

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 078**

51 Int. Cl.:

C09K 8/035 (2006.01)

C09K 8/582 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2015 PCT/US2015/062984**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16089765**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2015 E 15865509 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3227400**

54 Título: **Enzimas para eliminar compuestos sulfurosos en fluidos de fondo de pozo**

30 Prioridad:

04.12.2014 US 201414560762

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

28.08.2020

73 Titular/es:

**BAKER HUGHES, A GE COMPANY, LLC (100.0%)
17021 Aldine Westfield
Houston, TX 77073, US**

72 Inventor/es:

**DHULIPALA, PRASAD, D. y
ARMSTRONG, CHARLES, D.**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 781 078 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

Enzimas para eliminar compuestos sulfurosos en fluidos de fondo de pozo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones aditivas, composiciones de fluido y métodos para usar al menos una enzima cisteína sintasa en un fluido de fondo de pozo y, más específicamente, se refiere a la disminución o eliminación de sulfuro de hidrógeno usando al menos una enzima cisteína sintasa, tal como las derivadas de *Aeropyrum pernix*.

10 **Antecedentes**

La presencia de especies de azufre en los fluidos de hidrocarburos y las corrientes acuosas no es deseable por diversas razones. Los yacimientos subterráneos que se desarrollan actualmente tienen cantidades mayores de especies de azufre dentro de las corrientes de hidrocarburos producidas (petróleo y gas). El sulfuro de hidrógeno es un gas tóxico que pesa más que el aire y que es muy corrosivo para la maquinaria de superficie y de pozo.

Durante la combustión, las corrientes de hidrocarburos ricas en azufre también producen una fuerte contaminación ambiental. Cuando las corrientes ricas en azufre entran en contacto con metales, las especies de azufre provocan fragilidad en los aceros al carbono y agrietamiento de tensión por corrosión en materiales más altamente aleados. Además, los sulfuros de hidrógeno en varias corrientes de hidrocarburos o acuosas presentan un peligro para la seguridad y un peligro de corrosión. Sería deseable una rápida eliminación de estas especies odoríferas y medioambientalmente maliciosas, tanto en operaciones de plantas petrolíferas como de refinería.

Por las razones que se mencionan, se han intentado lavar, o transformar químicamente, las especies de azufre de los fluidos de hidrocarburos y de los sistemas acuosos. Hay disponibles varias clases de químicos, también conocidos como edulcorantes, para la eliminación de especies de azufre de una corriente de hidrocarburo o una acuosa, pero muchas de estas tienen serias limitaciones. Por ejemplo, en la industria, durante mucho tiempo ya, se han usado edulcorantes de sulfuro de hidrógeno que contienen nitrógeno, tales como aditivos basados en hidrotiazina. Sin embargo, las aminas que se liberan mientras se eliminan las especies de azufre suponen una amenaza general de corrosión en diversos procesos posteriores, incluyendo en columnas de destilación. El formaldehído es un edulcorante libre de nitrógeno, pero también es un agente cancerígeno potencial. El glioxal es otro edulcorante de sulfuro de hidrógeno libre de nitrógeno, pero su aplicación, frecuentemente, se limita debido a su corrosividad y bajo punto de ebullición. También se han propuesto óxidos metálicos, pero dichas aplicaciones son reducidas debido a los desafíos de manejo y a las cuestiones acerca de la formación residual de sólidos en los procesos y catalizadores de refinado posteriores. La acroleína es un edulcorante de sulfuro de hidrógeno/mercaptano limpio y extremadamente potente, pero requiere de un manejo especial debido a cuestiones de toxicidad.

Los compuestos que contienen azufre son perjudiciales en los pozos de los yacimientos subterráneos en los que residen. Los aditivos se pueden agregar a los fluidos de fondo de pozo para la circulación en el pozo del yacimiento. Los fluidos de fondo de pozo pueden ser, o incluir, fluidos de perforación, fluidos de finalización, fluidos de mantenimiento (p. ej., fluidos de fracturación), fluidos de producción, fluidos de inyección y combinaciones de los mismos. Los fluidos de perforación se clasifican, típicamente, según su fluido base. En los fluidos a base de agua, las partículas sólidas, tales como los agentes densificantes, se suspenden en una fase continua que consiste en agua o salmuera. El aceite puede emulsionarse en el agua, que es la fase continua. En la presente memoria se usa “fluido a base de agua” para incluir fluidos que tengan una fase continua acuosa, donde la fase continua acuosa puede ser toda agua o salmuera, una emulsión de aceite en agua, o una emulsión de aceite en salmuera. Los fluidos a base de salmuera, por supuesto, son fluidos a base de agua, en los cuales el componente acuoso es salmuera.

Los fluidos a base de aceite son lo opuesto o lo inverso de los fluidos a base de agua. En la presente memoria se usa “fluido a base de aceite” para incluir fluidos que tengan una fase continua no acuosa, donde la fase continua no acuosa sea toda aceite, un fluido no acuoso, una emulsión de agua en aceite, una emulsión de agua en fluido no acuoso, una emulsión de salmuera en aceite o una emulsión de salmuera en fluido no acuoso. En los fluidos a base de aceite, las partículas sólidas se suspenden en una fase continua que consiste en aceite u otro fluido no acuoso. El agua o la salmuera pueden emulsionarse en el aceite; por lo tanto, el aceite es la fase continua. En los fluidos a base de aceite, el aceite puede consistir en cualquier aceite o fluido inmiscible en agua que pueda incluir, pero sin limitarse a, diesel, aceite mineral, ésteres, cortes y mezclas de refinerías, o alfaolefinas. Los fluidos a base de aceite, como se definen en la presente memoria, también pueden incluir synthetic-based fluids or muds (fluidos o lodos de base sintética - SBMs), que se producen sintéticamente, en lugar de refinarse a partir de materiales de origen natural. Los fluidos de base sintética a menudo incluyen, pero no se limitan necesariamente a, oligómeros de olefina de etileno, ésteres elaborados a partir de ácidos y alcoholes grasos vegetales, éteres y poliéteres elaborados a partir de alcoholes y polialcoholes, hidrocarburos parafínicos o aromáticos alquilbencenos, terpenos y otros productos naturales, y mezclas de estos tipos.

Existe una variedad de funciones y características que se espera de los fluidos de terminación. El fluido de terminación se puede colocar en un pozo para facilitar las operaciones finales antes de iniciar la producción. Los fluidos de terminación son, típicamente, salmueras, tales como cloruros, bromuros y/o formiatos, pero pueden ser

