

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 508**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 15/61 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/66 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2005 E 05775908 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **02.05.2007 EP 1778843**

54 Título: **Producción de isoprenoides**

30 Prioridad:

19.08.2004 EP 04019646

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

01.02.2013

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**BERRY, ALAN;
MANHART, CHRISTIAN y
SIMIC, PETRA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 394 508 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

Producción de isoprenoides

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de isoprenoides, en particular coenzima Q-10, por parte de microorganismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción incrementada de coenzima Q-10 por parte de microorganismos del género *Rhodobacter*, preferiblemente de la especie *R. sphaeroides*, que han sido transformados con uno o más genes del operón mevalonato (*mev*) procedente de un microorganismo diferente, preferiblemente del género *Paracoccus*, más preferiblemente de la especie *P. zeaxanthinifaciens*, en donde el operón *mev* está mutado, conduciendo a una producción incrementada de coenzima Q-10. También se incluyen secuencias que portan una mutación de este tipo, así como un microorganismo que porta un operón *mev* mutado de este tipo.

15 Coenzima Q-10 (2,3-dimetoxi-dimetil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona), también conocida como ubiquinona-10, es una benzoquinona soluble en lípidos con una cadena lateral de isoprenoide compuesta por diez unidades de isoprenoide C-5. La coenzima Q-10 (abreviada aquí en lo que sigue como CoQ10) se encuentra en microorganismos y plantas, así como en animales. Es la forma más frecuente de ubiquinona en seres humanos y en la mayoría de los mamíferos. Se establece y existe una evidencia creciente de que CoQ10 es un factor importante en el estado de salud de seres humanos y de su protección frente a enfermedades. Los efectos beneficiosos médicos y de salud de CoQ10 han sido asociados con sus dos funciones fisiológicas principales, a saber el funcionar como un cofactor esencial de la cadena de transporte mitocondrial de electrones (que está acoplada a la síntesis de adenosina trifosfato) y de actuar como un antioxidante soluble en lípidos.

25 Los beneficios de salud de CoQ10 han conducido a una importancia comercial incrementada de este compuesto. CoQ10 se puede producir por síntesis química o mediante fermentación utilizando microorganismos. Estos microorganismos pueden ser productores naturales de CoQ10 que han sido mejorados para la producción de CoQ10 mediante ingeniería genética, o pueden no producir de forma natural CoQ10, sino haber sido manipulados mediante ingeniería genética para ser capaces de sintetizarla.

30 En bacterias, el anillo quinoide de ubiquinonas se deriva de corismato, un compuesto intermedio principal en la biosíntesis de compuestos aromáticos, mientras que la cola isoprenoide de ubiquinonas se deriva del compuesto C-5 pirofosfato de isopentenilo (IPP – siglas en inglés). La longitud de la cola isoprenoide añadida al anillo quinoide depende de la enzima preniltransferasa particular que existe en la bacteria. Por ejemplo, en *Escherichia coli*, la octaprenil pirofosfato sintasa cataliza la formación de pirofosfato de octaprenilo (C-40) a partir de pirofosfato de farnesilo (FPP – siglas en inglés, C-15) y cinco unidades IPP. La adición de esta molécula al anillo quinoide resulta en la formación de ubiquinona-8. En especies de *Paracoccus* y *Rhodobacter*, la decaprenil pirofosfato (DPP- siglas en inglés) sintasa cataliza la formación de DPP (C-50) a partir de FPP (C-15) y siete unidades IPP. La adición de DPP al anillo quinoide resulta entonces en la formación de ubiquinona-10 (CoQ10).

40 En la naturaleza se conocen dos vías diferentes para la biosíntesis de IPP (Figura 1). La vía del mevalonato, como su nombre implica, utiliza mevalonato como compuesto intermedio principal y ha sido bien estudiada en eucariotas. Se pensó durante muchos años que la vía del mevalonato era la vía universal de la síntesis de IPP en la naturaleza. Sin embargo, en la última década se descubrió una segunda vía de la biosíntesis de IPP, la denominada vía del no mevalonato o la vía MEF (ya que tiene 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato como un compuesto intermedio). La vía del MEF ha demostrado hasta ahora existir en muchas eubacterias y en el compartimiento plástido de plantas superiores.

50 En base a la presencia en *R. sphaeroides* del gen *yaeM* (ahora denominado *ispC*) que codifica 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa, y la tras la inspección de la secuencia del genoma casi completada de *R. sphaeroides*, parece que esta bacteria utiliza exclusivamente la vía del MEF para la biosíntesis de IPP. Una evidencia adicional que sustenta el uso exclusivo de la vía del MEF en *R. sphaeroides* es el hallazgo de que una especie estrechamente relacionada, *Rhodobacter capsulatus*, utiliza sólo la vía del MEF para la biosíntesis de isoprenoides.

55 El documento WO 02/26933 A1 describe métodos para aumentar la producción de CoQ10 en *Rhodobacter sphaeroides*, sobre-expresando unos pocos genes nativos y/o heterólogos que codifican algunas de las enzimas de la vía del MEF. Sin embargo, la sobre-expresión de estos genes resultó en sólo una mejora muy modesta en la producción de CoQ10.

60 Tal como se ha mencionado arriba, algunas bacterias utilizan solamente la vía del mevalonato para la biosíntesis de IPP. *Paracoccus zeaxanthinifaciens* es un ejemplo de una bacteria de este tipo. En *P. zeaxanthinifaciens*, los genes

que codifican las cinco enzimas de la vía del mevalonato, más el gen que codifica la IPP isomerasa (véase la Figura 1) están formando racimos juntos en una sola unidad de transcripción en el cromosoma, es decir, un operón denominado aquí en lo que sigue el operón mevalonato (*mev*) (Hümbelin *et al.*, Gene 297, 129-139, 2002).

Se ha encontrado ahora que la producción de isoprenoides, en particular CoQ10 puede aumentarse significativamente mediante la introducción de un operón *mev* mutado en un microorganismo que es por naturaleza deficiente en uno o más genes del operón *mev*, es decir, que utiliza de forma natural la vía del no mevalonato para la producción de isoprenoides, en donde se puede introducir el operón *mev* completo o uno o más genes de dicho operón *mev* que comprenden una o más mutaciones. La una o más mutaciones pueden ser, por ejemplo, en uno o en la totalidad de los siguientes genes: *mvaA* que codifica hidroximetilglutaril-CoA reductasa, *idi* que codifica isopentenil difosfato isomerasa, *hcs* que codifica hidroximetilglutaril-CoA sintasa, *mvk* que codifica mevalonato quinasa, *pmk* que codifica fosfomevalonato quinasa y *mvd* que codifica difosfomevalonato descarboxilasa.

Además de ello, se ha encontrado que la producción de isoprenoides, en particular CoQ10 puede ser adicionalmente incrementada mediante la introducción de una secuencia de ADN que codifica una proteína con una actividad de decaprenil difosfato sintasa en dicho microorganismo recombinante.

Así, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de isoprenoides de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas: a. Introducir en un microorganismo seleccionado del género *Rhodobacter* una secuencia de ADN que codifica una enzima con actividad de decaprenil difosfato sintasa y una secuencia de polinucleótidos que comprende genes del operón *mev* de acuerdo con SEQ ID NO: 23, b. cultivar el microorganismo de la etapa (a) bajo condiciones que permitan la producción de isoprenoides.

La mejora en la producción de isoprenoides se puede medir, por ejemplo, mediante una comparación de la producción en un microorganismo de tipo salvaje que no porta dichas secuencias de polinucleótidos, es decir, no utilizando la vía del *mev*, con el microorganismo que porta una secuencia de polinucleótidos tal como de la presente invención.

En una realización, la presente invención está dirigida a una secuencia de polinucleótidos que se puede obtener de SEQ ID NO: 1 ó 2, es decir, que comprende genes del operón *mev* de tipo salvaje, o un fragmento del mismo, en donde el fragmento tiene la actividad de al menos uno de los genes del operón *mev*, *p. ej.*, *mvaA* que codifica hidroximetilglutaril-CoA reductasa, *idi* que codifica isopentenil difosfato isomerasa, *hcs* que codifica hidroximetilglutaril-CoA sintasa, *mvk* que codifica mevalonato quinasa, *pmk* que codifica fosfomevalonato quinasa y *mvd* que codifica difosfomevalonato descarboxilasa. Preferiblemente, la secuencia de polinucleótidos mutada se representa por SEQ ID NO: 23 o un fragmento de la misma, que conduce a un incremento, *p. ej.*, en la producción de CoQ10 cuando está presente en un microorganismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ADN que comprende un operón *mev* que porta una mutación, estando representada dicha secuencia de ADN por SEQ ID NO:23.

La expresión "producción mejorada de isoprenoides", en particular producción mejorada de CoQ10, tal como se utiliza en esta memoria, significa un incremento de al menos aproximadamente 10% obtenido mediante un microorganismo que porta un polinucleótido que comprende una o más mutaciones según se describe arriba, cuando se compara con el microorganismo respectivo que porta el polinucleótido de tipo salvaje respectivo. La producción de los isoprenoides se mide por métodos convencionales, *p. ej.* HPLC (véase el Ejemplo 2) y se puede expresar en mg/l o como mg/ml/DO₆₀₀ (véase el Ejemplo 5).

El operón *mev* completo o uno o más genes del mismo que portan una o más mutaciones puede, por ejemplo, ser sintetizado totalmente o puede ser aislado parcialmente y sintetizado. Un operón *mev* aislado o uno o más genes del mismo pueden proceder de cualquier microorganismo utilizando la vía del mevalonato, es decir, en donde uno o más genes incluidos dentro de dicho operón se producen de forma natural. Preferiblemente, el microorganismo pertenece al género *Paracoccus*, más preferiblemente de *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, tal como, *p. ej.*, *Paracoccus sp* R114 o *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588. Por la expresión anterior quedan también comprendidas variaciones alélicas y mutantes de la secuencia de ADN del operón que son totalmente funcionales. El operón *mev* completo de *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 se muestra en SEQ ID NO: 1, el operón *mev* completo de *Paracoccus sp.* R114 se muestra en SEQ ID NO: 2 (véase también la SEQ ID NO: 42 del documento WO 02/099095).

La cepa *Paracoccus sp.* R114 es un derivado de *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 y ha sido depositada bajo los términos del Tratado de Budapest ante la ATCC bajo la Designación de Depósito de Patente PTA-3335 el 24 de abril de 2001. Con respecto a especies y cepas de *Paracoccus* que pueden utilizarse para la presente invención y para la

reclasificación taxonómica de *Flavobacterium sp.* como *Paracoccus* se hace referencia al documento WO 02/099095, páginas 47 y siguientes. Ejemplos de especies de este tipo que se pueden utilizar son *P. marcusii*, *P. carotinifaciens*, *P. solventivans*, *P. zeaxanthinifaciens* o *Paracoccus sp.* R114.

5 El operón *mev* de la presente invención porta una o más mutaciones que pueden estar localizadas en cualquier posición dentro del operón, lo que conduce a una alteración de la actividad de uno o más genes dentro de dicho operón, dando como resultado una producción mejorada de isoprenoides dentro de un microorganismo que porta un polinucleótido de este tipo.

10 En una realización, el operón *mev* porta al menos una mutación que preferentemente está localizada en el gen *hcs* del operón *mev*, por ejemplo en el gen *hcs* del operón *mev* de *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, *p. ej.* en el gen *hcs* del operón *mev* de *Paracoccus sp.* R114 o *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588. Más preferiblemente, el operón *mev* mutado, tal como se utiliza en la presente invención, se representa por SEQ ID NO: 23. Las secuencias del gen *hcs* de tipo salvaje y la respectiva proteína de *Paracoccus sp.* R114 se muestran en SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente.

15 En una realización, la presente invención está dirigida a un polinucleótido que comprende una o más mutaciones en el gen *hcs*, preferiblemente un polinucleótido mostrado en SEQ ID NO: 5 que codifica una proteína que tiene hidroximetilglutaril-CoA sintasa mostrada en SEQ ID NO: 6, en donde una glutamina presente en la posición 90 en SEQ ID NO: 4 está reemplazada por una lisina.

20 Así, es un objeto de la presente invención proporcionar una secuencia de polinucleótidos según se describe antes que comprende uno o más genes de operón *mev*, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:

(a) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6,

(b) polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 5,

(c) polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican un fragmento o derivado de un polipéptido codificado por un polinucleótido (a) o (b), en donde en dicho derivado uno o más residuos aminoácido están sustituidos de forma conservativa en comparación con dicho polipéptido, y dicho fragmento o derivado tiene la actividad de hidroximetilglutaril-CoA sintasa (Hcs);

(d) polinucleótidos, cuya cadena complementaria se hibrida bajo condiciones rigurosas a un polipéptido según se define en uno cualquiera de los apartados (a) a (c), y que codifica una proteína Hcs.

35 Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en una forma aislada, y preferiblemente se purifican hasta homogeneidad.

