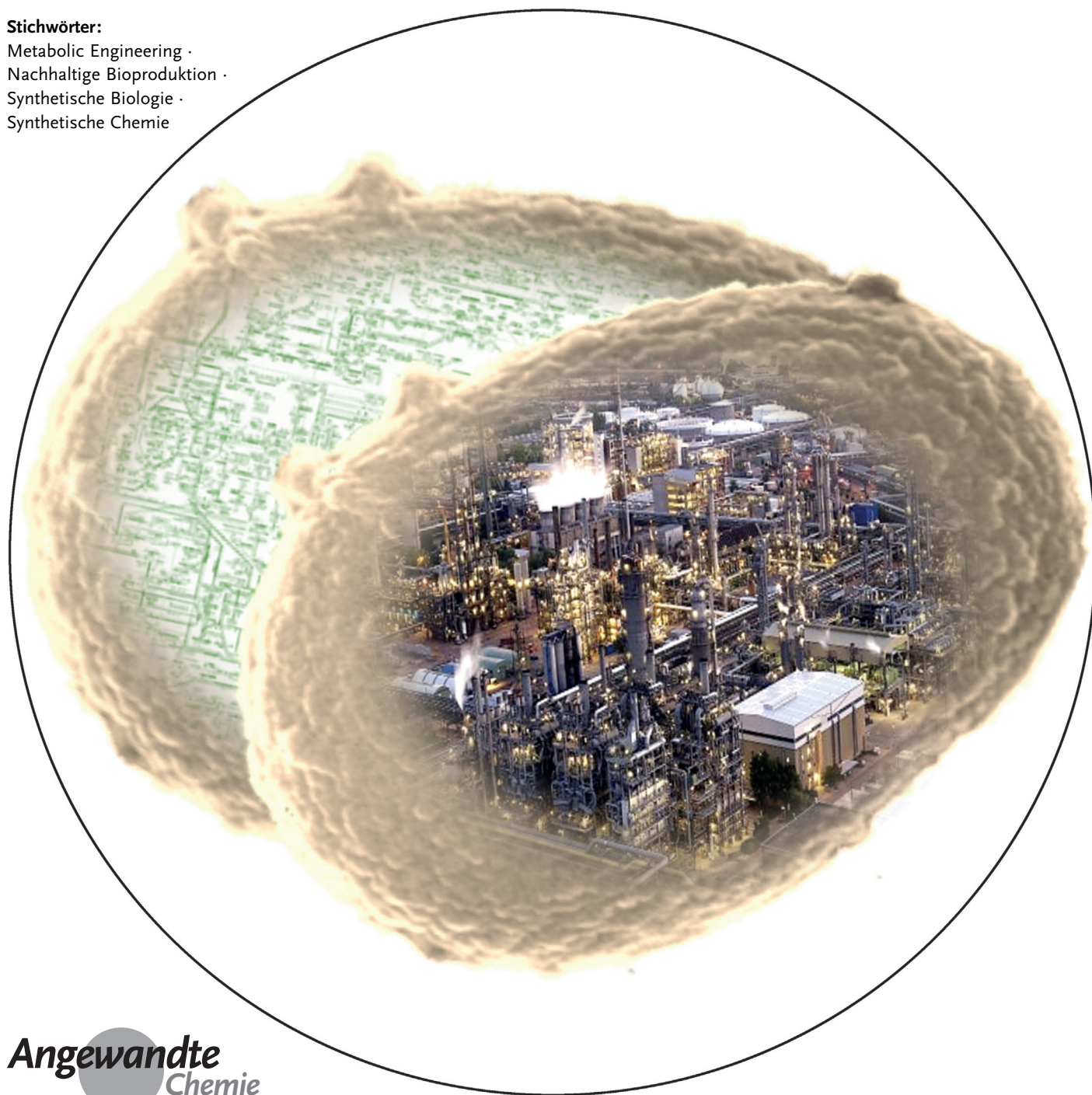


Biotechnologie von Morgen: metabolisch optimierte Zellen für die bio-basierte Produktion von Chemikalien und Treibstoffen, Materialien und Gesundheitsprodukten

Judith Becker und Christoph Wittmann*

Stichwörter:

Metabolic Engineering ·
Nachhaltige Bioproduktion ·
Synthetische Biologie ·
Synthetische Chemie



