

15 <210> 18
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador inverso para Mtb-T de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

<400> 18
gtaagctttc attccagagc ggtctcggc 29

25 <210> 19
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador directo para Msm-T, Msm-HA2, Msm-EP3 de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155

<400> 19
gtcatatgat gacgogctac gactccctg 29

35 <210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador inverso para Msm-T, Msm-HA2, Msm-EP3 de *Mycobacterium smegmatis* cepa MC2 155

45 <400> 20
ataagctttc attccagcgc gtcctcggc 29

50 <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

55 <400> 21
gatatgcag cagccatcat c 21

60 <210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

ES 2 671 642 T3

	<400> 22		
	cccaagcttt cattccagcg cgtcctcg	28	
5	<210> 23 <211> 972 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Msm-OPSS de <i>Mycobacterium smegmatis</i> cepa MC2 155		
	<400> 23		
	atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag	60	
	aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggct gtgggccaag	120	
	ctcgaggacc gcaacccgac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgatcgaa	180	
15	caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaacc caccagcggc	240	
	aacaccggca tctcgtctggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg	300	
	atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatccctg agctctacgg cgcgcgcctc	360	
	atcttcagcc ccgccgaggg cggctccaac accgcggtcg cgaccgcgaa agagcttgcc	420	
	gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccggccaa cagcgatgcg	480	
	cactacttcg gcaccggccc cgaactgctc gcggacctgc ccgagatcac ccacttcgtc	540	
	gcggggctcg gcaccaccgg gacctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcacgtt	600	
	cccgcgctgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc	660	
	aacatcgacg agggcttcat ccccgagttg tacgacgcgc acgtgctcac cacccggttc	720	
	tcggtgggct cgttcgacgc cgtgcgcgcg acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata	780	
	ttcgcgggca tctcgaccgg cgcggtgttg cacgcgcgcg tggggatggc cgccaaggcc	840	
	gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgccgg atggaagtat	900	
	ctgtcgaccg gcgcgtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaagggcag	960	
	ctatgggcat ga	972	
20	<210> 24 <211> 954 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Msm-T de <i>Mycobacterium smegmatis</i> cepa MC2 155		
	<400> 24		

ES 2 671 642 T3

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag	60
aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggct gtgggccaag	120
ctcgaggacc gcaaccgcac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgog gatgatcgaa	180
caggccgagc ggcacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaacc caccagcggc	240
aacaccggca tctcgtggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg	300
atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcac	360
atcttcagcc ccgcgaggg cggctccaac accgcggtcg cgaccgcgaa agagcttgcc	420
gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtaaggca acccggccaa cagcgatgcg	480
cactacttog gcaccggccc cgaactgctc ggcgacctgc ccgagatcac ccacttcgtc	540
gcggggctcg gcaccaccgg gacctgatg ggcaaccggac gtttcctgcg cgagcacgtt	600
cccggcgtgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc	660
aacatcgacg agggcttcat ccccgagttg tacgacgcgc acgtgctcac cacccggttc	720
tcggtgggct cgttcgacgc cgtgcgcgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata	780
ttcgcgggca totcgaccgg cgcggtgttg caccgcgcgc tggggatggc cgccaaggcc	840
gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgcgcg atggaagtat	900
ctgtcgaccg ggcggtacgc cggtagcctg gatgacgcgc aggacgcgcct ggaa	954

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

<220>
 <223> Msm-T-HA2 de *Mycobacterium smegmatis* CC1
 <400> 25

ES 2 671 642 T3

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag	60
aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggct gtgggccaag	120
ctcgaggacc gcaaccgac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgatcgaa	180
caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaatc caccagcggc	240
aacaccggca tctcgctggc catggcggcc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg	300
atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcac	360
atcttcagcc ccgcgaggc cggctccaac accgcggtcg cgaccgggaa agagcttgcc	420
gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccgccaa cagcgatgcg	480
cactacttcg gcaccggccc cgaactgctc gcggacctgc ccgagatcac ccacttcgtc	540
gcggggctcg gcaccaccgg gacctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcacgtt	600
cccggcgtgc agatcgtggc ggccgaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc	660
aacatcgacg agggcttcat ccccgagttg tacgacgccg acgtgctcac cacccggttc	720
tcggtgggct cgttcgacgc cgtgcgccgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata	780
ttcgcgggca tctcgaccgg cgcggtgttg cacgccgcgc tggggatggc cgccaaggcc	840
gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgccgg atggaagtat	900
ctgtcgaccg gcgcgtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaa	954