- cualquier fluido no dañino que tenga características apropiadas de densidad y de flujo. Las sales adecuadas para formar las salmueras incluyen, pero no necesariamente se limitan a, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de zinc, cloruro de potasio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, bromuro de calcio, bromuro de zinc, formiato de sodio, formiato de potasio, formiato de amonio, formiato de cesio y mezclas de estos. Es clave la compatibilidad química del fluido de terminación con la formación de yacimiento y los fluidos de formación. Los aditivos químicos, tales como polímeros y surfactantes, se conocen en la técnica por introducirse en las salmueras que se usan en los fluidos de mantenimiento de pozos por diversas razones que incluyen, pero no se limitan a, aumentar la viscosidad y aumentar la densidad de la salmuera. Los fluidos de terminación no contienen sólidos suspendidos.
- 5 El fluido de producción es el fluido que fluye a partir de una formación hasta la superficie de un pozo petrolífero. Estos fluidos pueden incluir aceite, gas, agua, así como cualquier contaminante (p. ej., H_2S , asfaltenos, etc.). La consistencia y composición del fluido de producción puede variar.
- 10 Los fluidos de refinación son fluidos que pueden procesarse adicionalmente o refinarse en una refinación. Un ejemplo no limitativo de un proceso de refinación puede incluir reducir o prevenir la formación de ensuciadores. Ejemplos no limitativos de ensuciadores pueden ser, o incluir, hidratos, asfaltenos, coque, precursores de coque, naftenatos, partículas sólidas inorgánicas (p. ej., sulfatos, óxidos, incrustaciones y similares) y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de fluidos a refinar incluyen petróleo crudo, agua de producción y combinaciones de los mismos.
- 15 Los fluidos de mantenimiento, tales como los fluidos de corrección, fluidos de estimulación, fluidos de reacondicionamiento y similares, tienen varias funciones y características necesarias para la reparación de un pozo dañado. Tales fluidos se pueden usar para romper emulsiones ya formadas y para eliminar el daño de formación que pueda haber ocurrido durante las operaciones de perforación, terminación y/o producción. En la presente memoria los términos “operaciones correctoras” y “corregir” se definen para incluir una disminución del daño de la viscosidad del gel y/o la eliminación parcial o completa de daños de cualquier tipo de una formación subterránea. De forma similar, en la presente memoria el término “fluido de corrección” se define para incluir cualquier fluido que pueda ser útil en las operaciones correctoras. Una fluido de estimulación puede ser un fluido de tratamiento preparado para estimular, restaurar o mejorar la productividad de un pozo, tales como fluidos de fracturación y/o fluidos de estimulación de matriz, en un ejemplo no limitativo.
- 20 El fracturamiento hidráulico es un tipo de operación de estimulación que usa velocidad de bombeo y presión hidráulica para fracturar o agrietar una formación subterránea en un proceso para mejorar la recuperación de hidrocarburos de la formación. Una vez que se realizan la grieta o grietas, se bombea en la fractura un apuntalante de alta permeabilidad con respecto a la permeabilidad de la formación, para mantener la grieta abierta. Cuando las velocidades y presiones de bombeo se reducen o eliminan de la formación, la grieta o fractura no se puede cerrar o cicatrizar completamente, porque el apuntalamiento de alta permeabilidad mantiene la grieta abierta. La grieta o fractura apuntalada proporciona un recorrido de alta permeabilidad que conecta el pozo de producción a un área de formación más grande, para aumentar la producción de hidrocarburos.
- 25 El desarrollo de fluidos de fracturación adecuados es una técnica compleja, debido a que los fluidos deben cumplir, simultáneamente, un número de condiciones. Por ejemplo, deben ser estables a altas temperaturas y/o altas velocidades de bombeo y de cizallamiento que pueden hacer que los fluidos se degraden, y asienten prematuramente el apuntalamiento antes de completar la operación de fracturación. Se han desarrollado diversos fluidos, pero la mayoría de los fluidos de fracturación utilizados en el mercado son líquidos acuosos que han sido o gelificados o espumados para suspender mejor los apuntalantes dentro del fluido.
- 30 Los fluidos de inyección pueden usarse en operaciones de enhanced oil recovery (recuperación asistida del petróleo - EOR), que son procedimientos sofisticados que usan fuerzas viscosas y/o fuerzas interfaciales para aumentar la producción de hidrocarburos, p. ej., petróleo crudo, de yacimientos de petróleo. Los procedimientos de EOR pueden iniciarse en cualquier momento después de la vida productiva primaria de un yacimiento de petróleo, cuando la producción de petróleo comience a reducirse. La eficiencia de las operaciones de EOR puede depender de la temperatura del yacimiento, la presión, la profundidad, la remuneración neta, la permeabilidad, las saturaciones residuales de petróleo y agua, la porosidad, la propiedades del fluido, tales como la gravedad API del aceite y la viscosidad, y similares.
- 35 Las operaciones de EOR se consideran un método secundario o terciario de recuperación de hidrocarburos, y puede ser necesario cuando la operación de recuperación primaria y/o secundaria haya dejado detrás una cantidad sustancial de hidrocarburos en la formación subterránea. Los métodos primarios de recuperación de petróleo usan la energía natural del yacimiento para producir petróleo o gas, y no requieren de fluidos externos o calor como energía motriz; los métodos de EOR se usan para inyectar materiales en el yacimiento que no estén normalmente presentes en el yacimiento.
- 40 Los métodos de EOR secundarios de recuperación de petróleo inyectan fluidos externos en el yacimiento, tales como agua y/o gas, para volver a presurizar el yacimiento y aumentar el desplazamiento de petróleo. Los métodos de EOR terciarios incluyen la inyección de fluidos especiales, tales como químicos, gases miscibles y/o energía térmica. Las operaciones de EOR siguen las operaciones primarias y tienen como objetivo la interacción de fuerzas capilares y viscosas dentro del yacimiento. Por ejemplo, en las operaciones de EOR, la energía para producir los hidrocarburos restantes de la formación subterránea se puede suministrar mediante la inyección a presión de fluidos a la formación, a través de uno o más pozos de inyección que penetren la formación, donde los fluidos de inyección
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

impulsen los hidrocarburos a uno o más pozos productores, penetrando la formación. Las operaciones de EOR se realizan, típicamente, inyectando el fluido a través del pozo de inyección al yacimiento subterráneo para restaurar la presión de formación, mejorar el desplazamiento de petróleo o el flujo de fluido en el yacimiento, y similares.

Ejemplos de operaciones de EOR incluyen inundación a base de agua y métodos de inyección de gas. La inundación a base de agua también puede denominarse "inundación química" si se añaden químicos al fluido de inyección a base de agua. La inundación a base de agua puede ser, o incluir, una inundación polimérica, inundación ASP (álcali/surfactante/polímero), inundación SP (surfactante/polímero), agua de salinidad baja y EOR microbiano; la inyección de gas incluye métodos de gas inmiscible y miscible, tales como inundación con dióxido de carbono y similares.

Sería deseable si se desarrollaran aditivos para las composiciones de fluidos que se usen durante la recuperación de hidrocarburos, para disminuir o eliminar compuestos que contengan azufre en fluidos de fondo de pozo recuperados y en pozos de yacimientos de hidrocarburo.

Sumario

Se proporciona, en una forma, una composición aditiva a añadir a un fluido base, tal como, pero sin limitarse a, un fluido de perforación, un fluido de terminación, un fluido de producción, un fluido de mantenimiento, un fluido de inyección, un fluido de refinería y combinaciones de los mismos. El aditivo comprende al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1.

Se proporciona, en una forma no limitativa, una composición de fluido que tiene un fluido base y al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1. El fluido base puede ser, o incluir, pero sin limitarse a, fluidos de perforación, fluidos de mantenimiento, fluidos de producción, fluidos de terminación, fluidos de inyección, fluidos de refinería y combinaciones de los mismos.

Además, se proporciona, en una realización no limitativa alternativa, un método que puede incluir la circulación de una composición de fluido en un pozo de yacimiento subterráneo, y disminuir una cantidad de compuestos que contengan azufre en el pozo de yacimiento subterráneo y/o en un fluido de fondo de pozo recuperado de un pozo de yacimiento subterráneo. La composición de fluido comprende al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1 en una concentración eficaz para disminuir una cantidad de compuestos que contengan azufre.

La enzima cisteína sintasa parece que elimina el sulfuro de hidrógeno de los fluidos de fondo de pozo recuperados y/o en los pozos de yacimiento subterráneos.