Seit der Etablierung fermentativer Produktionsprozesse haben sich insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* als bedeutende Produktionsorganismen in der industriellen Biotechnologie durchgesetzt. Angetrieben von einem neu aufkommenden Interesse an Nachhaltigkeit und an der Verwendung nachwachsender Rohstoffe, wurden diese Mikroorganismen in den letzten Jahren zunehmend zu maßgeschneiderten Produktionsstämmen weiterentwickelt, wobei die Vielfalt und Komplexität ihrer natürlichen Syntheseleistung zugleich ein Gewinn und eine Herausforderung ist. Eine zielgerichtete Nutzbarmachung des großen metabolischen Potentials durch den synergistischen Einsatz des Systems Metabolic Engineering und der chemischen Synthese verspricht neue und innovative Konzepte für eine zukünftige Bio-Ökonomie.

1. Einleitung

Durch die Industrialisierung im letzten Jahrhundert hat sich nach und nach eine enge Verknüpfung zwischen der petrochemischen Industrie und unserem alltäglichen Leben entwickelt. Die chemische Industrie stellt hierbei, in der Regel aus fossilen Ressourcen, eine Vielzahl von Basischemikalien her. Diese werden für die Herstellung von Lösungsmitteln, Treibstoffen, Polymeren, Textilien, Nahrungsmitteln, Geschmacks- und Duftstoffen sowie Pharmazeutika verwendet. Die fortschreitende Umweltverschmutzung, der Klimawandel, bedingt durch die enorme Treibhausgasproduktion, und auch die Verknappung von Rohöl haben jedoch mittlerweile deutlich gemacht, dass neue und nachhaltige Produktionswege vonnöten sind, um den chemischen Markt auch zukünftig bedienen zu können.^[1] Das enorme Synthesepotential der Natur ermöglicht vor diesem Hintergrund eine faszinierende Alternative zur Petrochemie, da lebende Systeme häufig einzigartige Möglichkeiten zur chemo-, regio- und stereoselektiven „Bio“-Synthese von Chemikalien aus günstigen und nachwachsenden Rohstoffen bieten.^[2] Die fortschrittlichen Techniken der rekombinanten DNA-Technologie und der synthetischen Biologie haben dabei die Entwicklung neuer biotechnologischer Routen enorm beschleunigt und die Produktpalette über natürliche Organismengrenzen hinaus erweitert. Die Einbettung von synthetischer Biologie und synthetischer Chemie in ein umfassendes Entwicklungskonzept ist dabei ein vielsprechender Ansatz zum Aufbau von maßgeschneiderten Bioraffinerien und deren Anwendung für eine nachhaltige Bioproduktion.

Die Biotechnologie hat im Grunde bereits eine Jahrtausende alte Geschichte. Bereits in der Antike wurden Mikroorganismen, wenn auch ohne das Wissen um ihre Existenz, zum Backen und Brauen eingesetzt. Die einsetzende Entwicklung von Fermentationsprozessen zu Beginn des 20. Jahrhunderts hat dann die Biotechnologie revolutioniert. Industrielle Großprozesse wurden zunächst vorrangig für die Produktion von Antibiotika,^[3] L-Aminosäuren^[4] und biochemisch verwandten Substanzen eingesetzt.^[5] Die Produktvielfalt hat sich jedoch in den letzten 150 Jahren deutlich erweitert,^[1b,6] und die Biotechnologiebranche ist mittlerweile zu

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3384
2. Industrielle Zellfabriken	3385
3. Systems und Synthetic Metabolic Engineering	3388
4. Bio-basierte Chemikalien	3392
5. Materialien	3394
6. Biotreibstoffe	3396
7. Gesundheit und Ernährung	3397
8. Schlussbemerkungen und Ausblick	3400