El término “aislado” significa que el material se separa de su entorno original (*p. ej.* el entorno natural si se produce de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se produce de forma natural, presente en un microorganismo vivo, no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Polinucleótidos de este tipo podrían ser parte de un vector y/o polinucleótidos o polipéptidos de este tipo podrían ser parte de una composición y todavía ser aislados de manera que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

45 Un polinucleótido o ácido nucleico aislado, tal como se utiliza en esta memoria, puede ser un ADN o ARN que no es inmediatamente contiguo tanto a la secuencia codificante a la que está inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma que se produce de forma natural del organismo del que se deriva. Así, en una realización, un ácido nucleico incluye alguna o la totalidad de la secuencias 5' no codificantes (*p. ej.* promotoras) que son inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. La expresión “polinucleótido aislado” incluye, por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que está incorporado en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe en forma de una molécula separada (*p. ej.* un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está esencialmente exento de material celular, material viral o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetizan químicamente). Además de ello, un “fragmento de ácido nucleico aislado” es un fragmento de ácido nucleico que no se produce de forma natural en forma de un fragmento y que no se encontraría en el estado natural.

60 Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes tales como, por ejemplo, secuencias no traducidas situadas en los extremos 3' y 5' de la región codificante de un gen, y secuencias reguladoras. Además de

ello, un gen se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada tal como se define en esta memoria. Además de ello, se aprecia por parte de la persona experta que dentro de una población pueden existir polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de proteínas.

- 5 El operón *mev* mutado o uno o más genes del mismo según se describen antes y la secuencia de ADN que codifica una proteína con actividad de decaprenil difosfato sintasa se pueden introducir, por ejemplo, en un microorganismo del género *Rhodobacter*.

10 Preferiblemente, el operón *mev* mutado o fragmentos del mismo de un microorganismo que pertenece al género *Paracoccus* se introduce en un microorganismo que pertenece al género *Rhodobacter*. Más preferiblemente, un polinucleótido que comprende una o más mutaciones en el gen que codifica hidroximetilglutaril-CoA sintasa se introduce en dicho microorganismo, y la más preferida es la introducción de una secuencia de polinucleótidos representada por SEQ ID NO: 23.

15 En particular, microorganismos del género *Rhodobacter* se pueden utilizar para la introducción de un polinucleótido mutado tal como de la presente invención, tal como, por ejemplo, *R. sphaeroides*, *R. adriaticus*, *R. capsulatus*, *R. sulfidophilus* o *R. veldkampii*. Una cepa preferida es *R. sphaeroides*, incluso más preferida es *R. sphaeroides* ATCC 35053.

20 Ha de entenderse que los microorganismos tal como se nombran en esta memoria incluyen también sinónimos o basónimos de dichas especies que tienen las mismas propiedades físico-químicas según se define por el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas.

25 La presente invención proporciona, además, microorganismos recombinantes que tienen introducido un polinucleótido tal como se describe arriba, que conduce a una producción mejorada de isoprenoides, particularmente ubiquinonas, preferiblemente CoQ10, en comparación con el respectivo microorganismo de tipo salvaje.

30 La secuencia de ADN que codifica una proteína con actividad de decaprenil difosfato sintasa se puede obtener, preferiblemente, a partir de un microorganismo del género *Paracoccus*, *p. ej.*, *P. zeaxanthinifaciens*, en particular *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588. La más preferida es una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 7 o un polinucleótido que codifica una proteína según SEQ ID NO: 8.

35 Así, es un aspecto de esta invención proporcionar un procedimiento para la producción CoQ10, que comprende (1) introducir tanto un operón mevalonato (*mev*) como una secuencia de ADN que codifica una proteína con actividad de decaprenil difosfato sintasa de un microorganismo perteneciente al género *Paracoccus* en un microorganismo perteneciente al género *Rhodobacter*, en donde dicho operón *mev* porta una o más mutaciones y (2) cultivar la cepa de *Rhodobacter* modificada.

40 La expresión "introducir en" se utiliza en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones en relación con la transformación de un microorganismo u otro organismo hospedante, *p. ej.* del género *Rhodobacter*, de modo que comprenda cualquier método bien conocido por una persona experta en la técnica que pueda ser utilizado para incorporar eficazmente material genético, en particular el operón mevalonato mutado o uno o más genes del mismo en el organismo hospedante, es decir, de una manera que sea expresado por el organismo. La introducción se puede efectuar, *p. ej.*, mediante vectores, preferiblemente plásmidos de expresión o mediante integración en el

45 genoma del hospedante de acuerdo con métodos convencionales. Un método preferido es la introducción de genes a través de plásmidos tales como, por ejemplo, genes que se clonan en el plásmido de expresión pBBR-K-*PcrE* (la construcción de este plásmido ha sido descrita en detalle en el Ejemplo 6, página 91, líneas 12-27 del documento WO 02/099095) bajo el control del promotor *PcrE*. Un método preferido para introducir el ADN tal como, por ejemplo, el plásmido de expresión en un microorganismo del género *Rhodobacter* es la transferencia conjugada de

50 plásmidos tal como, por ejemplo, la transferencia conjugacional de un plásmido de *E. coli* S17-1 a una cepa de *Rhodobacter* (Nishimura *et al.*, Nucl. Acids Res. 18, 6169, 1990; Simon *et al.*, Bio/Technology 1983, 784-91).

La o las mutaciones del operón *mev* o uno o más genes del mismo se pueden generar, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio por PCR utilizando un método que es familiar para una persona experta en la técnica y

55 que no necesita de una explicación específica. Métodos de mutagénesis adicionales que también pueden utilizarse para los fines de la presente invención y que son conocidos por la persona experta incluyen, por ejemplo, irradiación UV, transposición o mutagénesis química. El método de rastreo para la identificación de mutantes que muestran una productividad incrementada de isoprenoides, *p. ej.* CoQ10, se puede seleccionar, por ejemplo, de la medición directa de isoprenoides, *p. ej.* CoQ10, mediante luz UV, HPLC, RMN o cromatografía de capa fina. La producción de

60 isoprenoides, *p. ej.* CoQ10, también se puede medir indirectamente, midiendo un incremento en la intensidad del

color carotenoide, que le resulta familiar a una persona experta en la técnica.

El hospedante transformado con el operón *mev* mutado o uno o más genes del mismo tal como de la presente invención se puede cultivar de acuerdo con métodos conocidos, a saber en un medio que contiene, por ejemplo, fuentes de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas, etc., que pueden ser asimiladas por el hospedante y bajo condiciones de temperatura, pH y ventilación adecuadas para un crecimiento y expresión eficaces del producto deseado, en particular CoQ10.

El aislamiento a partir del caldo de fermentación y/o el transformante, es decir, el microorganismo en el que se ha introducido el operón mevalonato mutado de un microorganismo perteneciente, p. ej., al género *Paracoccus* y, opcionalmente, la purificación y el procesamiento ulterior del isoprenoide obtenido, en particular CoQ10, incluidas, por ejemplo, formulaciones de CoQ10 producido de esta forma para el uso humano o animal se puede efectuar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Para uso en la salud y nutrición de los animales, sin embargo, puede no ser necesaria una purificación específica. En este caso, los isoprenoides producidos tales como CoQ10, junto con la biomasa y/u otros componentes del caldo de fermentación, se pueden procesar ulteriormente para proporcionar un producto comercialmente atractivo.

El procedimiento de la presente invención resulta en rendimientos de isoprenoides más elevados tales como, por ejemplo, CoQ10. El incremento puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente el 10% en comparación con procedimientos que utilizan una cepa no recombinante de, por ejemplo, *Rhodobacter*, o que utilizan una cepa recombinante tal como, por ejemplo, *Rhodobacter* que porta el operón *mev* de tipo salvaje de, p. ej., una cepa de *Paracoccus*.

La Figura 1 representa la vía para la biosíntesis de CoQ10 en *R. sphaeroides*, la cual utiliza la vía del MEF para la formación de IPP. La región enmarcada indica la secuencia de reacción que comprende la vía del mevalonato (que conduce a la formación de IPP), más la etapa de IPP isomerasa. La vía del mevalonato no se produce de forma natural en *R. sphaeroides*. En *P. zeaxanthinifaciens*, los genes que codifican las cinco enzimas de la vía del mevalonato más IPP isomerasa forman un operón denominado aquí en lo que sigue el operón mevalonato.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención sin restringirla de modo alguno.

Ejemplo 1: Bacterias y condiciones de cultivo

La cepa ATCC 35053 de *Rhodobacter sphaeroides* (obtenida de American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) se utilizó como el hospedante base para la construcción de cepas recombinantes con producción mejorada de CoQ10. Todas las cepas de *R. sphaeroides* se desarrollaron a 30°C en medio RS100. La composición y preparación de medio RS100 se resume en la Tabla 1. Cincuenta mg/l de canamicina se añadieron al medio para el desarrollo de las cepas recombinantes. Cepas de *E. coli* se desarrollaron a 37°C en medio LB (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.). Para el mantenimiento de plásmidos en cepas de *E. coli* recombinantes se añadieron al medio de cultivo ampicilina (100 mg/l) y/o canamicina (25-50 mg/l, dependiendo del plásmido). Cultivos líquidos de *E. coli* y *R. sphaeroides* se desarrollaron de forma rutinaria en condiciones aerobias en un agitador rotatorio a 200 rpm. Cuando se requerían medios sólidos, se añadió agar (concentración final de 1,5%).

Tabla 1. Composición y preparación de medio RS100

Medio RS100	
Componente	Cantidad (por litro de agua destilada)
Extracto de levaduras	10 g
Peptona	10 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
D-glucosa monohidrato	33 g
Los componentes 1-5 se mezclan juntos, el volumen final se ajusta a 1 litro y el pH se ajusta a 7,4 con NaOH 0,5 M. El medio base resultante se esteriliza luego mediante filtración a través de una membrana de 0,22 micras. Se añaden dos ml de cada uno de disolución estéril de microelementos y disolución estéril de CaFe (véase más abajo) para dar el medio RS100 final. Para el medio sólido, los componentes 1-5 más 15 g de agar se mezclan primero juntos y se someten a autoclave. Después de enfriar el medio hasta aproximadamente 60°C, se añaden las disoluciones estériles de microelementos y de CaFe (2 ml cada una) y el medio fundido se mezcla bien y se dispensa a placas de Petri estériles.	
Disolución de microelementos	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	80 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	6 g
MnSO ₄ · H ₂ O	2 g
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	0,2 g
EDTA	6 g
- Esterilizar mediante filtración a través de una membrana de 0,22 micras, almacenar a 4°C.	
Disolución de café	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	75 g
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	5 g
HCl (al 37%)	3,75 ml
- Esterilizar mediante filtración a través de una membrana de 0,22 micras, almacenar a 4°C.	

5 Ejemplo 2: Ensayo analítico para CoQ10

400 µl de caldo de cultivo completo (véase el Ejemplo 5) se transfirieron a un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 ml desechable. Se añadieron 4 ml de disolución de extracción estabilizada (0,5 g/l de BHT en 1:1 (v/v) de DMSO/THF) y las muestras se mezclaron durante 20 min en un agitador de laboratorio (IKA, Alemania) para potenciar la extracción. Finalmente, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a viales de vidrio ámbar para el análisis mediante HPLC de fase inversa. Este método se desarrolló para la determinación simultánea de ubiquinonas y sus correspondientes hidroquinonas, con una clara separación de CoQ10 a partir de los carotenoides fitoeno, esferoidenona, esferoideno y neurosporeno. La cromatografía se realizó utilizando un sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, EE.UU.), equipado con un dispositivo automático para la toma de muestras, controlado en temperatura, y un detector de la disposición de diodos. Los parámetros del método eran como sigue:

Columna	columna YMC Carotenoid C30 3 micras, acero, 150 mm x 3,0 mm D.I. (YMC, parte N°. CT99S031503QT)
Columna de protección	Security Guard C18 (ODS, octadecilo) 4 mm de longitud x 3,0 mm D.I. (Phenomenex, Parte N° AJO-4287)
Presión típica de la columna	60 bar al comienzo
Caudal	0,5 ml/min

Fase móvil		mezcla de acetonitrilo (A):metanol (B):TBME (C)			
Perfil de gradientes		Tiempo (min)	%A	%B	%C
5		0	60	15	25
		13	60	15	25
		20	00	100	
		22	60	15	25
		25	60	15	25
10	Tiempo de arranque	4 min			
	Volumen de inyección	10 µl			
	Temperatura de la columna	15°C			
15	Detección	Se utilizaron tres longitudes de onda para la detección de compuestos específicos de acuerdo con la Tabla 2.			