Breve descripción de los dibujos

Para entender más completamente los dibujos que se mencionan en la descripción detallada, se presenta a continuación una breve descripción de cada dibujo:

Fig. 1 (Sec. con núm. de ident. 1) representa la secuencia de nucleótidos que se codifica para la enzima cisteína sintasa;

Fig. 2 representa el plásmido pBEn-SET3a que se usa para expresar la enzima cisteína sintasa;

Fig. 3 es un gráfico que muestra el efecto de los componentes de reacción sobre la actividad de cisteína sintasa, donde la cisteína formada se trató con ninhidrina ácida, y la absorbancia se midió con un espectrómetro a 560 nm;

Fig. 4 es un gráfico que muestra los niveles de sulfuro de hidrógeno medidos mediante colorimetría, usando un ensayo de sulfuro HACH; y

Fig. 5 es una gráfica que muestra una cantidad de H₂S medida en el espacio libre después de tratar una botella o una condición que contenga un sulfuro equilibrado y sulfuro de hidrógeno, donde las mediciones se tomaron mediante cromatografía de gases.

Descripción detallada

Se ha descubierto que una composición aditiva que tiene una cisteína sintasa derivada de *Aeropyrum pernix* puede añadirse a un fluido base para disminuir una cantidad de especies de azufre en el fluido base. Alternativamente, una composición de fluido que comprenda una cisteína sintasa derivada de *Aeropyrum pernix* puede circularse en un pozo de yacimiento subterráneo para disminuir una cantidad de compuestos de especies de azufre presentes en el pozo de yacimiento subterráneo y/o cualesquiera fluidos de fondo de pozo recuperados de ahí. Además de ser biodegradable, la enzima cisteína sintasa puede ser menos tóxica para el medio ambiente y puede hacerse de recursos renovables. El uso de enzimas cisteína sintasa en un fluido base puede proporcionar una alternativa renovable frente a aditivos convencionales (no biodegradables) que se usan en

fluidos de fondo de pozo para disminuir los compuestos que contienen azufre. En una realización no limitativa, la cisteína sintasa puede ser, o incluir, pero no se limita a, O-acetil-serina sulfhidrilasa (OASS).

El aditivo y/o composición de fluido puede incluir, además, un componente adicional, tal como, pero sin limitarse a, un fosfato de piridoxal, O-acetil-serina, DTT y combinaciones de los mismos; el o los componentes adicionales pueden añadirse al fluido base al mismo tiempo o en momentos diferentes desde la enzima cisteína sintasa. En una realización no limitativa, el fosfato de piridoxal puede añadirse al fluido base en una concentración que varía de aproximadamente 0,1 mM independientemente a aproximadamente 5 mM, de forma alternativa de aproximadamente 1 mM independientemente a aproximadamente 4 mM. En una realización no limitativa, el aditivo y/o la composición de fluido no incluye fosfato de piridoxal. En otra realización no limitativa, el DTT puede añadirse al fluido base en una concentración que varía de aproximadamente 0,25 mM independientemente a aproximadamente 5 mM, de forma alternativa de aproximadamente 1 mM independientemente a aproximadamente 3 mM.

En una realización no limitativa, la O-acetil-serina (OAS) se puede añadir al fluido base en una concentración que sea prácticamente igual a, o mayor que, la cantidad de sulfuro de hidrógeno que se cree está presente en el fluido base y/o el pozo de yacimiento subterráneo. En una realización alternativa no limitativa, la OAS puede añadirse al fluido base en una concentración que varía de aproximadamente 1 mM independientemente a aproximadamente 20 mM, de forma alternativa de aproximadamente 5 mM independientemente a aproximadamente 15 mM.

Las enzimas cisteína sintasa pueden eliminar o disminuir los compuestos que contengan azufre, p. ej., sulfuro de hidrógeno (H_2S) en una realización no limitativa, dentro de un fluido de fondo de pozo recuperado de un pozo de yacimiento subterráneo y/o disminuir la cantidad de sulfuro de hidrógeno u otros compuestos que contengan azufre en el pozo del que se recuperó el fluido de fondo de pozo. La enzima cisteína sintasa puede catalizar la reacción de una O-acetil-L-serina y sulfuro de hidrógeno para formar L-cisteína y acetato. En una realización no limitativa, el sulfuro de hidrógeno se convierte en L-cisteína en una relación 1:1, *es decir*, un mol de H_2S forma un mol de L-cisteína. Asimismo, la O-acetil-L-serina y el hidrógeno se unen a la enzima en una relación 1:1.

En la presente memoria se define “enzima cisteína sintasa” como el sitio activo de la enzima cisteína sintasa para convertir el sulfuro de hidrógeno a L-cisteína y acetato. El sitio activo puede ser, o incluir, la proteína entera, un fragmento activo de la proteína, un mimético de la proteína y combinaciones de los mismos. En la presente memoria el uso de “fragmento” busca incluir cualquier secuencia de aminoácidos más corta que la enzima cisteína sintasa de longitud completa, pero donde el fragmento mantenga una actividad similar a la enzima cisteína sintasa de longitud completa. Los fragmentos pueden incluir una sola secuencia contigua idéntica a una parte de la secuencia de enzima cisteína sintasa. Alternativamente, el fragmento puede tener, o incluir, varios segmentos diferentes más cortos, en donde cada segmento es idéntico en secuencia de aminoácidos a una parte diferente de la secuencia de aminoácidos de la enzima cisteína sintasa, pero vinculado a través de aminoácidos que difieren en secuencia de la enzima cisteína sintasa. En la presente memoria el uso de “mimético” puede incluir polipéptidos, que pueden ser recombinantes, y peptidomiméticos, así como moléculas orgánicas pequeñas, que presentan actividad catalítica similar o mejorada en comparación con la enzima cisteína sintasa que se describe en la presente memoria.

El gen para la enzima cisteína sintasa puede ser codón-optimizado para aumentar la eficacia de su expresión en *E. coli*. La secuencia de nucleótidos de una realización de la enzima cisteína sintasa se expone en la Fig. 1 (Sec. con núm. de ident. 1). La codificación génica para la enzima cisteína sintasa puede tener una secuencia de nucleótidos que sea sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos de la Fig. 1 (Sec. con núm. de ident. 1). En la presente memoria se usa el término “sustancialmente homólogo” para indicar nucleótidos que tengan al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en la Fig. 1 (Sec. con núm. de ident. 1), de forma alternativa de 85 % a 99,5 %, o de 85 % a 95 %.

La enzima cisteína sintasa puede ser un homodímero, es decir, dos subunidades que sean iguales, donde cada subunidad pueda tener un fosfato de piridoxal como un cofactor. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la enzima cisteína sintasa puede funcionar en ausencia de un cofactor de fosfato de piridoxal.

La secuencia estructural primaria es la secuencia lineal de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos para formar la estructura primaria de la enzima cisteína sintasa. La estructura secundaria de la proteína se refiere a las interacciones de emparejamiento base dentro de una sola molécula o conjunto de moléculas interactuantes, tales como una hélice beta en la enzima cisteína sintasa. La estructura terciaria se refiere a la estructura tridimensional de la enzima cisteína sintasa formada a partir de la secuencia de nucleótidos. La estructura cuaternaria se refiere a la interacción entre al menos dos estructuras terciarias.

Para obtener la enzima cisteína sintasa, la bacteria *Aeropyrum pernix* puede revestirse sobre un medio de crecimiento, tal como un agar, que sea conducente al crecimiento de la bacteria *Aeropyrum pernix* en una realización no limitativa. La enzima cisteína sintasa puede aislarse directamente de la *Aeropyrum pernix* para añadirla a, o usarla en, una composición de fluido para disminuir un compuesto que contenga azufre en una composición de fluido y/o un pozo de yacimiento subterráneo. En la presente memoria se define “aislado” para indicar que la enzima cisteína sintasa ha sido eliminada de las células intactas o residuos celulares, y está en una condición distinta de su entorno nativo, está libre

de otros ácidos nucleicos extraños o no deseados, proteasas y lípidos, en una forma adecuada para usar como una enzima cisteína sintasa, tal como se describe en la presente memoria.