einem Milliardengeschäft angewachsen.^[1c] Die Natur selbst hat dabei eine unglaubliche Diversität an Organismen, Enzymen, Stoffwechselwegen und metabolischen Reaktionen hervorgebracht, die für den Biotechnologen eine wahre Schatztruhe darstellen, um einfache Kohlenstoffquellen in hoch komplexe und chemisch nicht verwandte Moleküle umzuwandeln. Über viele Jahrzehnte hinweg limitierte dabei das native Stoffwechselrepertoire eines Organismus die Komplexität und Variabilität möglicher Syntheserouten. Durch den kombinierten Einsatz des „Systems und Synthetic Metabolic Engineering“ mit rekombinanter DNA-Technologie können diese natürlichen Grenzen jedoch mittlerweile überwunden werden, sodass es uns heute möglich ist, komplett synthetische Stoffwechselwege in heterologen – in der Regel mikrobiellen – Wirtorganismen zu rekonstruieren. Nachteile und Einschränkungen der nativen Produzenten wie langsames Wachstum, hohe Nährstoffanforderungen, Pathogenität, Stressanfälligkeit oder niedrige Produktausbeuten und -konzentrationen können somit umgangen werden.^[7] Darüber hinaus ermöglicht diese Strategie den Zugang zu Metaboliten aus nicht kultivierbaren Organismen sowie höheren Pflanzen und Tieren.^[8] Zusätzlich zur Erweiterung der Produktvielfalt stand in den letzten Jahren auch die Bandbreite der fermentierbaren Substrate im Forschungsmittelpunkt. Klassische biotechnologische Prozesse verwenden in der Regel Glucose-reiche komplexe Rohstoffe wie Mais- und Rübenmelasse oder Stärke- und Cassave-Hydrolysate. Die Trendwende in Richtung Nachhaltigkeit und erweiterter Wertschöpfung hat darüber hinaus neue Rohstoffe ins Spiel gebracht, unter anderen bis dato ungenutzte industrielle Abfallströme aus der Agrar- und Forstwirtschaft oder auch

[*] Dr. J. Becker, Prof. Dr. C. Wittmann
Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes
Campus A1.5, 66123 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: christoph.wittmann@uni-saarland.de

der Papier-, Molkerei- und Biodieselindustrie.^[1c,9] Da sich deren Zusammensetzung deutlich von der konventioneller Rohstoffe unterscheidet, rückten darin enthaltene alternative Kohlenstoffquellen wie die Pentosen Xylose und Arabinose, deren Polymere sowie Glycerin, ein Polyalkohol, und die organischen Säuren Lactat und Acetat in den Fokus. Das Design vielseitiger Zellfabriken auf Basis von *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* zählt sicher zu den größten Erfolgen des Systems und Synthetischen Metabolic Engineering. Auf dem Weg zu einer wirtschaftlichen Bioproduktion von Fein-, Plattform- und Grundchemikalien sind sie ein wichtiger Meilenstein und Wegbereiter für eine neue und nachhaltige (bio)synthetische Chemie, die Elemente der Biotechnologie und der Petrochemie vereint. Abbildung 1 zeigt eine Auswahl an Biochemikalien, die bereits heute auf Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt werden können.

Dieser Aufsatz fasst die neuesten Errungenschaften im Bereich der biobasierten Produktion zusammen und beleuchtet Fortschritte des Metabolic Engineering für eine biobasierte Produktion von Chemikalien, Materialien und Treibstoffen. Erörtert werden dabei sowohl Innovationen für traditionelle Produkte als auch solche für Produkte, die bislang noch keine Marktreife erlangt haben. Dies umfasst unter anderem auch De-novo-Synthesen von Chemikalien aus Biomasse, deren Wertschöpfungsprozess vom US Department of Energy als besonders wertvoll eingestuft wurde.^[10] Nicht behandelt werden an dieser Stelle dagegen ein- oder mehrstufige Biotransformationsprozesse, die im Detail in anderen Übersichtsartikeln erörtert werden.^[2b,c,d]

2. Industrielle Zellfabriken

2.1. *Corynebacterium glutamicum*

Seit nun beinahe sechs Jahrzehnten wird das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* als industrieller Produktionsstamm genutzt, hauptsächlich für die Produktion von L-Aminosäuren.^[4,11] Der Einsatz der rekombinanten DNA-Technologie hat darüber hinaus weitere spezialisierte Zellfabriken hervorgebracht, die die Produktion von natürlichen und nicht natürlichen Substanzen wie D-

Aminosäuren,^[12] Vitaminen,^[13] Pyrazinen,^[14] Diaminen,^[15] organischen Säuren,^[16] Alkoholen,^[17] Pyrimidinen^[7b] und Polymeren^[18] ermöglichen (Abbildung 2). Klassische aerobe Prozesse wurden mittlerweile durch zweistufige aerob/anaerobe Prozesse ergänzt, was die Synthese von typisch anaeroben Fermentationsprodukten ermöglicht. Homologe und heterologe genetische Manipulation der Substratverwertung mithilfe nativer und nichtnativer Gene hat darüber hinaus das Rohstoffspektrum von *C. glutamicum* erheblich erweitert.^[11c] Heutzutage kann die Produktpalette einen breit gefächerten Verbrauchermarkt bedienen, darunter das Gesundheits- und Energiewesen, den Haushaltsbereich sowie die Nahrungsmittel-, Textil- und Agrarindustrie.^[1b]