Tabla 2. Tiempos de retención por HPLC y longitudes de onda utilizados

Compuesto	Longitud de onda (nm)	Tiempos de retención (min)
Fitoeno	280	7,9
Ubiquinol-10	210	11,3
CoQ10	210	12,6
Esferoidenona (isómeros Z)	450	10,6, 13,0, 14,6, 18,7
E-esferoidenona	450	19,1
E-neurosporeno	450	20,4
E-esferoideno	450	20,6

Cálculos: Los cálculos se basaron en áreas de pico

Ejemplo 3: Clonación del operón *mev* mutado a partir de *P. zeaxanthinifaciens*

Construcción de plásmidos pBBR-K-*mev*-op-wt y pBBR-K-*mev*-op-R114

La construcción del plásmido pBBR-K-*mev*-op-up-4 (plásmido que contiene los primeros 4 genes del operón mevalonato) se describen en detalle en el Ejemplo 13 (página 105, línea 10 a página 106, línea 8) del documento WO 02/099095.

Utilizando ADN genómico de *P. zeaxanthinifaciens* R114 como molde, se realiza la PCR con cebadores hcs-5326 (SEQ ID NO: 9) y mvd-9000 (SEQ ID NO: 10). El cebador hcs-5326 corresponde a la secuencia del operón *mev* de *P. zeaxanthinifaciens* desde el nucleótido 3321 a 3340 de SEQ ID NO: 2, mientras que el cebador mvd-9000 corresponde al complemento inverso de la secuencia desde los nucleótidos 6977 a 6996 de SEQ ID NO: 2. El producto de PCR obtenido de 3675 pb se clona en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), dando como resultado el plásmido TOPO-pCR2.1-*mev*-op-d-3wt. Así, este plásmido contiene la mitad situada aguas abajo del operón mevalonato, incluido el extremo 3' de *hcs* y los últimos tres genes, *mvk*, *pmk* y *mvd*.

Los plásmidos pBBR-K-*mev*-op-up-4 y TOPO-pCR2.1-*mev*-op-d-3wt se digieren con las endonucleasas de restricción *SacI* y *NdeI*, y el fragmento de 3319 pb resultante de TOPO-pCR2.1-*mev*-op-d-3wt se liga con el fragmento de 8027 pb procedente de pBBR-K-*mev*-op-up-4. El plásmido resultante, pBBR-K-*mev*-op-R114, contiene el operón mevalonato completo procedente de *P. zeaxanthinifaciens* R114, incluido su promotor (putativo).

Construcción de los plásmidos pBBR-K-*mev*-op-wt-*PcrtE-crtE* y pBBR-K-*mev*-op-R114-*PcrtE-crtE*

La construcción del plásmido pBBR-K-*PcrtE-crtE* se describe en detalle en el Ejemplo 6 (página 92, líneas 10-17) del documento WO 02/099095. El plásmido pBBR-K-*PcrtE-crtE* se cortó con *NaeI*, y el fragmento de 1,33 kb se aisló e insertó en el sitio *Ecl136II* de pBBR-K-*mev*-op-up-4. Se verificó la orientación del inserto, y el plásmido que portaba el gen *crtE* en la misma orientación que los genes del operón mevalonato se designó pBBR-K-*mev*-op-up-4-*PcrtE-crtE*-2.

El plásmido pBBR-K-*mev*-op-up-4-*PcrtE-crtE*-2 se cortó con *SphI* y *SpeI* y se aisló el fragmento de 5566 pb

resultante que contenía el gen *crtE*. Este fragmento se ligó con el fragmento *SphI-SpeI* de 7132 pb obtenido después de una digestión por restricción de pBBR-K-*mev*-op-wt o pBBR-K-*mev*-op-R114, utilizando las mismas enzimas, resultando en el plásmido pBBR-K-*mev*-op-wt-*PcrtE-crtE* y pBBR-K-*mev*-op-R114-*PcrtE-crtE*, respectivamente.

5 Construcción de los plásmidos pBBR-K-*mev*-op-wt-*PcrtE-ddsA_{wt}* y pBBR-K-*mev*-op-R114-*PcrtE-ddsA_{wt}*

La construcción del plásmido pBBR-K-*PcrtE* se describe en detalle en el Ejemplo 6 (página 91, líneas 12-27) del documento WO 02/099095.

10 El gen *ddsA* de la cepa ATCC 21588 de *P. zeaxanthinifaciens* (designada *ddsA_{wt}*) se amplificó mediante PCR (sistema PCR rico en GC, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) utilizando los cebadores *dds-Nde* (SEQ ID NO: 11) y *dds-Bam* (SEQ ID NO: 12) y se clonó en pCR2.1-TOPO (invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) para dar como resultado el plásmido TOPO-*ddsA_{wt}*.

15 El plásmido TOPO-*ddsA_{wt}* se cortó con *NdeI* y *BamHI*, y el fragmento de 1005 pb obtenido, que contenía el gen *ddsA*, se clonó en el plásmido pBBR-K-*PcrtE* cortado con *NdeI* y *BamHI*, dando como resultado el plásmido pBBR-K-*PcrtE-ddsA_{wt}*. Se eliminó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *EcoRI* dentro del gen *ddsA* introduciendo una mutación silenciosa con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange XL (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) utilizando los oligonucleótidos *dds-R-1* (SEQ ID NO: 13) y *dds-R-2* (SEQ ID NO: 14). El plásmido pBBR-K-*PcrtE-ddsA_{wt}*-R resultante se cortó con *EcoRI* y *MamI*, y el fragmento de 1278 pb que contenía el gen *ddsA* se insertó en TOPO-*ddsA_{wt}*, cortado con *EcoRI* y *EcoRV*, dando como resultado el plásmido pCR2.1-TOPO-*ddsA_{wt}*-R. Este plásmido se cortó con *CeII* y *XbaI*, y el fragmento de 1211 pb obtenido que contenía el gen *ddsA* se ligó con un fragmento de restricción de 11,6 kb obtenido de la digestión de pBBR-K-*mev*-op-wt-*PcrtE-crtE* y pBBR-K-*mev*-op-R114-*PcrtE-crtE*, respectivamente, con *CeII* y *BlnI*. Los plásmidos resultantes se denominaron pBBR-K-*mev*-op-wt-*PcrtE-ddsA_{wt}* y pBBR-K-*mev*-op-R114-*PcrtE-ddsA_{wt}*, respectivamente.

Construcción del plásmido pBBR-K-*mev*-op-4-89-*PcrtE-ddsA_{wt}*

30 El plásmido pBBR-K-*mev*-op-4-89-*PcrtE-ddsA_{wt}* se obtiene mediante dos rondas de mutagénesis dirigida al sitio por PCR utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange XL (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) y los cebadores *mut4-89-1-fw* (SEQ ID NO: 15) y *mut4-89-1-rev* (SEQ ID NO: 16). Ambos cebadores son complementarios uno con otro y contienen la mutación A deseada en lugar de C en la posición 2949 de SEQ ID NO: 23, correspondiente a la posición 268 de SEQ ID NO: 4. La primera reacción de mutagénesis se ajusta como sigue de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 5 µl de tampón de reacción 10x, 10 ng de ADN de plásmido pBBR-K-*mev*-op-wt-*PcrtE-ddsA_{wt}*, 125 ng del cebador *mut4-89-1-fw*, 125 ng de *mut4-89-1-rev*, 1 µl de mezcla de dNTP, 3 µl de QuikSolution y 2,5 U de ADN polimerasa Pfu Turbo se mezclan en un volumen final de 50 µl. La ciclación se lleva a cabo utilizando los siguientes parámetros: 1 ciclo: 95°C durante 1 min; 18 ciclos: 95°C durante 50 s, 60°C durante 50 s, 68°C durante 30 min; 1 ciclo: 68°C durante 7 min. Después de enfriar la mezcla de reacción hasta 37°C, se añaden 10 U de la endonucleasa de restricción *DpnI*, y la reacción se incuba a 37°C durante 2 horas. Células de *Escherichia coli* XL10-Gold Ultracompetent (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) se transforman con el ADN tratado con *DpnI* de acuerdo con el protocolo del fabricante.

45 El plásmido pBBR-K-*mev*-op-4-89-1-*PcrtE-ddsA_{wt}* resultante se aísla y se utiliza como ADN de molde para una segunda ronda de mutagénesis dirigida al sitio por PCR, utilizando los cebadores *mut4-89-2-fw* (SEQ ID NO: 17) y *mut4-89-2-rev* (SEQ ID NO: 18) que contienen la mutación deseada C en lugar de T en la posición 6948 de SEQ ID NO: 23. La mutagénesis se lleva a cabo como se describe anteriormente. El plásmido pBBR-K-*mev*-op-4-89-*PcrtE-ddsA_{wt}* obtenido se aisló y secuenció en Microsynth GmbH (Balgach, Suiza). La secuencia completa del operón *mev* mutado se representa en la SEQ ID NO: 23, que comprende los siguientes genes: *mvaA* (que codifica la hidroximetilglutaril-CoA reductasa) en la posición 617 a 1639, *idi* (que codifica la isopentenil difosfato isomerasa) en la posición 1636 a 2685, *hcs* (que codifica la hidroximetilglutaril-CoA sintasa) en la posición 2682 a 3848, *mvk* (que codifica la mevalonato quinasa) en la posición 3829 a 4965, *pmk* (que codifica la fosfomevalonato quinasa) en la posición 4965 a 5882 y *mvd* (que codifica la difosfomevalonato descarboxilasa) en la posición 5875 a 6873.

Ejemplo 4: Introducción del operón *mev* mutado en *R. sphaeroides* ATCC 35053

55 La transformación de *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, Bio/Technology 11, 784-791, 1983) con plásmidos que portan el operón *mev* mutado y la subsiguiente transferencia de plásmidos de *E. coli* S17-1 a *R. sphaeroides* ATCC 35053 mediante conjugación, se realizaron utilizando procesos convencionales (Nishimura *et al.*, Nucl. Acids Res. 18, 6169, 1990; Simon *et al.*, Bio/Technology 1983, 784-91).

Un mutante de *R. sphaeroides* ATCC 35053 resistente a rifampicina, espontáneo, se aisló primero desarrollando la cepa ATCC 35053 en medio líquido RS100 suplementado con 100 mg/l de rifampicina, extendiendo las células en placas de RS100 que contenían 100 mg/l de rifampicina y aislando una colonia individual. Para la conjugación, se sedimentaron mediante centrifugación partes alícuotas de un mililitro de cultivos de las células receptoras (*R. sphaeroides* ATCC 35053 resistente a rifampicina) desarrolladas en medio RS100 que contenía 100 mg/l de rifampicina y las células donantes (*E. coli* S17-1 que portan el plásmido a transferir, desarrolladas en caldo LB que contenía 50 mg/l de canamicina). El sobrenadante se desechó y las células se lavaron dos veces con medio RS100 reciente para separar los antibióticos. Cada uno de los sedimentos se resuspendió luego en 1 ml de medio RS100 reciente. Cincuenta microlitros de células donantes y 0,45 ml de células receptoras se mezclaron, se sedimentaron mediante centrifugación, se resuspendieron en 0,03 ml de medio RS100 reciente y se esparcieron sobre una placa de RS100. Después de incubación durante una noche a 30°C, las células fueron recolectadas con un asa de inoculación y se resuspendieron en 0,3 ml de medio RS100. Diluciones de esta suspensión se esparcieron sobre placas de RS100 que contenían 100 mg/l de rifampicina y 50 mg/l de canamicina y se incubaron a 30°C. Las colonias (células putativas transformadas de *R. sphaeroides* ATCC 35053) se recogieron de las placas, se desarrollaron en medio líquido RS100 que contenía 50 mg/l de canamicina y se sometió a ensayo la presencia del plásmido en una reacción de PCR con una temperatura de re-asociación de 56°C y un tiempo de alargamiento de 1 min, 15 s, utilizando los siguientes dos pares de cebadores diferentes:

pBBR-K-up (SEQ ID NO: 19)/PcrtE-2442 (SEQ ID NO: 20)

Kan3out (SEQ ID NO: 21)/mvaA3256 (SEQ ID NO: 22)

Clones positivos se extendieron sobre placas de RS100 que contenían 50 mg/l de canamicina para obtener colonias individuales. Una colonia individual procedente de cada uno de los clones se desarrolló de nuevo en medio líquido RS100 que contenía 50 mg/l de canamicina, y la presencia del plásmido esperado se confirmó mediante PCR según se describe arriba. La cepa recombinante resultante se denominó ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-ddsA_{wt}.