En una realización no limitativa, el gen de cisteína sintasa de la bacteria *Aeropyrum pernix* puede insertarse en un vector plasmídico. Un vector es una molécula de ADN que se puede usar como un vehículo para transportar artificialmente material genético de una célula y/u organismo extraño. Un plásmido se define como un elemento extracromosomal circular que se encuentra de forma natural en bacterias y en algunos otros organismos, y que puede diseñarse genéticamente para clonar fragmentos de ADN. El plásmido puede entonces insertarse en una célula de bacteria huésped, tal como *Escherichia coli*, donde la célula huésped puede replicar y/o expresar el ADN extraño. Las células *E. coli* se pueden revestir sobre un medio de crecimiento, tal como un agar, que sea conducente al crecimiento de *E. coli*. El crecimiento de *E. coli* propaga la enzima cisteína sintasa como clones dentro de cada célula *E. coli*. La enzima cisteína sintasa puede aislarse de las células *E. coli* y añadirse a, o usarse en, una composición de fluido.

Fig. 2 es una descripción del plásmido pBEn-SET3a antes de la clonación de la cisteína sintasa en él. P T7/lacO es un sitio promotor con un operador lac, que es un sitio para la transcripción inicial. El RBS extendido es un sitio de unión ribosómico que es una secuencia en ARNm que está enlazada mediante un ribosoma al iniciar la traducción de proteínas.

La etiqueta SET3 puede aumentar la solubilidad de cualesquiera proteínas problemáticas dentro de *E. coli*. Aunque el mecanismo por el cual la etiqueta SET puede mejorar la solubilidad no se haya confirmado, la etiqueta SET puede mejorar la solubilidad de la proteína de fusión, proporcionando una carga negativa neta, que se cree que previene la agregación, y proporciona más tiempo para el plegamiento correcto de la proteína in vivo.

El multiple cloning site (sitio de clonación múltiple - MCS) es un segmento corto de ADN que tiene varios sitios de restricción, tales como Nde1 y BamH1 en una realización no limitativa. La Nde1 es una enzima de restricción de tipo II que puede cortar y abrir los objetivos específicos de secuencia; específicamente, Nde1 puede usarse para cortar y abrir los marcos de lectura en el plásmido para insertar los genes de la enzima cisteína sintasa. La BamHI es también una endonucleasa de restricción de tipo II que reconoce la secuencia 5'-GGATCC-3', y adhiere estas secuencias justo después de la 5'-guanina sobre cada cadena para dejar crear extremos adherentes que sean de 4 pares de bases de largo.

La ampicilina (Amp^R) regula la expresión de β-lactamasa, pBR322 ori es la secuencia de ADN que señala para el origen de replicación (también conocido como "origen"), y los códigos lacI para el represor de lactosa.

Para aislar u obtener la enzima cisteína sintasa del *E. coli*, las células *E. coli* se pueden recolectar mediante centrifugación para producir un sedimento celular. El sedimento celular puede lisarse o por medios físicos o por medios químicos, tales como detergentes y/o enzimas (p. ej., lisozima) para producir un lisado. El lisado crudo puede contener la proteína recombinante, así como otras proteínas que se originen del huésped bacteriano.

La enzima cisteína sintasa puede ser en forma de polvo y/o en forma líquida (p. ej., en solución) cuando se añade al, o se incluya en el, fluido base. La enzima cisteína sintasa puede ser parte de un aditivo donde el aditivo incluya la enzima cisteína sintasa, así como otros componentes, para ayudar a la enzima cisteína sintasa a disminuir la cantidad de compuestos que contengan azufre en una composición de fluido y/o en un pozo de yacimiento subterráneo.

El aditivo puede incluir una enzima cisteína sintasa que sea al menos 75 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1. El ADNc se define en la presente memoria como ADN sintetizado a partir de una plantilla de ARN mensajero (ARNm) en una reacción catalizada enzimática utilizando transcriptasa inversa. El aditivo puede incluir la enzima cisteína sintasa dentro de la composición aditiva en una concentración que varíe de aproximadamente 1 nanomolar (nM) independientemente a aproximadamente 5 milimolar (mM), de forma alternativa de aproximadamente 10 nM independientemente a aproximadamente 1 mM, o de aproximadamente 1 micromolar (μM) independientemente a aproximadamente 5 (μM) en comparación con el fluido base total.

En una realización no limitativa, la reacción puede producirse durante al menos 30 minutos, de forma alternativa de aproximadamente 30 minutos independientemente a aproximadamente 4 horas, o de aproximadamente 1 hora independientemente a aproximadamente 4 horas. En una realización no limitativa, la enzima cisteína sintasa puede mantener una función óptima a una temperatura que varíe de aproximadamente 24 °C (75 °F) independientemente a aproximadamente 82 °C (180 °F), de forma alternativa de aproximadamente 38 °C (100 °F) independientemente a aproximadamente 71 °C (160 °F). La enzima cisteína sintasa puede mantener una función óptima a una presión inferior a aproximadamente 15.000 libras por pulgada cuadrada (psi) (aproximadamente 103 megapascals [MPa]). La enzima cisteína sintasa puede mantener una función óptima a un pH que varíe de aproximadamente 4 independientemente a aproximadamente 11, de forma alternativa de aproximadamente 5 independientemente a aproximadamente 8. La enzima cisteína sintasa puede seguir funcionando, si acaso, a una velocidad de reacción reducida, fuera de los intervalos mencionados para la temperatura, la presión y/o el pH.

El aditivo puede añadirse a un fluido base para formar una composición de fluido. El fluido base puede ser, o incluir, pero sin limitarse a, un fluido de perforación, un fluido de terminación, un fluido de producción, un fluido de mantenimiento, un fluido de inyección, un fluido de refinería y combinaciones de los mismos. En una realización no limitativa, el fluido base puede ser un fluido acuoso, un fluido no acuoso y combinaciones de los mismos. En otra realización no limitativa, el fluido

base o la composición de fluido pueden contenerse en un oleoducto, gasoducto, una refinería (p. ej., recipientes de separación, unidades de deshidratación, tuberías de gas y conductos) y combinaciones de los mismos.

La composición de fluido que comprende al menos una cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1 puede circularse en un pozo de yacimiento subterráneo para disminuir una cantidad de compuestos que contengan azufre dentro del pozo de yacimiento subterráneo y/o cualquier fluido de fondo de pozo recuperado de ahí. En aún otra realización no limitativa, la composición de fluido puede incluir una sal, tal como, pero sin limitarse a, una salmuera, sal marina y combinaciones de las mismas. Las salmueras pueden ser, o incluir, pero no de forma limitativa, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de zinc, bromuro de potasio, bromuro de sodio, bromuro de calcio, bromuro de zinc, formiato de sodio, formiato de potasio, formiato de amonio, formiato de cesio y combinaciones de los mismos.

El uso de “derivadas de” con respecto a la enzima cisteína sintasa busca incluir enzimas cisteína sintasa enteras o fragmentos de enzima cisteína sintasa, donde la enzima cisteína sintasa se originase de la bacteria *Aeropyrum pernix* y se aislase de esas especies determinadas; el uso de “derivadas de” también abarca polipéptidos idénticos en ADN y/o en secuencia de aminoácido al sitio activo (p. ej., el hendido entre los dominios terminales C y N, y el sitio de lisina 47 en un ejemplo no limitativo) de la bacteria *Aeropyrum pernix*, que se expresan de forma recombinante en un sistema de expresión de célula huésped, o se sintetizan químicamente. “ADN recombinante” es ADN que se ha formado artificialmente mediante la combinación de constituyentes de diferentes organismos, tales como la inserción de la enzima cisteína sintasa en una célula huésped *E. coli* para una reproducción clonada de la enzima cisteína sintasa en un ejemplo no limitativo.