<210> 26

<211> 954

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 26

atgacgcgct acgactccct gctgcaggcc ctgggcaaca ccccgctggt gggcctgcag	60
aacctgtcgc cccggtggga cgacgaggac gggaaacccc acgtgcggct gtgggccaag	120

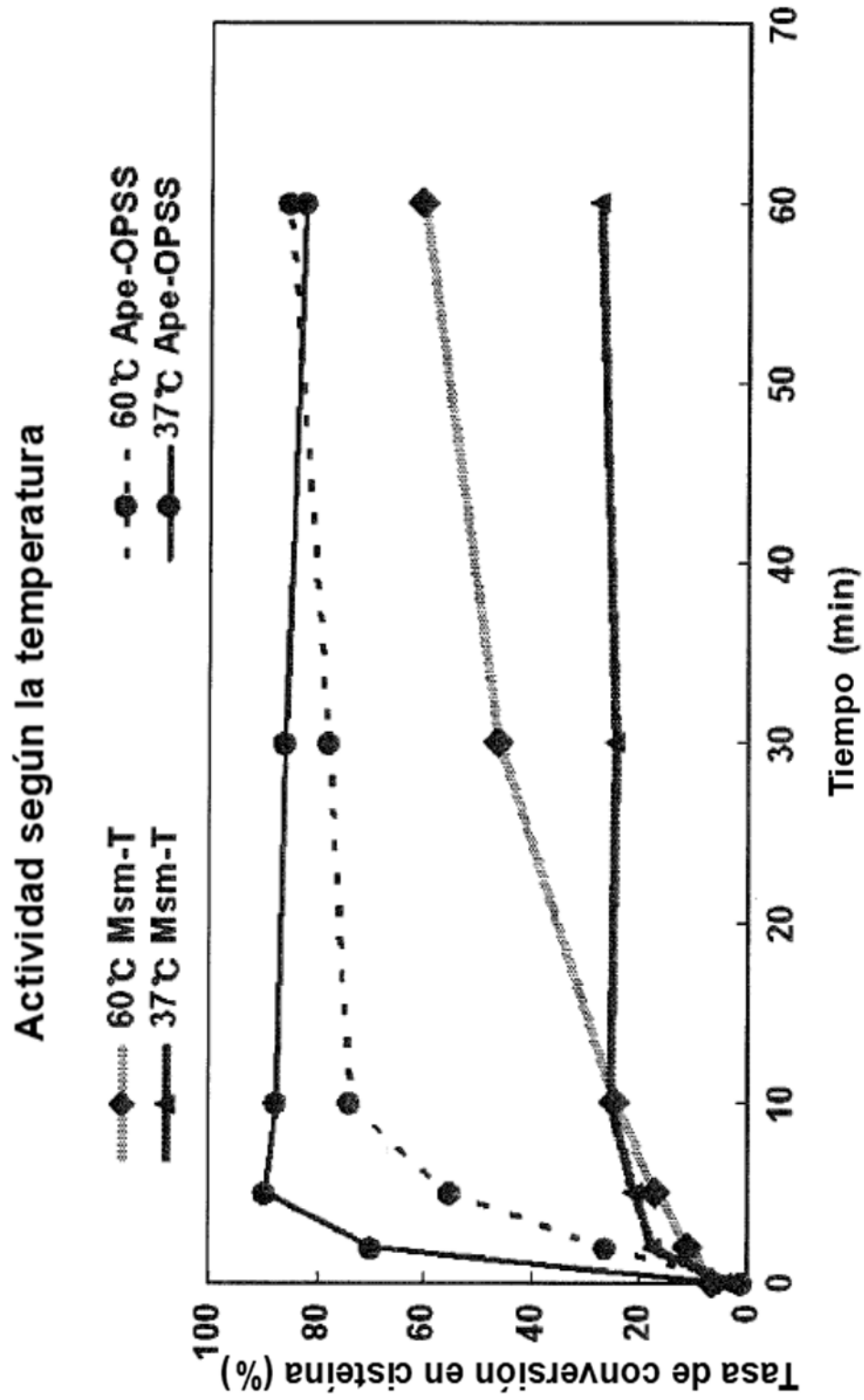
ES 2 671 642 T3

ctcgaggacc gcaacccgac cggttccatc aaggaccgcc ccgcgctgcg gatgatcgaa	180
caggccgagc gcgacgggct gctgcagccc ggcgccacga tcctggaacc caccagcggc	240
aacaccggca tctcgctggc catggcgccc ctgctcaagg gctacaacat gatctgcgtg	300
atgccggaga acacgtcgat cgaacggcgc cagatcctcg agctctacgg cgcgcgcac	360
atcttcagcc ccgccgaggc cggctccaac gccgcggtcg cgaccgcgaa tgagcttgcc	420
gcgcagaacc cgtcgtgggt catgctgtat cagtacggca acccggccaa cagcgatgcg	480
cactacttcg gcaccggccc cgaactgctc gcggacctgc ccgagatcac ccacttcgtc	540
gcggggctcg gcaccaccgg gacctgatg ggcaccggac gtttcctgcg cgagcacgtt	600
cccggcgtgc agatcgtggc ggcogaaccg cgttacggcg agggcgtgta cgcactgcgc	660
aacatcgacg agggcttcat ccccgagttg tacgacgccg acgtgctcac ctcccggttc	720
tcggtgggct cgttcgacgc cgtgogccgc acccgtgaac tcgtcacgcg cgagggcata	780
ttcgcgggca tctcgaccgg cgcgggtgtg cagcccgccg tggggatggc cgccaaggcc	840
gtcaaggccg gtgagcgtgc cgacatcgcg ttcgtcgtcg ccgacgccgg atggaagtat	900
ctgtcgaccg gcgcgtacgc cggtagcctg gatgacgccg aggacgcgct ggaa	954