Ejemplo 5: Producción de CoQ10 en cepas transformadas de *R. sphaeroides* ATCC 35053

Las cepas de *R. sphaeroides* ATCC 35053, ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-R114-PcrtE-ddsA_{wt} y ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-ddsA_{wt} se desarrollaron en cultivos en matraces agitados en medio RS100. Los cultivos que contenían la *R. sphaeroides* recombinante contenían 50 mg/l de canamicina. Cultivos de veinticinco mililitros se desarrollaron a 30°C en matraces Erlenmeyer con deflectores de 250 ml con agitación a 200 rpm. Para someter a ensayo la producción de CoQ10, se utilizaron cultivos patrón glicerolizados congelados de las cepas de *R. sphaeroides* para inocular cultivos de siembra de 25 ml. Después del desarrollo de los cultivos de siembra durante 24-28 horas, se utilizaron volúmenes adecuados de los cultivos para inocular los matraces experimentales de modo que la densidad óptica inicial a 660 nanómetros (DO₆₆₀) era 0,16. Se tomaron asépticamente muestras de dos mililitros a intervalos de 24 horas. Los análisis incluían el desarrollo (medido como DO₆₆₀), pH, glucosa, en el sobrenadante del cultivo y CoQ10 y carotenoides (determinados mediante HPLC) según se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Estos resultados demuestran claramente que la expresión del operón mevalonato mutado clonado procedente de *P. zeaxanthinifaciens* mejoraba significativamente la producción de CoQ10 en *R. sphaeroides*.

Tabla 3. Producción de CoQ10 en cepas ATCC 35053 de *R. sphaeroides* transformadas

Cepa	Tiempo (h)	mg/l	CoQ10
			Formación específica ¹
ATCC 35053	24	34,4	1,2
ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-R114- <i>PcrE-ddsA_{wt}</i>	24	49,5	2,1
ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-4-89- <i>PcrE-ddsA_{wt}</i>	24	57,7	2,3
ATCC 35053	48	56,0	2,0
ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-R114- <i>PcrE-ddsA_{wt}</i>	48	128,4	3,8
ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-4-89- <i>PcrE-ddsA_{wt}</i>	48	148,9	4,4
ATCC 35053	72	62,3	2,2
ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-R114- <i>PcrE-ddsA_{wt}</i>	72	150,3	4,6
ATCC 35053/pBBR-K-mev-op-4-89- <i>PcrE-ddsA_{wt}</i>	72	166,4	5,0

5 ¹La formación específica se expresa como mg/l de CoQ10 producida/DO₆₆₀.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	DSM IP Assets B.V.	
5	<120>	Producción de isoprenoides	
	<130>	Case 22259	
	<160>	23	
10	<170>	PatentIn version 3.2	
	<210>	1	
	<211>	7096	
15	<212>	ADN	
	<213>	Paracoccus zeaxanthinifacines ATCC 21588	
	<400>	1	
		cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa	60
		gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgctgcttt acggtatcgc cgctcccgat	120
		tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggt	180
		tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg	240
		ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttcggga cgccggctgg atgatcctcc	300
		agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccca tgggcaaata ttatacgcaa	360
		ggcgacaagg tgctgatgcc gctggcgatt caggttcacg atgccgtttg tgatggcttc	420
		catgtcggca gaatgcttaa tgaattacaa cagtttttat gcaacgcgtc gaaccgcccg	480
		tccgacgccg gtttccgcac ggaaacgcgc ggcaagtga cataacttgc acgcgacgtc	540
		tcgattctgc ccgcgaagaa tgcgatgcat ccagatgatg cagaacgaag aagcggaagc	600
		gcccgtagaa gaccagatga tttcccatc cccggtgcc acgcaatggg tcggcccgat	660
		cctgttccgc ggccccgtcg tcgagggccc gatcagcgcg ccgctggcca cctacgagac	720
		gccgctctgg ccctcgaccg cgcggggggc aggggtttcc cggcattcgg gcgggatcca	780
		ggtctcgctg gtcgacgaac gcatgagccg ctcgatcgcg ctgcggggcg atgacggggc	840
		ggcggcgacc gccgcctggc agtcgatcaa ggccccccag gaagaggtcg cggccgtggt	900
		cgccaccacc agccgcttcg cccgccttgt cgagctgaat cgccagatcg tgggcaacct	960
		gctttacatc cgcategaat gcgtgacggg cgacgcctcg ggtcacaaca tggtcaccaa	1020
		ggccgcccag gccgtgcagg gctggatcct gtcggaatac ccgatgctgg cctattccac	1080
		gatctcgggg aacctgtgca ccgacaagaa ggcgtcggcg gtcaacggca tcctggggcg	1140
		cggcaaatac gccgtgcggc aggtcgagat cccgcgcaag atcctgacct gcgtgctgcg	1200
		caccagcgcc gagaagatgg tccgcctgaa ctacgagaag aactatgtcg ggggtacgct	1260

ggcggggtcg ctgcgcagtg cgaacgcgca tttcgccaac atgctgctgg gcttctacct 1320
 ggcgacgggg caggacgcgg ccaacatcat cgaggccagc cagggttcg tccattgcga 1380
 ggccccgcggc gaggatctgt atttctctgt cacgctgccc aacctcatca tgggctcggt 1440
 cgggtgccggc aagggcatcc cctcgatcga ggagaacctg tcgcggtatgg gctgccgcca 1500
 gccgggcgaa cccggcgaca acgcgcgccc tcttgcgggc atctgcgcgg gcgtcgtgct 1560
 gtgtggtgaa ttgtcgtgc ttgcgggcca gaccaacccc ggagagttgg tccgcacca 1620
 catggagatg gagcgatgac cgacagcaag gatcaccatg tcgcggggcg caagctggac 1680
 catctgcgtg cattggacga cgatgcggat atcgaccggg gcgacagcgg cttcgaccgc 1740
 atcgcgctga cccatcgcg cctgcccagag gtggatttcg acgccatcga cacggcgacc 1800
 agcttcctgg gccgtgaact gtccttcccg ctgctgatct cgtccatgac cggeggcacc 1860
 ggcgaggaga tcgagcgcat caaccgcaac ctggccgctg gtgccgagga ggccccgcgtc 1920
 gccatggcgg tgggctcgca gcgcgtgatg ttcaccgacc cctcggcgcg ggccagcttc 1980
 gacctgcgcg cccatgcgcc caccgtgccg ctgctggcca atatcggcgc ggtgcagctg 2040
 aacatggggc tggggctgaa ggaatgcctg gccgcgatcg aggtgctgca ggcgacggc 2100
 ctgtatctgc acctgaaccc cctgcaagag gccgtccagc ccgaggggga tcgcgacttt 2160
 gccgatctgg gcagcaagat cgcggccatc gcccgcgacg tteccgtgcc cgtectgctg 2220
 aaggaggtgg gctgcggcct gtcggcgggc gatatcgcca tcgggctgcg cgccgggatc 2280
 cggcatttcg acgtggccgg tcgcgggcgc acatectgga gccggatcga gtatcgccgc 2340
 cgccagcggg ccgatgacga cctgggcctg gtcttcagg actggggcct gcagaccgtg 2400
 gacgcctgc gcgaggcgc gcccgcgctt gcggcccatg atggaaccag cgtgctgac 2460
 gccagcggcg gcatecgcaa cgtgtcgac atggcgaaat gcgtcatcct gggggccgac 2520
 atgtgcgggg tcgccgcgc cctgctgaaa ggggccccaa actcgcgca ggcggttga 2580
 tccgccatcc ggaaactgca tctggagttc cggacagcea tgttcctcct gggttgcggc 2640
 acgcttgccg acctgaagga caattcctcg cttatccgtc aatgaaagt cctaagatga 2700
 ccgtgacagg aatcgaagcg atcagcttct acacccccca gaactacgtg ggactggata 2760
 tccttgccgc gcatacggg atcgaccccc agaagttctc gaaggggatc gggcaggaga 2820
 aaatcgcact gcccgccat gacgaggata tcgtgaccat ggccgcccag gccgcgctgc 2880
 cgatcatcga acgcgcgggc acgcagggca tcgacacggt tctgttcgcc accgagagcg 2940
 ggatcgacca gtcgaaggcc gccgccatct atctgcgcgg cctgctggac ctgtcgccca 3000

actgccgttg cgtcgagctg aagcaggcct gctattccgc gacggcggcg ctgcagatgg 3060
cctgcgcgca tgtcgcccg c aagcccgacc gcaagggtgt ggtgatcgcg tccgatgtcg 3120
cgcgctatga ccgcgaaagc tggggcgagg cgacgcaggg tgcgggcgcc gtcgccatcc 3180
ttgtcagcgc cgatcccaag gtggccgaga tcggcacctg ctcggggctg ttcaccgagg 3240
atatcatgga tttctggcgg ccgaaccacc gccgcacgcc cctgttcgac ggcaaggcat 3300
cgacgctgcg ctatctgaac gcgctggctg aggcgtggaa cgactatcg cgaatggcg 3360
gccacgagtt cgccgatttc gcgcatttct gctatcacgt gccgttctcg cggatggcg 3420
agaaggcgaa cagccacctg gcccaaggcg acaagacgcc ggtggacatg gggcagggtg 3480
agacgggcct gatctacaac cggcaggctg ggaactgcta taccgggtcg atctacctgg 3540
cattcgctc gctgctggag aacgctcagg aggacctgac cggcgcgctg gtcgggtctgt 3600
tcagctatgg ctcggtgcg acgggcgaat tcttcgatgc gcggatcgcg cccggttacc 3660
gcgaccacct gttcgcgga cgcctatcg aattgctgca ggatcgacg cccgtcacat 3720
atgacgaata cgttgccctg tgggacgaga tcgacctgac gcagggcgcg cccgacaagg 3780
cgcgcggctg tttcaggctg gcaggatcg aggcagagaa gcgcatctat gtcgaccggc 3840
aggcctgaag caggcgccca tgccccgggc aagctgatec tgtccgggga acattccgtg 3900
ctctatggtg cgcgcgcgt tgccatggcc atcgcccgct ataccgaggt gtggttcacg 3960
ccgcttgga ttggcgagg gatacgacg acattcgcca atctctcggg cggggcgacc 4020
tattcgctga agctgctgtc ggggttcaag tcgcggctgg accgccggtt cgagcagttc 4080
ctgaacggcg acctaaagg gcacaaggtc ctgacctatc ccgacgatct ggcgggtctat 4140
gcgctggcgt cgcttctgca cgacaagccg ccggggacgg ccgcgatgcc gggcatcggc 4200
gcgatgcacc acctgcccg accgggtgag ctgggcagcc ggacggagct gcccatcggc 4260
gcgggcatgg ggtcgtctgc ggccatcgtc gcggccacca cggtcctgtt cgagacgctg 4320
ctggaccggc ccaagacgcc cgaacagcgc ttcgaccgcg tccgcttctg cgagcgggtg 4380
aagcacggca aggcgggtcc catcgacgcg gccagcgtcg tgcgcggcg gcttgtccgc 4440
gtgggcggga acgggcggg ttcgatcagc agcttcgatt tgcccaggga tcacgacctt 4500
gtcgcgggac gcggctggtg ctgggtactg cacgggcgcc ccgtcagcgg gaccggcgaa 4560
tgcgtcagcg cggtcgcggc ggcgcatggt cgcgatcgcg cgtgtggga cgccttcgca 4620
gcctgcaccc gcgcgttgga ggccgcgctg ctgtctgggg gcagccccga cgccgccatc 4680
accgagaacc agcgctgct ggaacgcac gccgtcgtgc cggcagcgac gcaggccctc 4740
gtggcccaga tcgaggaggc ggggtggcg gcgaagatct gcggcgagg ttcggtgcgg 4800

ggcgatcacg gcggggcggt cctcgtgcgg attgacgacg cgcaggcgat ggcttcggtc 4860
 atggcgcgcc atccccacct cgactgggcg cccctgcgca tgtcgcgcac gggggcgcca 4920
 cccggccccg cgccgcgtgc gcaaccgctg ccggggcagg gctgatggat caggatcatcc 4980
 gcgccagcgc gccgggttcg gtcattgatca cgggcgaaca tgccgtggtc tatggacacc 5040
 gcgccatcgt cgccgggata gagcagcgcg cccatgtgac gatcgtcccg cgtgccgacc 5100
 gcatgttttcg catcacctcg cagatcgggg cgccgcagca ggggtcgtcg gacgatctgc 5160
 ctgcggggcg gacctatcgc ttcgtgctgg ccgccatcgc gcgacacgcg ccggacctgc 5220
 cttgcgggtt cgacatggac atcacctcgg ggatcgatcc gaggtcggg cttggatcct 5280
 cggcggcggt gacggtcgcc tgccctggcg cgctgtcgcg gctggcgggg cgggggaccg 5340
 aggggctgca tgacgacgcg ctgcgcacgc tccgcgccat ccagggcagg ggcagcgggg 5400
 ccgatctggc ggccagcctg catggcggtt tcgtcgcta tcgcgcgcc gatggcggtg 5460
 ccgcgcagat cgaggcgctt ccggtgccgc cggggccgtt cggcctgcgc tatgcgggct 5520
 acaagacccc gacagccgag gtgctgcgcc ttgtggccga tcggatggcg ggcaacgagg 5580
 ccgcttttga cgcgtcttac tcccggatgg gcgcaagcgc agatgcccg atccgcggg 5640
 cgcaagggtt ggactgggtt gcattccacg acgcgtgaa cgaataaccg cgcctgatgg 5700
 agcagctggg cgtgtccgac gacacgctgg acgcgatcat ccgcgaggcg cgcgacgcg 5760
 gcgccgcagt cgccaagatc tccggctcgg ggctggggga ttgcgtgctg gactgggcg 5820
 accagcccaa gggtttcgtg cccgcaagca ttgccgagaa gggacttgtt ttcgatgact 5880
 gatgccgtcc gcgacatgat cgcccggtgc atggcgggcg cgaccgacat ccgagcagcc 5940
 gaggttatatg cgcccagcaa catcgcgctg tcgaaatact ggggcaagcg cgacgccg 6000
 cggaaccttc cgctgaacag ctccgtctcg atctcgttgg cgaactgggg ctctcatacg 6060
 cgggtcgagg ggtccggcac gggccacgac gaggtgcata acaacggcac gctgctggat 6120
 ccgggcgaeg ccttcgcgcg ccgcgcgttg gcattcgctg acctgttccg gggggggagg 6180
 cacctgccgc tgccgatcac gacgcagaac tcgatccga cggcgggggg gcttgccctcg 6240
 tcggcctcgg ggttcgcggc gctgaccggt gcgctggcgg gggcgttcgg gctggatctg 6300
 gacgacacgg atctgagccg catcgcccg atcggcagtg gcagcgccgc ccgctcgatc 6360
 tggcacgggt tcgtccgctg gaaccggggc gaggccgagg atgggcatga cagccacggc 6420
 gtcccgttgg acctgcgctg gcccggttcc cgcatcgcca tcgtggccgt ggacaagggg 6480
 cccaagcctt tcagttcgcg cgacggcatg aaccacacgg tcgagaccag cccgctgttc 6540