2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli ist vermutlich der derzeit am besten untersuchte Mikroorganismus sowohl wegen seines Status als Modellorganismus für Gram-negative Bakterien als auch wegen seiner Bedeutung als industrieller Produktionsstamm. *E. coli* kann natürlicherweise aerob oder anaerob auf einer Vielzahl von monomeren Kohlenstoffquellen wie Zuckern, Zuckeralkoholen und organischen Säuren wachsen. Die molekularen „Werkzeuge“ zur genetischen Veränderung und zur Untersuchung von Regulation und Genexpression sind wahrscheinlich die vielfältigsten, die je für einen einzelnen ausgewählten Organismus entwickelt wurden.^[20] Auf dieser exzellenten Basis wurde *E. coli* zu einem sehr flexiblen Produzenten von biochemischen Wertprodukten, die unter anderem Aminosäuren,^[11b] Biotreibstoffe^[21] und innovative Synthesebausteine für Chemikalien,^[6a] Polymere^[22] und Pharmazeutika^[23] umfassen (Abbildung 3).

2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Unter allen Organismen hat die Bäckerhefe *S. cerevisiae* die längste Tradition in der Biotechnologie. Sie wurde bereits in der Antike zum Backen, Brauen und Keltern eingesetzt. Heute ist sie der am besten untersuchte Eukaryot, und ihr biotechnologischer Einsatz beschränkt sich bei weitem nicht mehr auf die Erzeugung von Lebensmitteln und Getränken,

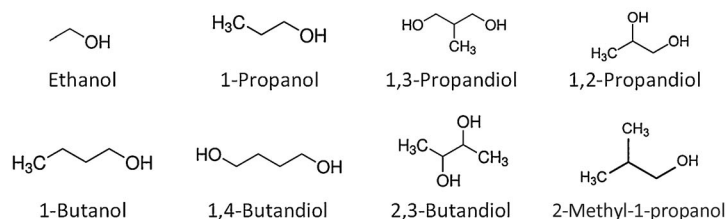


Christoph Wittmann studierte Biotechnologie an der TU Braunschweig. Nach seiner Dissertation an der GBF und seiner Postdoc-Zeit bei Mirja Salkinoja-Salonen in Finnland an der Universität Helsinki im Department of Applied Chemistry and Microbiology habilitierte er bei Elmar Heinzle an der Universität des Saarlandes (UdS). 2007–2013 war er Professor an den Universitäten von Münster und Braunschweig, bevor er 2013 an die UdS zurückkehrte, wo er derzeit das Institut für Systembiotechnologie (iSBio) leitet. Die Forschungsschwerpunkte umfassen Metabolic Engineering, industrielle Biotechnologie und synthetische Biologie.

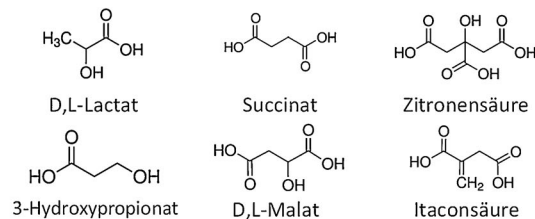


Judith Becker absolvierte ein Biologiestudium an der UdS, das sie 2005 abschloss. Nach ihrer Dissertation an der TU Braunschweig arbeitete sie als Postdoc im Bereich der industriellen Biotechnologie. Seit 2014 hat sie eine feste Wissenschaftlerstelle an der Universität des Saarlandes inne und unterstützt das Forschungsteam des iSBios um Prof. Wittmann.