“Derivado de” también incluye derivados de las enzimas cisteína sintasa *Aeropyrum pernix*, tal como un polipéptido o fragmento que puede ser en la secuencia estructural primaria sustancialmente similar a una enzima cisteína sintasa descrita en la presente memoria, pero que puede incluir modificaciones químicas y/o bioquímicas que no se encuentren en el polipéptido nativo. Dichas modificaciones pueden ser, o incluir, pero no se limitan a, una etiqueta, tal como un isótopo radiactivo, un fluoróforo o una etiqueta enzimática útil para trazar la enzima cisteína sintasa. La etiqueta, u otra modificación, puede ser útil para aislar la enzima cisteína sintasa de la bacteria *Aeropyrum pernix* y/u otro sistema de expresión (*E. coli*, como se describe a continuación). La etiqueta, u otra modificación, se puede usar para identificar la enzima cisteína sintasa una vez que la composición de fluido de fondo de pozo se necesite recuperar de un pozo de yacimiento subterráneo y/o recuperar la enzima cisteína sintasa de la composición de fluido. Otras modificaciones no limitativas pueden ser, o incluir, una mutagénesis de nucleótidos para impartir a la enzima cisteína sintasa termoestabilidad y tolerancia al pH adicionales.

El método puede incluir disminuir la cantidad de al menos un compuesto que contenga azufre dentro de la composición de fluido y/o dentro de un pozo de yacimiento subterráneo. Los parámetros que pueden usarse para evaluar la eficacia de la enzima cisteína sintasa pueden incluir mediciones de la cinética de formación de cisteína, la cantidad de compuestos que contengan azufre presentes en los fluidos de fondo de pozo recuperados y/o pozo de yacimiento subterráneo antes y después del tratamiento con el aditivo y/o la composición de fluido, y similares. Se pueden usar métodos para medir estos parámetros para evaluar la capacidad de la enzima cisteína sintasa para reducir, disminuir o desactivar los compuestos que contengan azufre. En la presente memoria se define “concentración efectiva” queriendo indicar cualquier concentración de enzima cisteína sintasa que pueda disminuir o reducir la cantidad de compuestos que contengan azufre dentro de la composición de fluido, un pozo de yacimiento subterráneo y un fluido de fondo de pozo recuperado de ahí; de forma alternativa, se define en la presente memoria “concentración efectiva” queriendo indicar cualquier cantidad de la enzima cisteína sintasa que pueda disminuir la cantidad de compuestos que contengan azufre.

La invención se describirá adicionalmente con respecto a los siguientes Ejemplos, que no pretenden limitar la invención, sino más bien ilustrar mejor las diversas realizaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se realizaron dos experimentos separados con dos conjuntos de muestras, donde la cisteína y las concentraciones de H₂S se midieron después la finalización de cada reacción dentro de cada muestra.

Las Muestras 1 y 5 eran los blancos para cada conjunto que no contiene cisteína sintasa. Las Muestras 2 y 6 incluyeron una O-acetil-serina (OAS) en una concentración de 5 mM, piridoxal-5'-fosfato (PLP) en una cantidad de 0,25 mM, y una enzima cisteína sintasa, es decir, una enzima O-acetil-serina sulfhidrilasa (OASS), en una cantidad de 50 µL (aproximadamente 200 nanogramos de enzima). Las Muestras 3 y 7 incluyeron OAS en una concentración de 5 mM, PLP en una concentración de 0,25 mM, y la enzima OASS en una cantidad de 50 µL. Las Muestras 4 y 8 incluyeron OAS en una concentración de 5 mM, sin PLP, y la enzima OASS en una cantidad de 50 µL.

Una medida del aumento de la absorbancia de 560 nm representa una cantidad mayor de cisteína que se forma de cada muestra. Las reacciones tratadas con la enzima cisteína sintasa mostraron mayores concentraciones de cisteína en comparación con los blancos (Muestras 1 y 5), lo que indica que la cisteína se sintetizó de la enzima.

La enzima cisteína sintasa utilizó H₂S o sulfuro durante la reacción enzimática para sintetizar cisteína. No se produjeron diferencias significativas en la reducción (disminución) de H₂S independientemente de si había PLP presente durante la reacción enzimática.

Como se muestra en la Tabla 1, cada conjunto de muestras produjo aproximadamente la misma cantidad de cisteína, donde el segundo conjunto produjo más cisteína que el primer conjunto. Las Muestras 4 y 8, que no tenían PLP, produjeron cantidades similares de cisteína, lo que indica que la adición de PLP es opcional. La falta de PLP en las Muestras 4 y 8 también indica que el PLP es opcional en las concentraciones de H₂S medidas, que fue la menor cantidad de H₂S en comparación con las otras Muestras 1-3 y 5-7.

Las Muestras 1 y 5, los blancos del experimento para cada conjunto que no incluyó la enzima cisteína sintasa, tuvieron cantidades elevadas (14,5 y 15 mg/l) de H₂S en comparación con la disminución de al menos 50-60 % en H₂S presente en las Muestras 2-4 y 6-8 tratadas con la enzima cisteína sintasa.

Condición	Conjunto 1 de conc. de H ₂ S	Síntesis de cisteína	Conjunto 2 de conc. de H ₂ S	Síntesis de cisteína
Blanco de enzima	14,5 mg/l	0	15 mg/l	0
OAS + fosfato de piridoxal + enzima	8,5 mg/l	0,223	6,5 mg/l	0,409
OAS + fosfato de piridoxal + enzima	7 mg/l	0,218	6 mg/l	0,387
OAS + sin fosfato de piridoxal + enzima	4,5 mg/l	0,228	5 mg/l	0,458

Tabla 1: Cantidades medidas de cisteína y sulfuro producidos a partir de cisteína sintasa

Ejemplo 2

Fig. 3 es un gráfico que muestra el efecto de los componentes de reacción sobre la actividad de cisteína sintasa al detectar la cantidad de cisteína producida al hacer reaccionar los productos de reacción terminados con ninhidrina ácida, y medir la absorbancia con un espectrómetro a 560 nm (los aminoácidos reaccionan con la ninhidrina para producir color púrpura). La Muestra 1 incluyó 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, 1 mM de DTT, 0,25 mM de PLP, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 1 no incluyó la enzima OASS. La Muestra 2 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l (aproximadamente 200 nanogramos de la enzima), 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, 1 mM de DTT, 0,25 mM de PLP, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5. La Muestra 3 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 3 no incluyó ditiotritol (DTT), ni la Muestra 3 incluyó PLP. La Muestra 4 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, 0,25 mM de PLP, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 4 no incluyó DTT. La Muestra 5 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 5 no incluyó ditiotritol (DTT), ni la Muestra 3 incluyó PLP. La Muestra 6 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 6 no incluyó DTT, ni la Muestra 6 incluyó PLP; sin embargo, la Muestra 6 incluyó 50 % de O-acetil-serina OAS. La Muestra 7 fue sustancialmente similar a la Muestra 6, salvo que la Muestra 7 solo incluyó 25 % de OAS.