ccgccctggc ctgcgcaggc ggaagcggat tgccgcgtca tcgaggatgc gatcgccgcc 6600
 cgcgacatgg ccgccctggg tccgcgggtc gaggcgaacg cccttgcgat gcacgccacg 6660
 atgatggccg cgcgccccgc gctctgtac ctgacgggcg gcagctggca ggtgctggaa 6720
 cgctgtggc agggccgcgc ggacgggctt gcggcctttg cgacgatgga tgccggcccg 6780
 aacgtcaagc tgatcttcga ggaaagcagc gccgcgcagc tgctgtacct gttccccgac 6840
 gccagcctga tcgcgccgtt cgaggggctt tgaacgcgta agacgaccac tgggtaaggt 6900
 tctgccgcgc gtggtctcga ctgcctgcaa agaggtgctt gagttgctgc gtgactgcgg 6960
 cggccgactt cgtgggactt gcccgccacg ctgacgaagg gcgaattcca gcacactggc 7020
 ggccgttact agttctagag cgccgccac cgcggtggag ggccggcacct cgctaacgga 7080
 ttcaccgttt ttatca 7096

<210> 2
 <211> 7096
 <212> ADN
 <213> Paracoccus sp. R114

<400> 2
 cggctgggtg tggeggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa 60
 gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctgctgcttt acggtatcgc cgctcccgat 120
 tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctgggggt 180
 tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaccc tgccatcacg agatttcgat tccaccgcgc 240
 ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggettg atgatcctcc 300
 agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccca tgggcaaata ttatacgcaa 360
 ggcgacaagg tgctgatgcc gctggcgatt caggttcacg atgccgtttg tgatggcttc 420
 catgtcggca gaatgcttaa tgaattacaa cagtttttat gcaacgcgtc gaaccgcccg 480
 tccgacgccg gtttccgcac ggaaacgcgc ggcaagttga cataacttgc acgcgacgtc 540
 tcgattctgc ccgcaagaa tgcgatgcat ccagatgatg cagaacgaag aagcgggaagc 600
 gcccgtgaaa gaccagatga tttccatac cccggtgccc acgcaatggg tcggcccgat 660
 cctgttccgc ggccccgtcg tcgagggccc gatcagcgcg ccgctggcca cctacgagac 720
 gccgctctgg ccctcgaccg cgcggggggc aggggtttcc cggcattcgg gcgggatcca 780
 ggtctcgtcg gtcgacgaac gcatgagccg ctcgatcgcg ctgcggggcg atgacggggc 840
 ggccggcgacc gccgcctggc agtcgatcaa ggcccgccag gaagaggtcg cggccgtggt 900
 cgccaccacc agccgcttcg cccgccttgt cgagctgaat cgccagatcg tgggcaacct 960

gctttacatc cgcacatgaat gcgtgacggg cgacgcctcg ggtcacaaca tggtcaccaa	1020
ggccgcccag gccgtgcagg gctggatcct gtcggaatac ccgatgctgg cctattccac	1080
gatctcgggg aacctgtgca ccgacaagaa ggcgtcggcg gtcaacggca tcctggggcg	1140
cggcaaatac gccgtcgccg aggtcgagat cccgcgcaag atcctgaccc gcgtgctgcg	1200
caccagcgcc gagaagatgg tccgcctgaa ctacgagaag aactatgtcg ggggtacgct	1260
ggcggggctg ctgcgcagtg cgaacgcgca tttcgccaac atgctgctgg gcttctacct	1320
ggcgacgggg caggacgcgg ccaacatcat cgaggccagc cagggtctcg tccattgega	1380
ggcccgcggc gaggatctgt atttctcgtg cacgctgccc aacctcatca tgggtcgggt	1440
cgggtgccggc aagggcatcc cctcgatcga ggagaacctg tcgcggatgg gctgccgcca	1500
gccggggcga cccggcgaca acgcgcgccc tcttgccggc atctgcgcgg gcgtcgtgct	1560
gtgtggtgaa ttgtcgtgc ttgcggccca gaccaacccc ggagagttgg tccgcaccca	1620
catggagatg gagcgatgac cgacagcaag gatcaccatg tcgcggggcg caagctggac	1680
catctgcgtg cattggacga cgatgcggat atcgaccggg gegacagcgg ctctgaccgc	1740
atcgcgctga cccatcgcg cctgcccag gtaggatttcg acgccatcga cacggcgacc	1800
agcttctctg gccgtgaact gtccttcccg ctgetgatct cgtccatgac cggcggcacc	1860
ggcgaggaga tcgagcgcat caaccgcaac ctggccgctg gtgccgagga ggcccgcgtc	1920
gccatggcgg tgggctcgca gcgcgtgatg ttcaecgacc cctcggcgcg ggccagcttc	1980
gacctgcgcg cccatgcgcc caccgtgccg ctgctggcca atatcggcgc ggtgcagctg	2040
aacatggggc tggggctgaa ggaatgcctg gccgcgatcg aggtgctgca ggcgacggc	2100
ctgtatctgc acctgaaccc cctgcaagag gccgtccagc ccgaggggga tcgcgacttt	2160
gccgatctgg gcagcaagat cgcggccatc gcccgcgacg ttcccgctgc cgtcctgctg	2220
aaggaggtgg gctgcggcct gtcggcgggc gatatcgcca tcgggctgcg cgcggggatc	2280
cggcatttcg acgtggccgg tcgcggcggc acatcctgga gccggatcga gtatcgccgc	2340
cgccagcggg ccgatgacga cctgggcctg gtcttccagg actggggcct gcagaccgtg	2400
gacgccctgc gcgaggcgcg gcccgcgctt gcggcccatg atggaaccag cgtgctgac	2460
gccagcggcg gcatccgcaa cgggtgacac atggcgaaat gcgtcatcct gggggccgac	2520
atgtgcgggg tcgccgcgc cctgctgaaa gcggcccaaa actcgcgcga ggcggttgta	2580
tccgccatcc ggaaactgca tctggagttc cggacagcca tgttctcct gggttgcggc	2640
acgcttgccg acctgaagga caattcctcg cttatccgtc aatgaaagt cctaagatga	2700
ccgtgacagg aatcgaagcg atcagcttct acacccccca gaactacgtg ggactggata	2760

tccttgccgc gcatcacggg atcgaccccg agaagttctc gaaggggatc gggcaggaga	2820
aaatcgcaact gcccggccat gacgaggata tcgtgacat ggccgcccag gccgcgctgc	2880
cgatcatcga acgcgcgggc acgcagggca tcgacacggt tctgttcgcc accgagagcg	2940
ggatcgacca gtcgaaggcc gccgccatct atctgcgcgc cctgctggac ctgtcgccca	3000
actgccgttg cgtcgagctg aagcaggcct gctattccgc gacggcggcg ctgcagatgg	3060
cctgcgcgca tgtcgcccgc aagcccagcc gcaagggtgt ggtgatcgcg tccgatgtcg	3120
cgcgctatga ccgcgaaagc tcgggcgagg cgacgcaggg tgccggcgcc gtcgccatcc	3180
ttgtcagcgc cgatcccaag gtggccgaga tcggcaccgt ctccgggctg ttcaccgagg	3240
atatcatgga tttctggcgg ccgaaccacc gccgcacgcc cctgttcgac ggcaaggcat	3300
cgacgctgcg ctatctgaac gcgctggctg aggcgtggaa cgactatcgc gcgaatggcg	3360
gccacgagtt cgccgatttc gcgcatttct gctatcacgt gccgtttctg cggatgggcg	3420
agaaggcgaa cagccacctg gccaaaggcg acaagacgcc ggtggacatg gggcagggtgc	3480
agacgggcct gatctacaac cggcaggctg ggaactgcta taccgggtcg atctacctgg	3540
cattcgccctc gctgctggag aacgctcagg aggacctgac cggcgcgctg gtcgggtctgt	3600
tcagctatgg ctccgggtcg acggggcgaat tcttcgatgc gcggatcgcg cccggttacc	3660
gcgaccacct gttcgcggaa cgccatcgcg aattgctgca ggatcgcacg cccgtcacat	3720
atgacgaata cgttgccctg tgggacgaga tcgacctgac gcagggcgcg cccgacaagg	3780
cgcgcggtcg tttcaggctg gcaggtatcg aggacgagaa gcgcatttat gtcgaccggc	3840
aggcctgaag caggcgccca tgccccgggc aagctgatcc tgtccgggga acattccgtg	3900
ctctatggtg cgcccgcgct tgccatggcc atcgcccgt ataccgaggt gtggttcacg	3960
ccgcttggca ttggcgaggg gatacgcacg acattcgcca atctctcggg cggggcgacc	4020
tattogetga agctgctgtc ggggttcaag tcgcggctgg accgccggtt cgagcagttc	4080
ctgaacggcg acctaaaggc gcacaaggte ctgaaccatc ccgacgatct ggcggtctat	4140
gcgctggcgt cgcttctgca cgacaagccg ccggggaccg ccgcgatgcc gggcatcggc	4200
gcgatgcacc acctgcccg accgggtgag ctgggcagcc ggaaggagct gcccatcggc	4260
gcgggcatgg ggtcgtctgc ggccatcgtc gcggccacca cggctctgtt cgagacgctg	4320
ctggaccggc ccaagacgcc cgaacagcgc ttcgaccgeg tccgcttctg cgagcggttg	4380
aagcacggca aggccggtcc catcgacgcg gccagcgctg tgccggggcg gcttgtccgc	4440
gtggggcgga acggggccggg ttcgatcagc agcttcgatt tgcccaggga tcacgacctt	4500