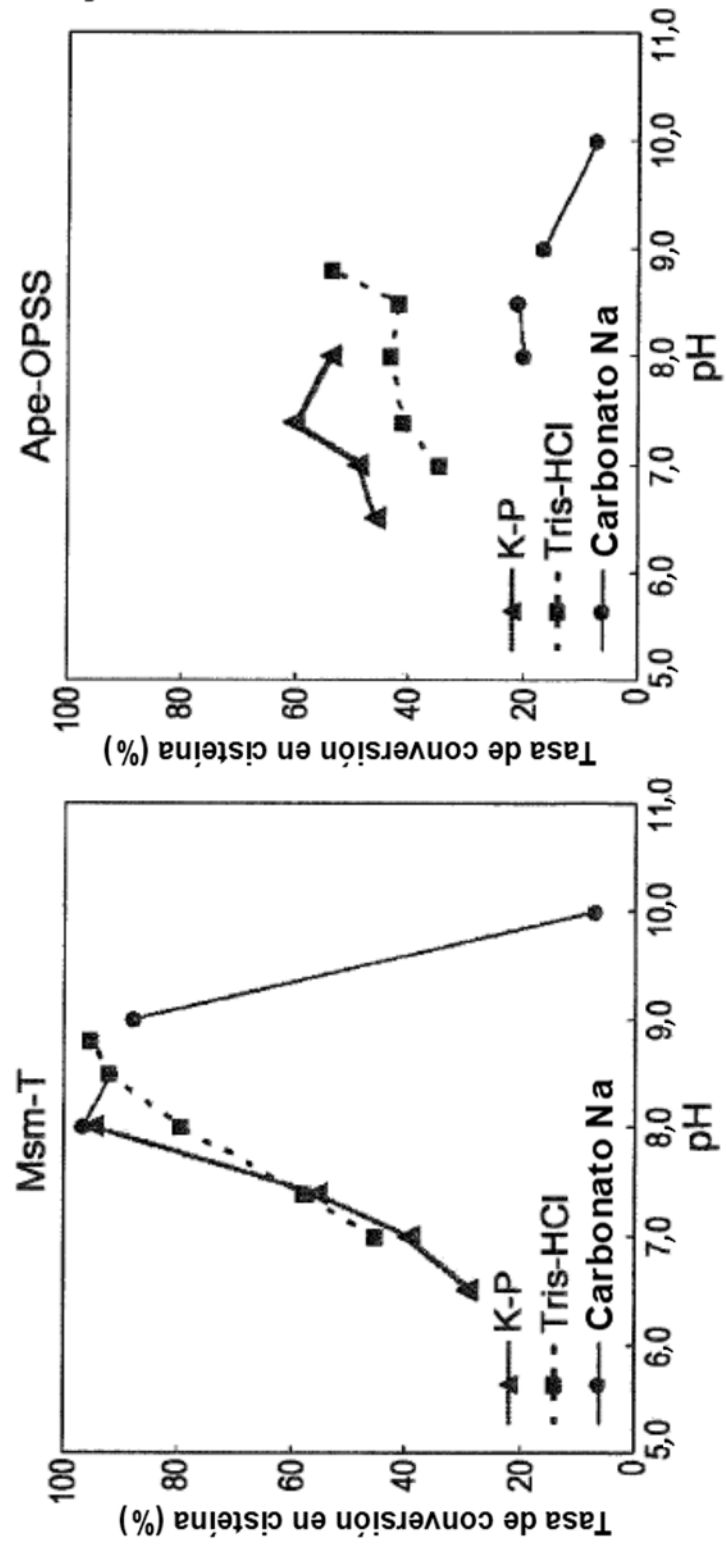
REIVINDICACIONES

1. Un mutante de O-fosfoserina sulfhidrilasa (OPSS) derivado de *Mycobacterium smegmatis*, que consiste en la misma secuencia de aminoácidos que la de SEQ ID NO: 1, excepto por la eliminación de los últimos tres a siete restos de aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de una OPSS de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1.
2. El mutante de OPSS derivado de *Mycobacterium smegmatis* de la reivindicación 1, que carece de los tres o siete restos de aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de una OPSS de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1.
3. El mutante de OPSS derivado de *Mycobacterium smegmatis* de la reivindicación 2, que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
4. El mutante de OPSS derivado de *Mycobacterium smegmatis* de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, que presenta una actividad óptima en condiciones que comprenden:
 - i) la adición de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 2 mM de PLP (fosfato-5' de piridoxal) o 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.
5. Una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un vector de expresión que lleva una molécula de ácido nucleico que codifica el mutante de OPSS de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Un transformante transformado con el vector de expresión de la reivindicación 6.
8. Un procedimiento de producción de cisteína que comprende hacer reaccionar la O-fosfo-L-serina (OPS) con sulfuros en presencia del mutante de OPSS de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.
9. El procedimiento de producción de cisteína de la reivindicación 8, en el que la OPS está en una forma purificada o en una forma de un cultivo de fermentación que contiene OPS.
10. El procedimiento de producción de cisteína de la reivindicación 8, que comprende un sulfuro seleccionado de entre el grupo que consiste en Na₂S, NaSH, (NH₄)₂SH, H₂S, y S₂O₃, estando todos en un estado gaseoso o líquido.
11. El procedimiento de producción de cisteína de la reivindicación 8, en el que el sulfuro se utiliza en una cantidad de 0,1 ~ 3 veces respecto a una concentración molar de OPS.
12. Uso del mutante de OPSS de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 en la biosíntesis de cisteína a partir de OPS.