Tal como se indica en la Figura 3, la Muestra 2, que incluyó todos los componentes de la reacción, formó la mayor cantidad de cisteína. Merece la pena indicar aquí, una ausencia de DTT en la muestra puede reducir la detección de cisteína, ya que la cisteína se oxida tras la formación; sin embargo, la ausencia de DTT puede no afectar la eficacia de la reacción de la enzima cisteína sintasa. Además, una ausencia de PLP en la muestra puede no afectar la eficacia de la reacción de la enzima cisteína sintasa, ya que la molécula de PLP se añade a la enzima cisteína sintasa durante la expresión de la proteína.

Ejemplo 3

Fig. 4 es un gráfico que muestra las cantidades de H₂S medidas en cada muestra después de 4 h.

La Muestra 1 incluyó 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, 1 mM de DTT, 0,25 mM de PLP, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 1 no incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS). La Muestra 2 incluyó la enzima cisteína sintasa OASS en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, 1 mM de DTT, 0,25 mM de PLP, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5. La Muestra 3 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 3 no incluyó ditiotritol (DTT), ni la Muestra 3 incluyó PLP. La Muestra 4 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, 0,25 mM de PLP, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 4 no incluyó DTT. La Muestra 5 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 5 no incluyó

ditiotreitól (DTT), ni la Muestra 3 incluyó PLP. La Muestra 6 incluyó la enzima cisteína sintasa (OASS) en una cantidad de 50 microlitros μ l, 5 mM de O-acetil-serina, 1 mM de sulfuro, y 100 mM de tampón Tris-HCl, de pH 7,5; la Muestra 6 no incluyó DTT, ni la Muestra 6 incluyó PLP; sin embargo, la Muestra 6 incluyó 50 % de O-acetil-serina OAS. La Muestra 7 fue sustancialmente similar a la Muestra 6, salvo que la Muestra 7 solo incluyó 25 % de OAS.

Tal como se indica en la Figura 4, la Muestra 7 tuvo la cantidad restante más pequeña de H_2S que permaneció tras el tratamiento. La concentración de H_2S tuvo la mayor disminución en las Muestras 6 y 7, lo que puede deberse a un uso más eficiente de OAS de la enzima en ausencia de DTT y PLP.

Ejemplo 4

Fig. 5 es un gráfico que muestra la cantidad de H_2S presente en el espacio libre en cuatro muestras medidas mediante gas chromatography (Cromatografía de gases - GC). "Espacio libre" se refiere al volumen gaseoso dentro de cada muestra. La Muestra 1 fue el blanco donde no se agregó enzima cisteína sintasa (OASS) a la muestra. Las Muestras 2-4 incluyeron 400 ml mM de Tris-HCl, de pH 7,0, 5 mM de cisteína sintasa, 1 mM de DTT, y 0,025 mM de PLP. Las Muestras 2-4 se rociaron con 10 % de H_2S durante dos horas hasta alcanzar una concentración de H_2S de 1500 ppm en la fase de vapor. Se añadió un ml de un lisado de enzima cisteína sintasa (OASS) a 90 ml de la solución para la Muestra 2, y se añadieron 2 ml de un lisado de enzima cisteína sintasa OASS a las Muestras 3 y 4, y después cada muestra se incubó durante 4 horas a 37 °C. El lisado de enzima cisteína sintasa (OASS) se obtuvo mediante el proceso mencionado anteriormente. Se midió entonces mediante GC la concentración de H_2S en cada muestra.

Se indican dos barras para la Muestra 1 y la Muestra 2; la barra de la izquierda para cada muestra representa la cantidad de H_2S tal como se detecta con una sonda de sensibilidad menor, y la barra de la derecha para cada muestra representa la cantidad de H_2S tal como se detecta con una sonda de sensibilidad mayor. Tal como se indica en la Figura 5, 2 ml del lisado de enzima cisteína sintasa eliminaron completamente el H_2S en las Muestras 3-4.

La presente invención puede, de forma adecuada, comprender, consistir o consistir esencialmente en los elementos descritos y pueden practicarse en ausencia de un elemento que no se describe. Por ejemplo, la composición aditiva para un fluido base, tal como un fluido de perforación, un fluido de terminación, un fluido de producción, un fluido de mantenimiento, un fluido de inyección, un fluido de refinería y combinaciones de los mismos, puede consistir en, o consistir esencialmente en, al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1.

La composición de fluido puede consistir en, o consistir esencialmente en, un fluido base y al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que sea de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1; el fluido base puede ser, o incluir, pero no se limita a, un fluido de perforación, un fluido de terminación, un fluido de producción, un fluido de mantenimiento, un fluido de inyección, un fluido de refinería y combinaciones de los mismos.

El método puede consistir en, o consistir esencialmente en, hacer circular una composición de fluido en un pozo de yacimiento subterráneo; en donde la composición de fluido incluya al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que sea de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1 en una concentración eficaz para disminuir y/o eliminar el sulfuro de hidrógeno en fluidos de fondo de pozo.

ES 2 781 078 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Baker Hughes Incorporated

<120> Enzimas para eliminar compuestos sulfurosos en fluidos de fondo de pozo

<130> IND4-58529-US

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1196

<212> ADN

<213> Aeropyrum pernix

<400> 1

atgagaggat	cgcacacacca	tcaccatcac	gcgctggcgg	atattagegg	etatetggat	60
gtgctggata	gcgtgcgcgg	ctttagctat	ctggaaaacg	egegegaagt	gctgcgcagc	120
ggcgaagcgc	gctgcctggg	caaccgcgc	agcgaaccgg	aatatgtgaa	agegetgtat	180
gtgattggcg	cgagccgcat	tccggtgggc	gatggctgca	gccataccct	ggaagaactg	240
ggcgtgtttg	atattagcgt	gccgggcgaa	atggtgtttc	cgagcccgt	ggatTTTTTT	300
gaacgcggca	aaccgacccc	gctggtgcgc	agccgcctgc	agetgeegaa	cggcgtgcgc	360
gtgtggctga	aactggaatg	gtataacccg	tttagcctga	gegtgaaaga	tcgcccggcg	420
gtggaaatta	ttagccgcct	gagccgcgc	gtggaaaaag	gcagcctggt	ggcggtatgcg	480
accagcagca	actttggcgt	ggcgtgagc	gcggtggcgc	gcctgtatgg	ctatcgcgcg	540
cgcgtgtatc	tgccggggcg	ggcgggaagaa	tttggaacac	tgtgcccgcg	cctgctgggc	600
gcgcaggtga	ttgtggatcc	ggaagcgccg	agcacctgct	atctgctgcc	gegegtgatg	660
aaagatagca	aaaacgaagg	ctttgtgcat	gtgaaccagt	tttataaega	tgcgaaacttt	720
gaagcgcata	tgcgcgggcac	cgcgcgcgaa	atTTTTgtgc	agagccgccg	cggcggcctg	780
gcgctgcgcg	gcgtggcggg	cagcctgggc	accagcggcc	atatgagege	ggcggcgttt	840
tatctgcaga	gcgtggatcc	gagcattcgc	gcggtgctgg	tgagccggc	gcagggcgat	900
agcattccgg	gcattcgccg	cgtggaaacc	ggcatgctgt	ggattaacat	getggatatt	960
agctataccc	tggcggaagt	gaccctggaa	gaagcgatgg	aagcgggtgt	ggaagtggcg	1020
cgcagcgatg	gcctgggtgat	tgccccgagc	ggcggcgccg	eggtgaaage	gctggcgaaa	1080
aaagcggcgg	aaggcgatct	ggaaccgggc	gattatgtgg	tggtggtgcc	ggataccggc	1140
tttaaataatc	tagcctggtg	cagaacgcgc	tggaaggcgc	gggegatage	gtgtaa	1196