gtcgcggggac gcggttggtg ctgggtactg cacggggcgcc ccgtcagcgg gaocggcgaa 4560

tgcgtcagcg cggtcgcggc ggccgatggt cgcgatgcgg cgctgtggga cgccttcgca 4620

gtctgcaccc gcgcgttgga ggccgcgctg ctgtctgggg gcagccccga cgcgcgcatc 4680

accgagaacc agcgcttgcg ggaacgcacg ggcgctcgtg cggcagcgac gcaggccctc 4740

gtggcccaga tcgaggaggc ggggtggcgg gccaaagatct gcggcgaggg ttccgtgcgg 4800

ggcgatcacg gcggggcggt cctcgtgcgg attgacgacg cgcaggcgat ggcttcggtc 4860

atggcgcgcc atcccgacct cgactgggcg cccctgcgca tgcgcgcac gggggcgcca 4920

cccgcccccg cgcgcgctg gcaaccgctg ccggggcagg gctgatggat caggatcatc 4980

gcgccagcgc gccgggttcg gtcgatgatca cgggcgaaca tgccgtggtc tatggacacc 5040

gcgccatcgt cgcggggatc gagcagcgcg cccatgtgac gatcgtcccg cgtgccgacc 5100

gcattgtttcg catcacctcg cagatcgggg cgcgcgagca ggggtcgtg gacgatctgc 5160

ctgcggggcg gacctatcgc ttcgtgctgg ccgccatcgc gcgacacgcg ccggacctgc 5220

cttgcggggt cgacatggac atcacctcgg ggatcgatcc gaggctcggg cttggatcct 5280

cggcgcggtg gacggtcgcc tgccctggcg cgctgtcgcg gctggcgggg cgggggaccg 5340

aggggctgca tgacgacgcg ctgcgcacgc tccgcgccat ccagggcagg ggcagcgggg 5400

ccgatctggc ggccagcctg catggcggtt tcgtcgcta tcgcgcgccc gatggcggtg 5460

ccgcgcagat cgaggcgctt ccggtgccgc cggggccgtt cggcctgcgc tatgcgggct 5520

acaagacccc gacagccgag gtgctgcgcc ttgtggccga tcggatggcg ggcaacgagg 5580

ccgctttcga cgcgctctac tcccggatgg gcgcaagcgc agatgcccg atccgcgcg 5640

cgcaagggct ggactgggct gcattccacg acgcgctgaa cgaataccag cgcctgatgg 5700

agcagctggg cgtgtccgac gacacgctgg acgcgatcat ccgcgaggcg cgcgacgcgg 5760

gcgcgcagat cgccaagatc tccggctcgg ggctggggga ttgcgtgctg gactgggcg 5820

accagcccaa gggtttcgtg cccgcaagca ttgccgagaa gggacttgtt ttcgatgact 5880

gatgccgtcc gcgacatgat cgcctgtgcc atggcgggcg cgaaccgacat ccgagcagcc 5940

gaggcttatg cgcagcagaa catcgcgctg tcgaaatact ggggcaagcg cgacgccg 6000

cggaaacctc cgctgaacag ctccgtctcg atctcgttgg cgaactgggg ctctcatag 6060

cgggtcgagg ggtccggcac gggccacgac gaggtgcac acaacggcac gctgctggat 6120

ccgggcgacg ccttcgcgcg ccgcgcgttg gcattcgtg acctgttccg gggggggagg 6180

cacctgccgc tcgggatcac gacgcagaac tcgatccgga cggcgggcgg gcttgccctg 6240

tgggcctcgg ggttcgcggc gctgaccctg gcgctggcgg gggcgctcgg gctggatctg 6300

gacgacacgg atctgagccg catcgcccgg atcggcagtg gcagcgccgc ccgctcgatc	6360
tggcacggct tcgtccgctg gaaccggggc gaggccgagg atgggcatga cagccacggc	6420
gtcccgcctgg acctgcgctg gcccggcttc cgcacgcgca tcgtggccgt ggacaagggg	6480
cccaagcctt tcagttcgcg cgacggcatg aaccacacgg tcgagaccag cccgctgttc	6540
ccgcccctggc ctgcgcaggc ggaagcggat tgccgcgtca tcgaggatgc gatcgccgcc	6600
cgcgacatgg ccgcccctggg tccgcgggtc gaggcgaacg cccttgcgat gcacgccacg	6660
atgatggccg cgcgcccgcg gctctgctac ctgacgggcg gcagctggca ggtgctggaa	6720
cgcctgtggc agggccgcgc ggacgggctt gcggcctttg cgacgatgga tgccggcccg	6780
aacgtcaagc tgatcttcga ggaaagcagc gccgcccagc tgctgtacct gttccccgac	6840
gccagcctga tcgcgcgctt cgaggggctt tgaacgcgta agacgaccac tgggtaaggt	6900
tctgcgcgcg gtgggtctga ctgcctgcaa agaggtgctt gagttgctgc gtgactgcgg	6960
cggccgactt cgtgggactt gcccgccacg ctgacgaagg gcgaattcca gcacactggc	7020
ggccgttact agttctagag cggccgccac cgcggtggag ggcggcacct cgctaacgga	7080
ttcacggttt ttatca	7096

<210> 3
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> Paracoccus sp. R114

<400> 3	
atgaaagtgc ctaagatgac cgtgacagga atcgaagcga tcagctteta cccccccag	60
aactacgtgg gactggatat ccttgccgcg catcacggga tcgacccga gaagttctcg	120
aaggggatcg ggcaggagaa aatcgcaactg cccggccatg acgaggatat cgtgaccatg	180
gccgccgagg ccgcgctgcc gatcatcgaa cgcgcgggca cgcagggcat cgacacgggt	240
ctgttcgcca ccgagagcgg gatcgaccag tcgaaggccg ccgccatcta tctgcgcgcg	300
ctgttggaac tgtcgcccaa ctgcgcttgc gtcgagctga agcaggcctg ctattccgcg	360
acggcgggcg tgcagatggc ctgcgcgcat gtcgcccga agcccgaccg caaggtgctg	420
gtgatcgctg ccgatgtcgc gcgctatgac cgcgaaagct cgggcgaggc gacgcagggt	480
gcgggcgccc tcgccatcct tgtcagcgcc gatcccaagg tggccgagat cggcaccgtc	540
tcggggctgt tcaccgagga tatcatggat ttctggcggc cgaaccaccg ccgcacgccc	600
ctgttcgacg gcaaggcatc gacgctgcgc tatctgaacg cgctggctga ggcgtggaac	660
gactatcgcg cgaatggcgg ccacgagttc gccgatttcg cgcatttctg ctatcacgtg	720

ccgttctcgc ggatgggcca gaaggcgaac agccacctgg ccaaggcgaa caagacgccg 780
 gtggacatgg ggcaggtgca gacgggcctg atctacaacc ggcaggtcgg gaactgctat 840
 accgggtcga tctacctggc attcgccctg ctgctggaga acgctcagga ggaectgacc 900
 ggcgcgctgg tcggtctgtt cagctatggc tcgggtgcga cgggcgaatt cttcgatgcg 960
 cggatcgcgc ccggttaccg cgaccacctg ttcgcggaac gccatcgga attgctgcag 1020
 gatcgcacgc ccgtcacata tgacgaatac gttgccctgt gggacgagat cgacctgacg 1080
 cagggcgcgc ccgacaaggc gcgcggctgt ttcaggctgg caggtatcga ggacgagaag 1140
 cgcatttatg tcgaccggca ggctga 1167

<210> 4
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Paracoccus sp. R114

<400> 4

Met Lys Val Pro Lys Met Thr Val Thr Gly Ile Glu Ala Ile Ser Phe
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Gln Asn Tyr Val Gly Leu Asp Ile Leu Ala Ala His His
 20 25 30

Gly Ile Asp Pro Glu Lys Phe Ser Lys Gly Ile Gly Gln Glu Lys Ile
 35 40 45

Ala Leu Pro Gly His Asp Glu Asp Ile Val Thr Met Ala Ala Glu Ala
 50 55 60

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

Leu Phe Ala Thr Glu Ser Gly Ile Asp Gln Ser Lys Ala Ala Ala Ile
 85 90 95

Tyr Leu Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ser Pro Asn Cys Arg Cys Val Glu
 100 105 110

Leu Lys Gln Ala Cys Tyr Ser Ala Thr Ala Ala Leu Gln Met Ala Cys
 115 120 125

Ala His Val Ala Arg Lys Pro Asp Arg Lys Val Leu Val Ile Ala Ser
 130 135 140

Asp Val Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Ser Ser Gly Glu Ala Thr Gln Gly
145 150 155 160

Ala Gly Ala Val Ala Ile Leu Val Ser Ala Asp Pro Lys Val Ala Glu
165 170 175

Ile Gly Thr Val Ser Gly Leu Phe Thr Glu Asp Ile Met Asp Phe Trp
180 185 190

Arg Pro Asn His Arg Arg Thr Pro Leu Phe Asp Gly Lys Ala Ser Thr
195 200 205

Leu Arg Tyr Leu Asn Ala Leu Val Glu Ala Trp Asn Asp Tyr Arg Ala
210 215 220

Asn Gly Gly His Glu Phe Ala Asp Phe Ala His Phe Cys Tyr His Val
225 230 235 240

Pro Phe Ser Arg Met Gly Glu Lys Ala Asn Ser His Leu Ala Lys Ala
245 250 255

Asn Lys Thr Pro Val Asp Met Gly Gln Val Gln Thr Gly Leu Ile Tyr
260 265 270

Asn Arg Gln Val Gly Asn Cys Tyr Thr Gly Ser Ile Tyr Leu Ala Phe
275 280 285

Ala Ser Leu Leu Glu Asn Ala Gln Glu Asp Leu Thr Gly Ala Leu Val
290 295 300

Gly Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Gly Glu Phe Phe Asp Ala
305 310 315 320

Arg Ile Ala Pro Gly Tyr Arg Asp His Leu Phe Ala Glu Arg His Arg
325 330 335

Glu Leu Leu Gln Asp Arg Thr Pro Val Thr Tyr Asp Glu Tyr Val Ala
340 345 350

Leu Trp Asp Glu Ile Asp Leu Thr Gln Gly Ala Pro Asp Lys Ala Arg
355 360 365

Gly Arg Phe Arg Leu Ala Gly Ile Glu Asp Glu Lys Arg Ile Tyr Val

370

375

380

Asp Arg Gln Ala
385

<210> 5
<211> 1167
<212> ADN
<213> Paracoccus sp. R114

<400> 5

```

atgaaagtgc ctaagatgac cgtgacagga atcgaagcga tcagcttcta cccccccag      60
aactacgtgg gactggatat ccttgccgcg catcacggga tcgaccccgga gaagttctcg      120
aaggggatcg ggcaggagaa aatcgactg cccggccatg acgaggatat cgtgaccatg      180
gccgccgagg ccgcgctgcc gatcatcgaa cgcgcgggca cgcagggcat cgacacgggt      240
ctgttcgcca ccgagagcgg gatcgacaag tcgaaggccg ccgccatcta tctgcgcgcg      300
ctgctggacc tgcgcccac ctgccgttgc gtcgagctga agcaggcctg ctattccgcg      360
acggcgggcg tgcagatggc ctgcgcgcg gtcgcccgcga agcccgaccg caaggtgctg      420
gtgatcgcgt ccgatgtcgc gcgctatgac cgcgaaagct cgggcgaggc gacgcagggt      480
gcgggcgcgc tcgccatcct tgtcagcgcc gatcccaagg tggccgagat cggcaccgtc      540
tcggggctgt tcaccgagga tatcatggat ttctggcggc cgaaccaccg ccgcacgccc      600
ctgttcgacg gcaaggcatc gacgctgcgc tatctgaacg cgctggtcga ggcgtggaac      660
gactatcgcg cgaatggcgg ccacgagttc gccgatttcg cgcattttctg ctatcacgtg      720
ccgtttctcg ggatgggcga gaaggcgaac agccacctgg ccaaggcgaa caagacgccc      780
gtggacatgg ggcagggtga gacgggcctg atctacaacc ggcaggtcgg gaactgctat      840
accgggtcga tetacctggc attcgctcgc ctgctggaga acgctcagga ggacctgacc      900
ggcgcgctgg tcgggtctgt cagctatggc tcgggtgaga cgggcgaatt cttcgatgcg      960
cggatcgcg ccggttaccg cgaccacctg ttcgcggaac gccatcgca attgctgcag     1020
gatcgacgc ccgtcacata tgacgaatac gttgccctgt gggacgagat cgacctgacg     1080
cagggcgcg ccgacaaggc gcgcggtcgt ttcaggctgg caggatatga ggacgagaag     1140
cgcatctatg tcgaccggca ggctga                                     1167

```

<210> 6
<211> 388
<212> PRT

<213> Paracoccus sp. R114

<400> 6

```

Met Lys Val Pro Lys Met Thr Val Thr Gly Ile Glu Ala Ile Ser Phe
 1           5           10           15

Tyr Thr Pro Gln Asn Tyr Val Gly Leu Asp Ile Leu Ala Ala His His
      20           25           30

Gly Ile Asp Pro Glu Lys Phe Ser Lys Gly Ile Gly Gln Glu Lys Ile
 35           40           45

Ala Leu Pro Gly His Asp Glu Asp Ile Val Thr Met Ala Ala Glu Ala
 50           55           60

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

Leu Phe Ala Thr Glu Ser Gly Ile Asp Lys Ser Lys Ala Ala Ala Ile
      85           90           95

Tyr Leu Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ser Pro Asn Cys Arg Cys Val Glu
      100           105           110

Leu Lys Gln Ala Cys Tyr Ser Ala Thr Ala Ala Leu Gln Met Ala Cys
      115           120           125

Ala His Val Ala Arg Lys Pro Asp Arg Lys Val Leu Val Ile Ala Ser
      130           135           140

Asp Val Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Ser Ser Gly Glu Ala Thr Gln Gly
      145           150           155           160

Ala Gly Ala Val Ala Ile Leu Val Ser Ala Asp Pro Lys Val Ala Glu
      165           170           175

Ile Gly Thr Val Ser Gly Leu Phe Thr Glu Asp Ile Met Asp Phe Trp
      180           185           190

Arg Pro Asn His Arg Arg Thr Pro Leu Phe Asp Gly Lys Ala Ser Thr
      195           200           205

Leu Arg Tyr Leu Asn Ala Leu Val Glu Ala Trp Asn Asp Tyr Arg Ala
      210           215           220

Asn Gly Gly His Glu Phe Ala Asp Phe Ala His Phe Cys Tyr His Val