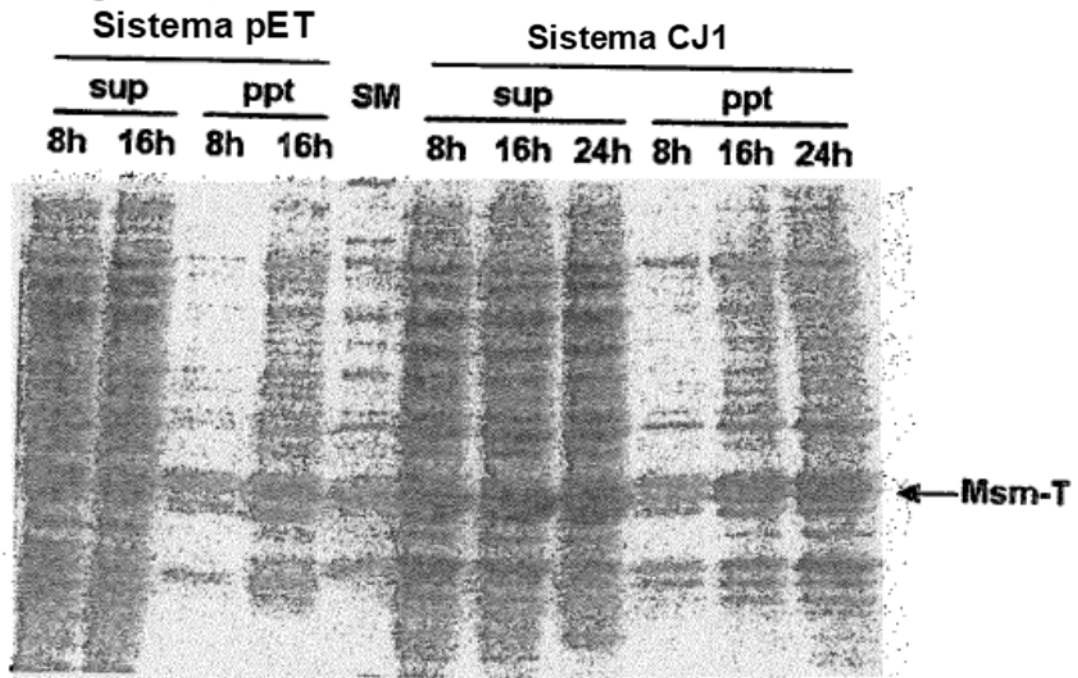
【Figural】



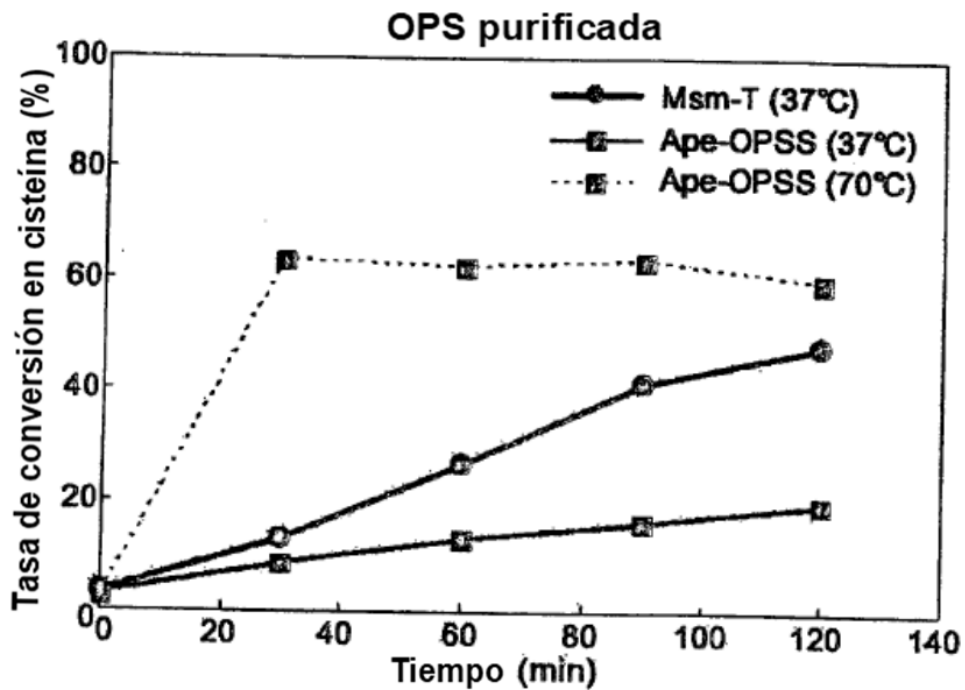