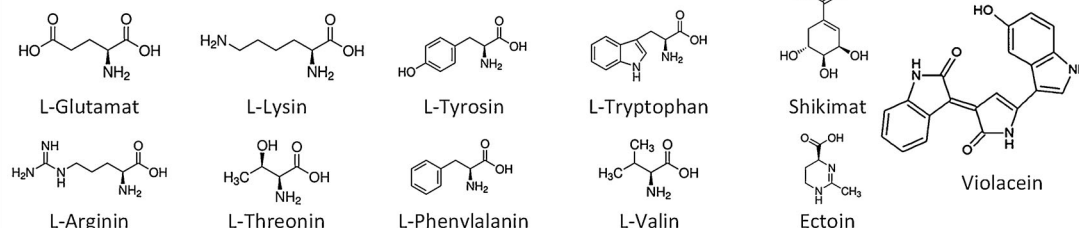
Alkohole



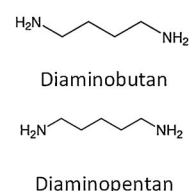
Organische Säuren



Aminosäuren und verwandte Metabolite



Diamine



Terpene

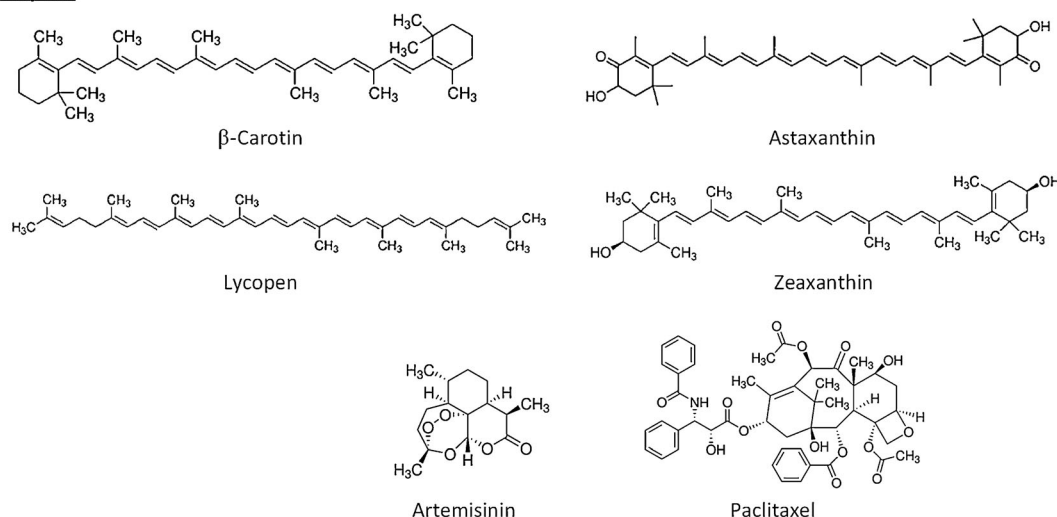


Abbildung 1. Auswahl bio-basierter Chemikalien aus der vielseitigen Produktpalette, die heute mithilfe mikrobieller Fermentationsprozesse hergestellt werden kann.

sondern umfasst mittlerweile auch Biotreibstoffe^[25] Chemikalien,^[6b] Materialien^[26] sowie Produkte für die Nahrungsmittelindustrie und Gesundheitsprodukte (Abbildung 4).^[27] Ihren Aufstieg zu einem der bedeutendsten Plattformorganismen der industriellen Biotechnologie verdankt sie dabei herausragenden Eigenschaften wie einer hohen Robustheit, dem „generally regarded as safe“(GRAS)-Status, der Fähigkeit, aerob und anaerob auf diversen Kohlenstoffquellen zu wachsen, einem breiten pH-Spektrum sowie einem guten Wachstum in industriell relevanten Fermentationsmaßstäben bis zu 100 m³.^[28]

2.4. *Aspergillus* spp.

Vertreter der Spezies *Aspergillus* erlangten industrielle Bedeutung durch ihre Fähigkeit zur effizienten Produktion

von organischen Säuren und Proteinen.^[30] Zu den wichtigsten Produkten gehören dabei die Zitronensäure^[31] und die Itaconsäure,^[32] wobei letztere auf der Liste der Top-Value-Chemikalien aus Biomasse steht.^[10] Die aeroben Fermentationen werden dabei gleichermaßen als Oberflächen- oder Submerskultur durchgeführt, in der Regel im Batchbetrieb mit Reaktorvolumina bis zu 900 m³.^[30a] Da die Stammmorphologie die Produktionseffizienz stark beeinflusst, gehört ihre Regulation zu einem der wichtigsten Prozessparameter im Betrieb.^[31,33]

2.5. *Bacillus subtilis*

Im Hinblick auf den Kenntnisstand zellulärer Prozesse bildet *B. subtilis* in gewisser Weise das Gram-positive Pendant zu *E. coli*, zum Teil aus medizinischem Interesse wegen der