```

225		230		235		240
Pro Phe Ser Arg Met Gly Glu Lys Ala Asn Ser His Leu Ala Lys Ala						
	245			250		255
Asn Lys Thr Pro Val Asp Met Gly Gln Val Gln Thr Gly Leu Ile Tyr						
	260			265		270
Asn Arg Gln Val Gly Asn Cys Tyr Thr Gly Ser Ile Tyr Leu Ala Phe						
	275			280		285
Ala Ser Leu Leu Glu Asn Ala Gln Glu Asp Leu Thr Gly Ala Leu Val						
	290			295		300
Gly Leu Phe Ser Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Gly Glu Phe Phe Asp Ala						
305		310		315		320
Arg Ile Ala Pro Gly Tyr Arg Asp His Leu Phe Ala Glu Arg His Arg						
	325			330		335
Glu Leu Leu Gln Asp Arg Thr Pro Val Thr Tyr Asp Glu Tyr Val Ala						
	340			345		350
Leu Trp Asp Glu Ile Asp Leu Thr Gln Gly Ala Pro Asp Lys Ala Arg						
	355			360		365
Gly Arg Phe Arg Leu Ala Gly Ile Glu Asp Glu Lys Arg Ile Tyr Val						
370		375		380		
Asp Arg Gln Ala						
385						

<210> 7
 <211> 1002
 <212> ADN
 <213> Paracoccus zeaxanthinifaciens ATCC 21588

<400> 7

atgaacgtgc aggaagacgt ccgcaaacca ctggaccggc tggccgaggc gctggcaccc	60
gagatggagg ccgtgaacgc gctgatccgc gaacgcatgg ccagcaggca tgcgccgcgc	120
atccccgagg tgaccgccca cctgatcgag gccggcggca agcgccctgcg cccgatgctg	180
accctggccg cggcgaagct gcttggctat ggcgggccct atcactgca tctggccgcg	240
acggtcgaat tcatccacac cgcgaccctg ctgcatgacg acgtgggtcga cgaaagccgc	300

cagcgccgcg ggcgtccgac ggcgaacctg ctgtgggaca acaagtcacg cgtgctggtc 360
 ggcgattacc tgttcgcgcg cagcttccag ctgatggtcg aaccgcgcag catgcgcacg 420
 ctcgagatcc tgtcgaacgc cgccgccacc atcgccgagg gcgaggtgct gcagctgacc 480
 gcggcgcaagg atctggccac gaacgaggac atctatctgc aggtcgtgcg cggcaagacg 540
 gcagcgctgt tctcggccgc gaccgaggtg ggcggcgtca tegcgggctt ccccgatgcg 600
 caggtccgcg cgctgttcga ttacggcgac gcgcttggca tcgccttcca gatcgtggac 660
 gacctgctgg attacggcgg caccgccgag gcgatcggca agaataccgg cgacgatttc 720
 cgcaaacgca agctgacgct gccggtgatc aaggccgtgg cccgcgccac ccccgaggaa 780
 cgcgctttct ggtcgcgcac catcgagaag ggcgaccaga aggacggcga ccttgaacac 840
 gcgctggaac tgctggcccg ccacggcgcg atggccgatg cccgccgcga cgcgctggac 900
 tgggcggcca gggcccgcg ctcctgcag atcctgcccg agcatccgat ccgcgacatg 960
 ctgtcggacc tggccgattt cgtggtcgaa cgcacgcct ga 1002

<210> 8

<211> 333

<212> PRT

<213> Paracoccus zeaxanthinifaciens ATCC 21588

<400> 8

Met Asn Val Gln Glu Asp Val Arg Lys Pro Leu Asp Arg Leu Ala Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Pro Glu Met Glu Ala Val Asn Ala Leu Ile Arg Glu Arg
 20 25 30

Met Ala Ser Arg His Ala Pro Arg Ile Pro Glu Val Thr Ala His Leu
 35 40 45

Ile Glu Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Met Leu Thr Leu Ala Ala
 50 55 60

Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Tyr His Val His Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Thr Val Glu Phe Ile His Thr Ala Thr Leu Leu His Asp Asp Val Val
 85 90 95

Asp Glu Ser Arg Gln Arg Arg Gly Arg Pro Thr Ala Asn Leu Leu Trp
 100 105 110

ES 2 394 508 T3

Asp Asn Lys Ser Ser Val Leu Val Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Arg Ser
115 120 125

Phe Gln Leu Met Val Glu Pro Gly Ser Met Arg Thr Leu Glu Ile Leu
130 135 140

Ser Asn Ala Ala Ala Thr Ile Ala Glu Gly Glu Val Leu Gln Leu Thr
145 150 155 160

Ala Ala Gln Asp Leu Ala Thr Asn Glu Asp Ile Tyr Leu Gln Val Val
165 170 175

Arg Gly Lys Thr Ala Ala Leu Phe Ser Ala Ala Thr Glu Val Gly Gly
180 185 190

Val Ile Ala Gly Val Pro Asp Ala Gln Val Arg Ala Leu Phe Asp Tyr
195 200 205

Gly Asp Ala Leu Gly Ile Ala Phe Gln Ile Val Asp Asp Leu Leu Asp
210 215 220

Tyr Gly Gly Thr Ala Glu Ala Ile Gly Lys Asn Thr Gly Asp Asp Phe
225 230 235 240

Arg Glu Arg Lys Leu Thr Leu Pro Val Ile Lys Ala Val Ala Arg Ala
245 250 255

Thr Pro Glu Glu Arg Ala Phe Trp Ser Arg Thr Ile Glu Lys Gly Asp
260 265 270

Gln Lys Asp Gly Asp Leu Glu His Ala Leu Glu Leu Leu Ala Arg His
275 280 285

Gly Ala Met Ala Asp Ala Arg Arg Asp Ala Leu Asp Trp Ala Ala Arg
290 295 300

Ala Arg Ala Ser Leu Gln Ile Leu Pro Glu His Pro Ile Arg Asp Met
305 310 315 320

Leu Ser Asp Leu Ala Asp Phe Val Val Glu Arg Ile Ala
325 330

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

	<220>		
	<223>	Cebador	
5	<400>	9	
		gcgctggtcg aggcgtggaa	20
	<210>	10	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
10	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
15	<400>	10	
		cgtcagcgtg gcgggcaagt	20
	<210>	11	
	<211>	30	
20	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador	
25	<400>	11	
		aaggcctcat atgaacgtgc aggaagacgt	30
	<210>	12	
30	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador	
	<400>	12	
		cgggatcctc aggcgatgcg ttcgacca	28
40	<210>	13	
	<211>	31	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
45	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	13	
50		ggccgcgacg gtcgattca tccacaccgc g	31
	<210>	14	
	<211>	31	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
55	<220>		
	<223>	Cebador	
	<400>	14	
60		cgcggtgtgg atgaactcga ccgtcgcggc c	31

	<210>	15		
	<211>	27		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
5	<220>			
	<223>	Cebador		
	<400>	15		
10	agagcgggat cgacaagtcg aaggccg		27	
	<210>	16		
	<211>	27		
	<212>	ADN		
15	<213>	Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador		
	<400>	16		
20	cggccttcga cttgtcgatc ccgctct		27	
	<210>	17		
	<211>	26		
25	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador		
30	<400>	17		
	gtgcttgagt tgccgcgtga ctgcgg		26	
	<210>	18		
35	<211>	26		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
	<220>			
40	<223>	Cebador		
	<400>	18		
45	ccgcagtcac gcggcaactc aagcac		26	
	<210>	19		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
50	<220>			
	<223>	Cebador		
	<400>	19		
55	cgtaattat tacctccacg		20	
	<210>	20		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
60	<213>	Artificial		

<220>
<223> Cebador

5 <400> 20
ggccatgcc gtagcgcat 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

15 <400> 21
gagttctct gagcgggact 20

<210> 22
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 22
ccgacatagt tcttctcgt 20

<210> 23
30 <211> 7096
<212> ADN
<213> Paracoccus sp. R114

<400> 23

35

cggtctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccogtga tattgctgaa 60

gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgtcttt acggtatcgc cgctcccgat 120

tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg 180

tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaccc tgccatcacg agatttcgat tocaccgccc 240

ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc 300

agcgcggggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccca tgggcaaata ttatacgcaa 360

ggcgacaagg tgctgatgcc gctggcgatt caggttcacg atgccgtttg tgatggcttc 420

catgtcggca gaatgcttaa tgaattacaa cagtttttat gcaacgcgtc gaaccgcccg 480

tccgacgccc gtttccgcac ggaaacgcgc ggcaagttga cataacttgc acgcgacgtc 540

tcgattctgc ccgcgaagaa tcgatgcat ccagatgatg cagaacgaag aagcggaagc 600

gcccgtagaa gaccagatga tttcccatc cccggtgccc acgcaatggg tcggcccgat 660

cctgttccgc ggcccgcgtc tcgagggccc gatcagcgcg ccgctggcca cctacgagac 720

gccgctctgg cctcagaccg cgcggggggc aggggtttcc cggcattcgg gcgggatcca 780

ggtctcgctg gtcgacgaac gcatgagccg ctcgatcgcg ctgcggggcgc atgacggggc	840
ggcggcgacc gccgcctggc agtcgatcaa ggcccgccag gaagaggctcg cggccgtggt	900
cgccaccacc agccgcttcg cccgccttgt cgagctgaat cgccagatcg tgggcaacct	960
gctttacatc cgcacgaat gcgtgacggg cgacgcctcg ggtcacaaca tggtcaccaa	1020
ggccgccgag gccgtgcagg gctggatcct gtcggaatac ccgatgctgg cctattccac	1080
gatctcgggg aacctgtgca ccgacaagaa ggcgtcggcg gtcaacggca tcctgggccc	1140
cggcaaatac gccgtcgccg aggtcgagat cccgcgcaag atcctgacct gcgtgctgcg	1200
caccagcgcc gagaagatgg tccgcctgaa ctacgagaag aactatgtcg ggggtacgct	1260
ggcggggctg ctgcgcagtg cgaacgcgca tttcgccaac atgctgctgg gcttctacct	1320
ggcgacgggg caggacgcgg ccaacatcat cgaggccagc cagggtctcg tccattgcga	1380
ggcccgcggc gaggatctgt atttctcgtg cacgctgccc aaectcatca tgggctcggg	1440
cgggtgccggc aagggcaccc cctcgatcga ggagaacctg tcgcggatgg gctgccgcea	1500
gccggggcgaa cccggcgaca acgcgcgccg tcttgccggcg atctgcgcgg gegtctgtct	1560
gtgtggtgaa ttgtcgctgc ttgcggccca gaccaacccc ggagagtggg tccgcaccca	1620
catggagatg gagcgatgac cgacagcaag gatcaccatg tcgcggggcg caagctggac	1680
catctgcgtg cattggacga cgatgcggat atcgaccggg gcgacagcgg cttcgaccgc	1740
atcgcgctga cccatcgcg cctgcccagag gtggatttcg acgccatcga cacggcgacc	1800
agcttcctgg gccgtgaact gtccttcccg ctgctgatct cgtccatgac cggcggcacc	1860
ggcgaggaga tcgagcgcat caaccgcaac ctggccgctg gtgccgagga ggcccgcgtc	1920
gccatggcgg tgggctcgca gcgcgtgatg ttcaccgacc cctcggcgcg ggccagcttc	1980
gacctgcgcg cccatgcgcc caccgtgccg ctgctggcca atatcggcgc ggtgcagctg	2040
aacatggggc tggggctgaa ggaatgcctg gccgcgatcg aggtgctgca ggcggacggc	2100
ctgtatctgc acctgaaccc cctgcaagag gccgtccagc ccgaggggga tcgcgacttt	2160
gccgatctgg gcagcaagat cgcggccatc gcccgcgacg ttcccgtgcc cgtcctgctg	2220
aaggaggtgg gctgcggcct gtcggcgggc gatatcgcca tcgggctgcg cgcggggatc	2280
cggcatttcg acgtggccgg tcgcggcggc acatcctgga gccggatcga gtatcgccgc	2340
cgccagcggg ccgatgacga cctgggcctg gtcttcagg actggggcct gcagaccgtg	2400
gacgccctgc gcgaggcgcg gcccgcgctt gcggcccatg atggaaccag cgtgctgac	2460
gccagcggcg gcacccgcaa cgggtgtcgac atggcgaaat gcgtcatcct gggggccgac	2520
atgtgcgggg tcgccgcgcc cctgctgaaa gcggcccaaa actcgcgcga ggcggttgta	2580