REIVINDICACIONES

1. Una composición aditiva para un fluido base, en donde la composición aditiva comprende al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1.
2. La composición aditiva de la reivindicación 1, en donde la concentración de la al menos una enzima cisteína sintasa dentro de la composición aditiva varía de 1 nanomolar (nM) independientemente a 5 milimolar (mM).
3. La composición aditiva de la reivindicación 1, que comprende, además, un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en fosfato de piridoxal, O-acetil-serina, ditioneitol (DTT), y combinaciones de los mismos.
4. La composición aditiva de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la al menos una enzima cisteína sintasa forma cisteína en ausencia de fosfato de piridoxal.
5. La composición aditiva de la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende, además, O-acetil-L-serina en una concentración que varía de 1 mM a 20 mM.
6. La composición aditiva de la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende, además, ditioneitol (DTT) en una concentración que varía de 0,25 mM a 5 mM.
7. Una composición de fluido que comprende:
un fluido base; y
al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de la sec. con núm. de ident. 1.
8. La composición de fluido de la reivindicación 7, en donde la concentración de la al menos una enzima cisteína sintasa dentro de la composición aditiva varía de 1 nanomolar (nM) independientemente a 5 milimolar (mM) en comparación con el fluido base total.
9. La composición de fluido de la reivindicación 7, en donde la composición de fluido comprende, además, un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en un fosfato de piridoxal, O-acetil-serina, ditioneitol (DTT), y combinaciones de los mismos.
10. La composición de fluido de la reivindicación 7, 8 o 9, en donde la composición de fluido comprende, además, al menos un compuesto que contiene azufre; y en donde la composición de fluido comprende el compuesto que contiene azufre en una cantidad reducida en comparación con una composición de fluido idéntica sin la al menos una enzima cisteína sintasa.
11. La composición de fluido de la reivindicación 7, 8 o 9, que comprende, además, O-acetil-L-serina en una concentración que varía de 1 mM a 20 mM.
12. La composición de fluido de la reivindicación 7, 8 o 9, que comprende, además, DTT en una concentración que varía de 0,25 mM a 5 mM.
13. Un método que comprende:
hacer circular una composición de fluido en un pozo de yacimiento subterráneo; en donde la composición de fluido comprende al menos una enzima cisteína sintasa que se codifica por una secuencia que es de 85 % a 100 % homóloga a la secuencia de ADNc de sec. con núm. de ident. 1 en una concentración efectiva para disminuir una cantidad de compuestos que contengan azufre; y
disminuir una cantidad de compuestos que contengan azufre en el pozo de yacimiento subterráneo y/o los fluidos de fondo de pozo recuperados de ellos.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la concentración efectiva de la al menos una enzima cisteína sintasa dentro de la composición aditiva varía de 1 nanomolar (nM) independientemente a 5 milimolar (mM) en comparación con el fluido base total.
15. El método de la reivindicación 13, en donde la composición de fluido comprende, además, un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en un fosfato de piridoxal, O-acetil-serina, ditioneitol (DTT), y combinaciones de los mismos.
16. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde la composición de fluido comprende, además, al menos un compuesto que contiene azufre; y en donde la composición de fluido comprende el compuesto

que contiene azufre en una cantidad reducida en comparación con una composición de fluido idéntica en ausencia de la al menos una enzima cisteína sintasa.

- 5
17. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, que comprende, además, O-acetil-L-serina en una concentración que varía de 1 mM a 20 mM.
 18. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, que comprende, además, DTT en una concentración que varía de 0,25 mM a 5 mM.

5'
 ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGCGCTGGCGGATATTAGCGGCTATCTGGATGTG
 CTGGATAGCGTGCGCGGCTTTAGCTATCTGGAAAAACGCGCGCGAAGTGCTGCGCAGCGGCGA
 AGCGCGCTGCCTGGGCAACCCGCGCAGCGAACCAGGAATATGTGAAAGCGCTGTATGTGATTG
 GCGCGAGCCGCATTCCGGTGGGCGATGGCTGCAGCCATACCCTGGAAGAACTGGGCGTGTTT
 GATATTAGCGTGCCGGGCGAAATGGTGTTCGAGCCCGCTGGATTTTTTTGAACGCGGCAAA
 CCGACCCCGCTGGTGCGCAGCCGCCTGCAGCTGCCGAACGGCGTGCGCGTGTGGCTGAAACT
 GGAATGGTATAACCCGTTTAGCCTGAGCGTGAAAGATCGCCCGGCGGTGGAAATTATTAGCC
 GCCTGAGCCGCCGCGTGGA AAAAGGCAGCCTGGTGGCGGATGCGACCAGCAGCAACTTTGGC
 GTGGCGCTGAGCGCGGTGGCGCGCCTGTATGGCTATCGCGCGCGCGTGTATCTGCCGGGCGCG
 GCGGAAGAATTTGGCAAACCTGCTGCCGCGCCTGCTGGGCGCGCAGGTGATTGTGGATCCGGA
 AGCGCCGAGCACCGTGCATCTGCTGCCGCGCGTGATGAAAGATAGCAAAAACGAAGGCTTTG
 TGCATGTGAACCAGTTTTATAACGATGCGAACTTTGAAGCGCATATGCGCGGCACCGCGCGCG
 AAATTTTTGTGCAGAGCCGCCGCGCGGCCTGGCGCTGCGCGGCGTGCGGGGCAGCCTGGGC
 ACCAGCGGCCATATGAGCGCGGCGGCGTTTTATCTGCAGAGCGTGGATCCGAGCATTTCGCGCG
 GTGCTGGTGCAGCCGGCGCAGGGCGATAGCATTCCGGGCATTCCCGCGTGGAACCGGCAT
 GCTGTGGATTAACATGCTGGATATTAGCTATACCCTGGCGGAAGTGACCTGGAAGAAGCGAT
 GGAAGCGGTGGTGGAAGTGGCGCGCAGCGATGGCCTGGTGATTGGCCCGAGCGGCGGCGCGG
 CGGTGAAAGCGCTGGCGAAAAAAGCGGCGGAAGGCGATCTGGAACCGGGCGATTATGTGGTG
 GTGGTGCCGATACCGGCTTTAAATATCTAGCCTGGTGCAGAACGCGCTGGAAGGCGCGGGC
 GATAGCGTGTAA
 --3'