【Figura 2】



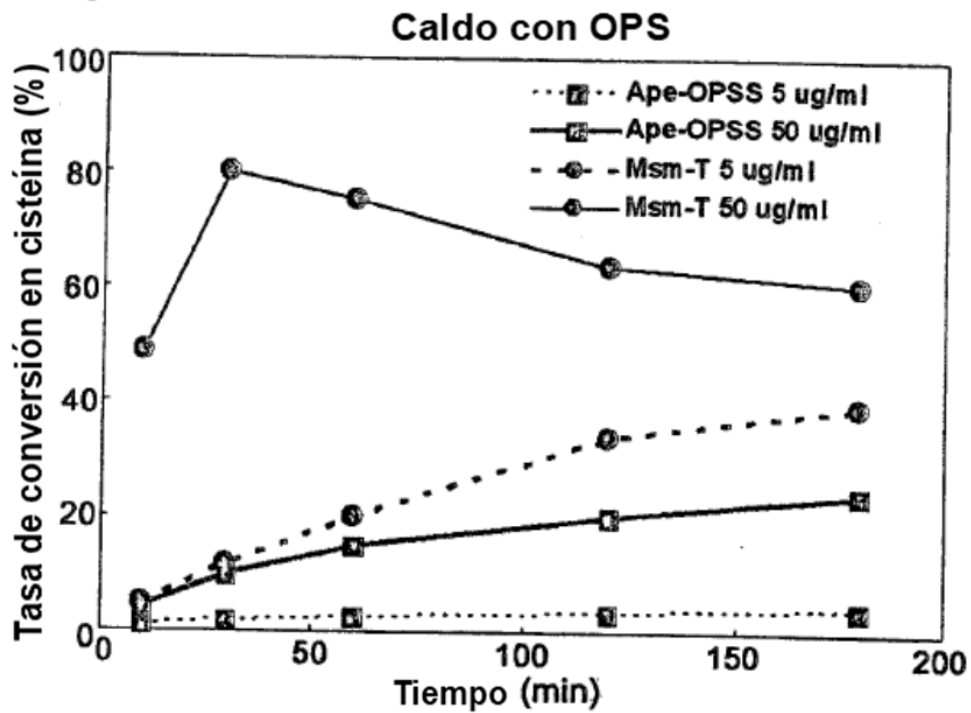
【Figura 3】