tccgccatcc ggaaactgca tctggagttc cggacagcca tgttctctct gggttgcggc	2640
acgcttgccg acctgaagga caattctctg cttatccgtc aatgaaagtg cctaagatga	2700
ccgtgacagg aatcgaagcg atcagcttct acacccccca gaactacgtg ggactggata	2760
tccttgccgc gcatcacggg atcgaccccg agaagttctc gaaggggatc gggcaggaga	2820
aaatcgact gcccggccat gacgaggata tcgtgacct ggccgccgag gccgcgctgc	2880
cgatcatcga acgcgcgggc acgcagggca tcgacacggt tctgttcgcc accgagagcg	2940
ggatcgacaa gtcgaaggcc gccgccatct atctgcgcgc cctgctggac ctgtcgccca	3000
actgccgttg cgtcgagctg aagcaggcct gctattccgc gacggcggcg ctgcagatgg	3060
cctgcgcgca tgtcgcccg aagcccgacc gcaagggtgt ggtgatcgcg tccgatgtcg	3120
cgcgctatga ccgcgaaagc tcgggcgagg cgacgcaggg tcggggcgcc gtcgccatcc	3180
ttgtcagcgc cgatcccaag gtggccgaga tcggcaccgt ctcggggctg ttcaccgagg	3240
atatcatgga tttctggcgg ccgaaccacc gccgcacgcc cctgttcgac ggcaaggcat	3300
cgacgctgcy ctatctgaac gcgctggtcg aggcgtggaa cgactatcgc gcgaatggcg	3360
gccacgagtt cgccgatttc gcgcatttct gctatcacgt gccgttctcg cggatgggcy	3420
agaaggcgaa cagccacctg gccaaaggca acaagacgcc ggtggacatg gggcagggtgc	3480
agacgggcct gatctacaac cggcaggctc ggaactgcta taccgggtcg atctacctgg	3540
cattcgctc gctgctggag aacgctcagg aggacctgac cggcgcgctg gtcgggtctgt	3600
tcagctatgg ctcggtgcy acgggcgaat tcttcgatgc gcggatcgcy cccggttacc	3660
gcgaccacct gttcgaggaa cgccatcgcy aattgctgca ggatcgcacg cccgtcacat	3720

atgacgaata cgttgccctg tgggacgaga tcgacctgac gcagggcgcg cccgacaagg	3780
cgcgcggtcg tttcaggctg gcaggatatcg aggacgagaa gcgcatctat gtcgaccggc	3840
aggcctgaag caggcgccca tgccccgggc aagctgatcc tgtccgggga acattccgtg	3900
ctctatgggt cgccccgget tgccatggcc atcgcccgtc ataccgaggt gtggttcacg	3960
ccgcttgga ttggcgagg gatacgcacg acattcgcca atctctcggg cggggcgacc	4020
tattcgctga agctgctgtc ggggttcaag tcgcggtg accgccggtt cgagcagttc	4080
ctgaacggcg acctaaagg gcacaaggtc ctgaccatc ccgacgatct ggcggtctat	4140
gcgctggcgt cgtttctgca cgacaagccg ccggggaccg ccgcatgcc gggcatcggc	4200
gcgatgcacc acctgccgg accgggtgag ctgggcagcc ggacggagct gcccatcggc	4260
gcgggcatgg ggtcgtctgc ggccatcgtc gcggccacca cggtcctgtt cgagacgctg	4320
ctggaccggc ccaagacgcc cgaacagcgc ttcgaccgcg tccgcttctg cgagcggttg	4380
aagcacggca aggccggtcc catcgacgcg gccagcgtcg tgcgcggcgg gcttgtccgc	4440
gtgggcggga acgggcccggg ttcgatcagc agcttcgatt tgcccaggga tcacgacctt	4500
gtcgcgggac gcggctggta ctgggtactg cacgggcgcc ccgtcagcgg gaccggcgaa	4560
tgcgtcagcg cggtcgcggc ggcgcaggtt cgcgatgcgg cgctgtggga cgccttcgca	4620
gtctgcaccc gcgcgttgga ggccgcgctg ctgtctgggg gcagccccga cgcgcctc	4680
accgagaacc aggcctgct ggaacgcac ggctcgtgc cggcagcgac gcaggccctc	4740
gtggcccaga tcgaggaggc ggggtggcgg gccaatatct gcggcgaggg ttccgtgcgg	4800
ggcgatcacg gcggggcggt cctcgtgcgg attgacgacg cgcaggcgat ggcttcggtc	4860
atggcgccc atcccacct cgactggggc cccctgcgca tgcgcgcac gggggcgga	4920
cccggccccg cgcgcgtgc gcaaccgctg ccggggcagg gctgatggat caggatcatc	4980
gcgccagcgc gccgggttcg gtcgatgaca cgggcgaaca tgccgtggtc tatggacacc	5040
gcgccatcgt cgcggggatc gagcagcgg cccatgtgac gatcgtcccg cgtgccgacc	5100
gcattgttcg catcacctcg cagatcgggg cgcgcagca ggggtcgctg gacgatctgc	5160
ctgcggggcg gacctatcg ttctgtctgg ccgccatcgc gcgacacgg ccggacctgc	5220
cttgcggtt cgacatggac atcacctcgg ggatcgatcc gaggtcggg cttggatcct	5280
cggcgcggt gacggtcgac tgccctcggc cgctgtcggc gctggcgggg cgggggaccg	5340
aggggctgca tgacgacg cgctgcacgc tccgcgccat ccagggcagg ggcagcgggg	5400
ccgatctggc ggccagcctg catggcggtt tcgtgccta tcgcgcgcc gatggcggtg	5460

ccgcgcagat cgaggcgctt ccggtgccgc cggggccggt cggectgcgc tatgcgggct	5520
acaagacccc gacagccgag gtgctgcgcc ttgtggccga tcggatggcg ggcaacgagg	5580
ccgctttcga cgcgctctac tcccggatgg gcgcaagcgc agatgccgcg atccgcgcgg	5640
cgcaagggct ggactgggct gcattccacg acgcgctgaa cgaataccag cgcctgatgg	5700
agcagctggg cgtgtccgac gacacgctgg acgcgatcat ccgcgaggcg cgcgacgcgg	5760
gcgccgcagt cgccaagatc tccggctcgg ggctggggga ttgcgtgctg gcaactggcg	5820
accagcccaa gggtttcgtg cccgcaagca ttgccgagaa gggacttggt ttcgatgact	5880
gatgccgtcc gcgacatgat cgcgcgtgcc atggcgggcg cgaccgacat ccgagcagcc	5940
gaggcttatg cgcccagcaa catcgcgctg tcgaaatact ggggcaagcg cgacgccgcg	6000
cggaaacctc cgtgtaacag ctccgtctcg atctcggttg cgaactgggg ctctcatag	6060
cgggtcgagg ggtccggcac gggccacgac gaggtgcatc acaacggcac gctgctggat	6120
ccggggcgacg ccttcgcgcg ccgcgcgttg gcattcgetg acctgttcg gggggggagg	6180
cacctgccgc tgcggatcac gacgcagaac tcgatcccg cggcggcggg gcttgcctcg	6240
tcggcctcgg ggttcgcggc gctgacctgt gcgctggcgg gggcggtcgg gctggatctg	6300
gacgacacgg atctgagccg catcgcccgg atcggcagtg gcagcgccgc ccgctcgatc	6360
tggcacggct tcgtccgctg gaaccggggc gagggccgagg atgggcatga cagccacggc	6420
gtcccgtctg acctgcgctg gcccggttc cgcacgcgga tcgtggccgt ggacaagggg	6480
cccaagcctt tcagttcgcg cgacggcatg aaccacacgg tcgagaccag cccgctgttc	6540
ccgccctggc ctgcgcaggc ggaagcggat tgccgcgtca tcgaggatgc gatcgccgcc	6600
cgcgacatgg ccgccctggg tccgcgggtc gagggcgaacg cccttgcgat gcacgccacg	6660
atgatggccg cgcgcccgc gctctgctac ctgacgggcg gcagctggca ggtgctggaa	6720
cgcctgtggc agggccgcgc ggacgggctt gcggcctttg cgacgatgga tgccggccccg	6780
aacgtcaagc tgatcttcga ggaaagcagc gccgcccagc tgctgtacct gttccccgac	6840
gccagcctga tcgcgccgtt cgagggggcg tgaaecgta agacgaecac tgggtaaggt	6900
tctgccgcgc gtggtctcga ctgcctgcaa agaggtgctt gagttgccgc gtgactgcgg	6960
cggccgactt cgtgggactt gcccgccacg ctgacgaagg gcgaattcca gcacactggc	7020
ggccgttact agttctagag cggccgccac cgcggtggag ggccggcacct cgetaacgga	7080
ttcaccgttt ttatca	7096

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para la producción de isoprenoides, que comprende
 - 5 a. introducir en un microorganismo seleccionado del género *Rhodobacter* una secuencia de ADN que codifica una enzima que tiene actividad de decaprenil difosfato sintasa y una secuencia de polinucleótidos que comprende genes del operón mev de acuerdo con SEQ ID NO: 23,
 - b. cultivar el microorganismo de la etapa (a) bajo condiciones que permiten la producción de isoprenoides.
- 10 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ADN que codifica una enzima con actividad de decaprenil difosfato sintasa se representa por SEQ ID NO: 7.
- 3.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el microorganismo en el que se introduce el polinucleótido es *Rhodobacter sphaeroides*.

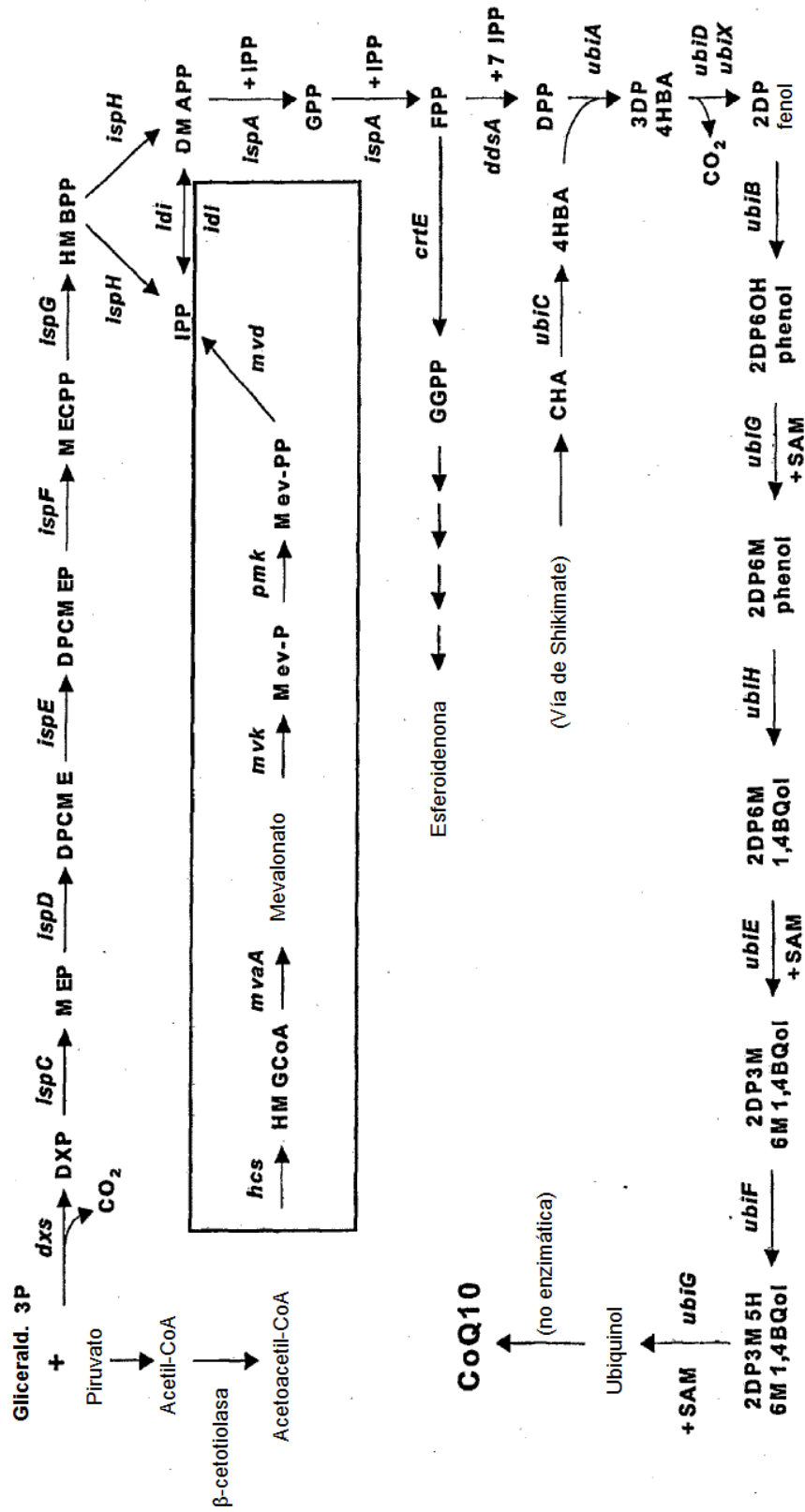


Figura 1