FIG. 1

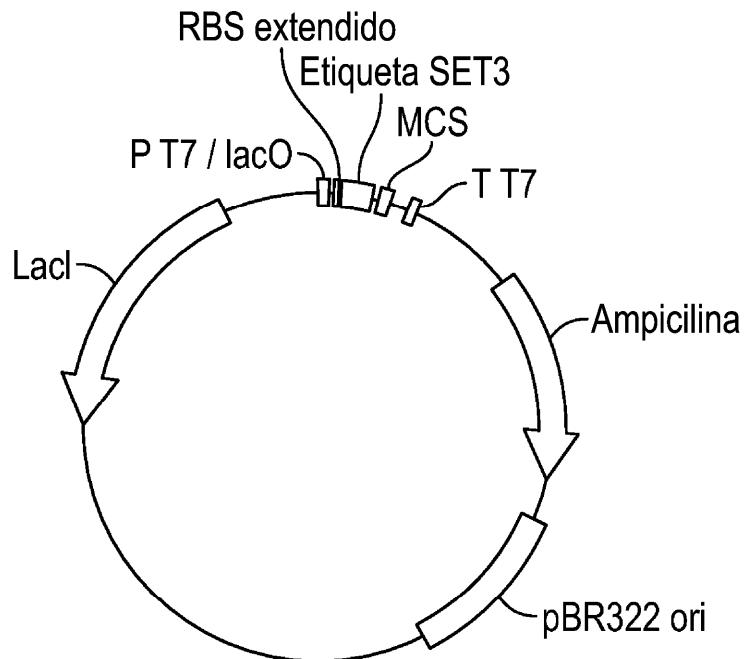


FIG. 2

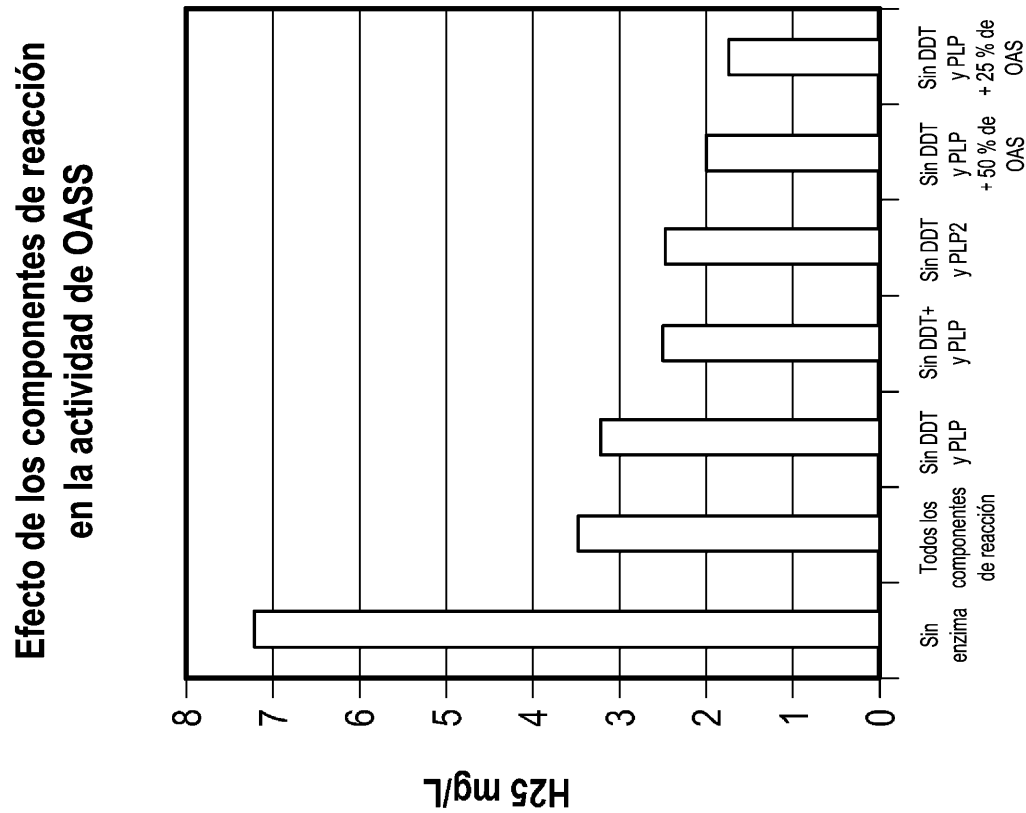


FIG. 4

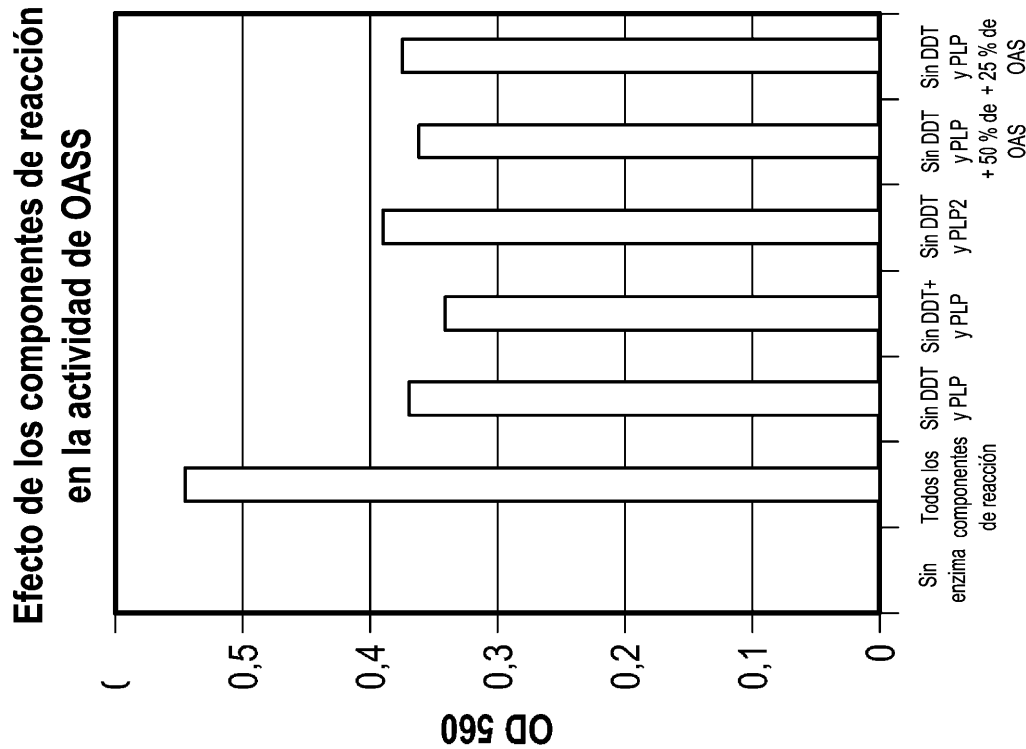


FIG. 3

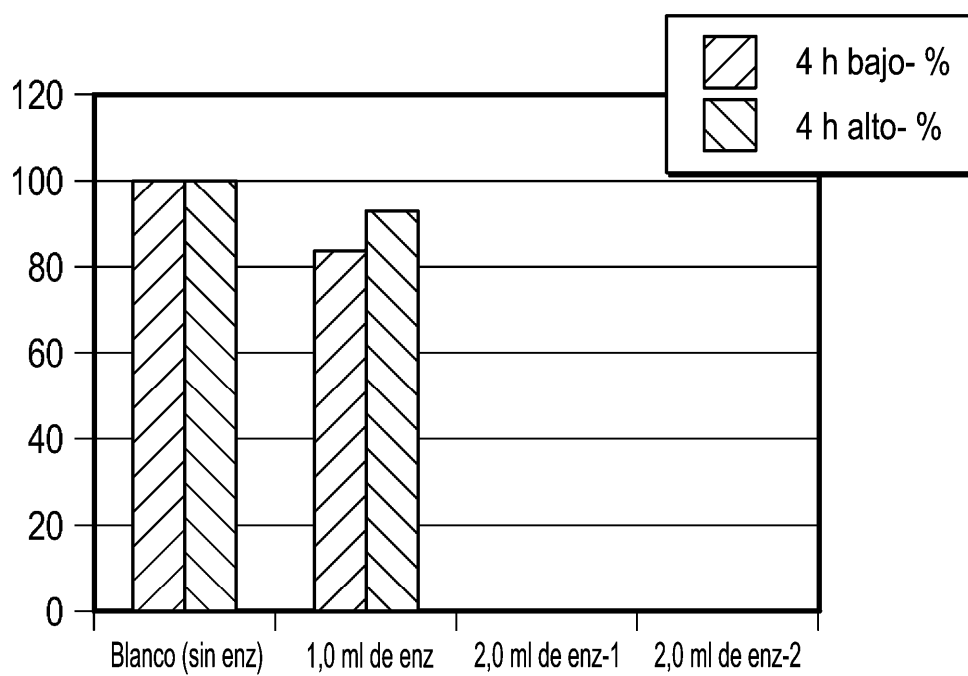


FIG. 5