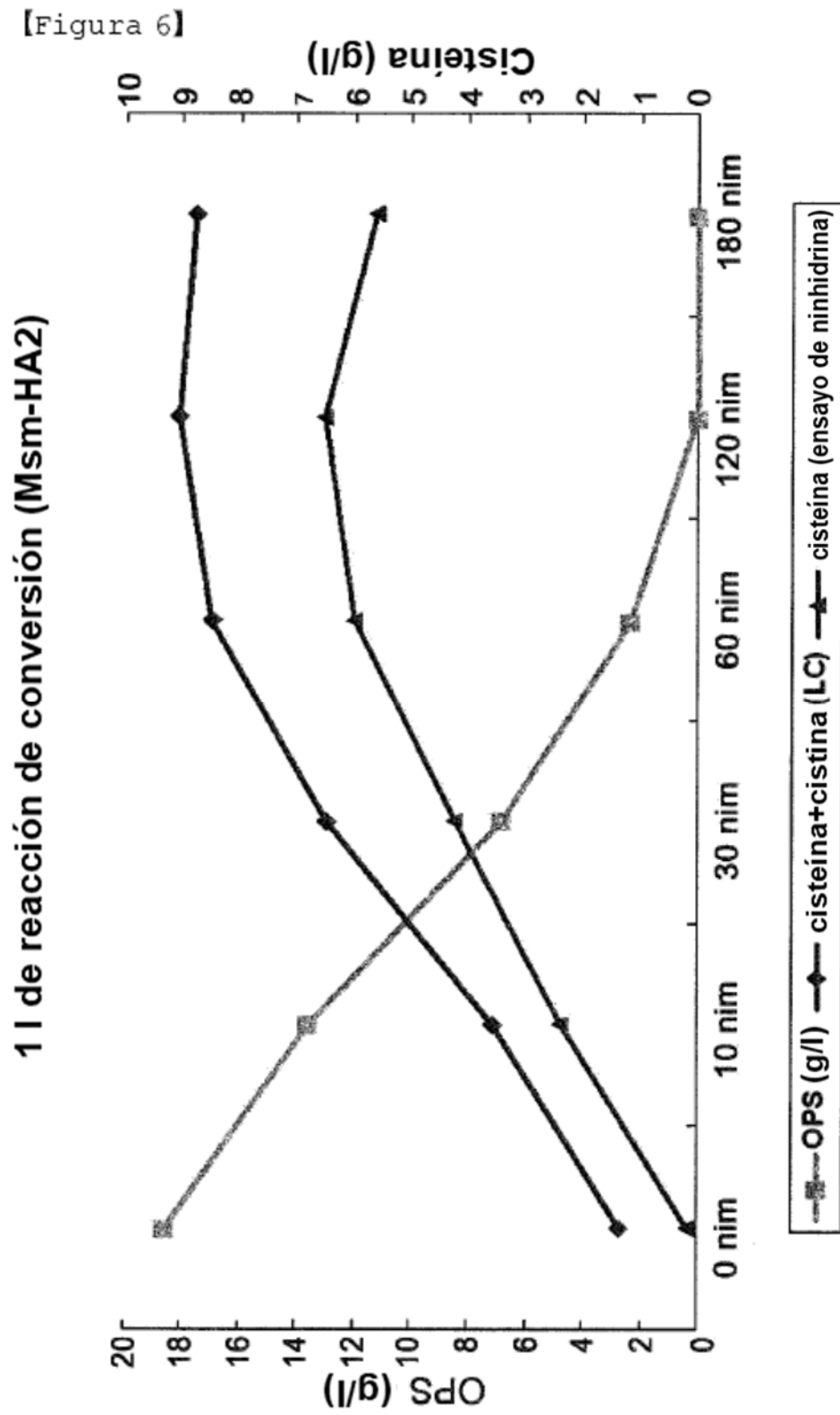


【Figura 4】



【Figura 5】





【Figura 7】