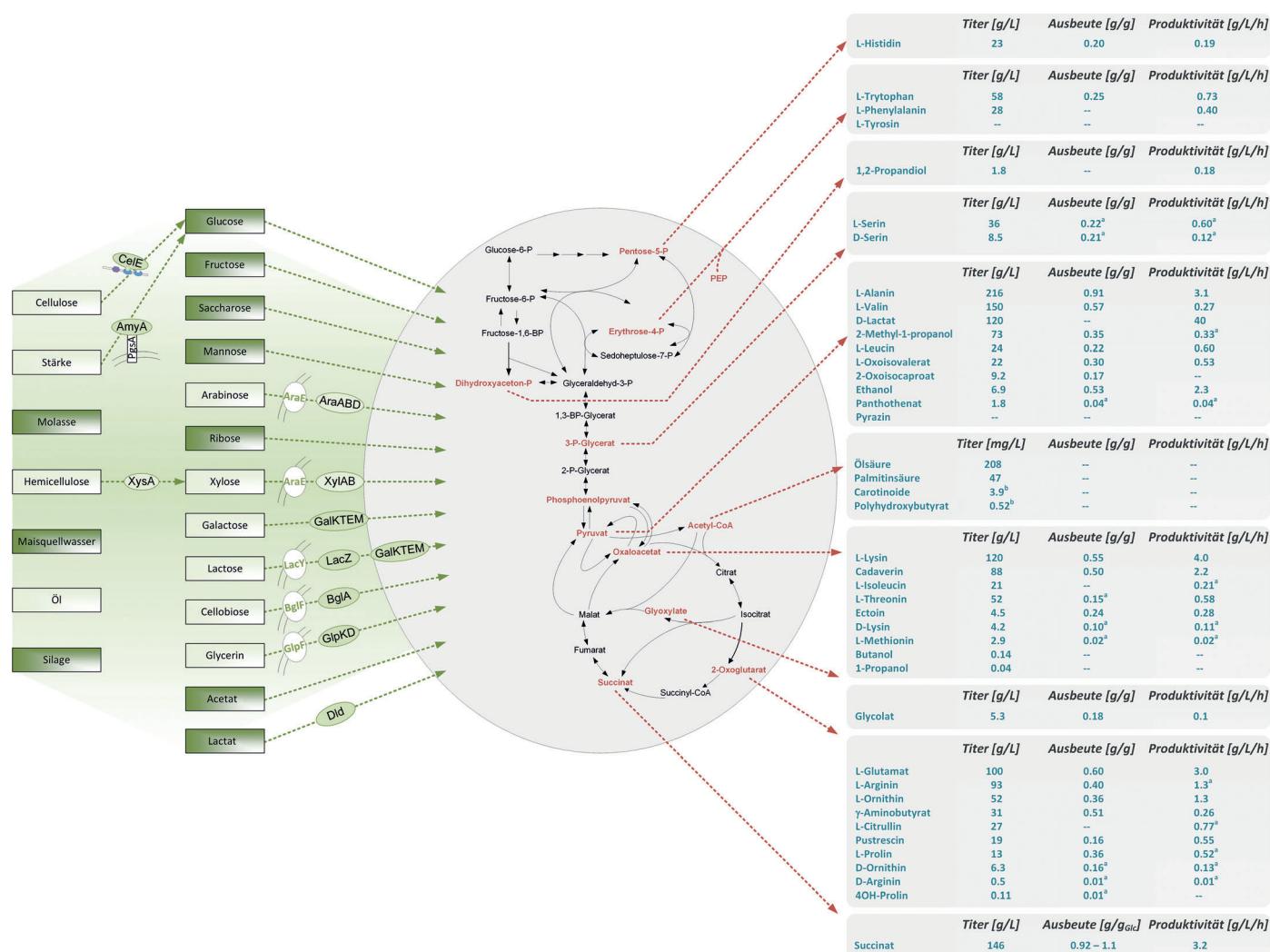


Abbildung 2. Biobasierte Produktionswege zur fermentativen Herstellung von Chemikalien, Treibstoffen und Materialien mithilfe genetisch optimierter Zellfabriken auf Basis von *C. glutamicum*. Natürliche (dunkelgrün) und nichtnatürliche (hellgrün) Kohlenstoffquellen werden im Stoffwechsel in zentrale Intermediate (rot) umgewandelt, die weiter zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden. P = Phosphat, BP = Bisphosphat. Die Produktionseigenschaften wurden aus Literaturdaten übernommen.^[5, 7b, 12a,b,d, 13, 17, 19] Falls nicht anders gekennzeichnet, sind die Ausbeuten in $\text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$ (Glc = Glucose) angegeben. Herauszuhebende Arbeiten sind die Produktion von L-Lysin,^[12a] L-Valin,^[19k] L-Arginin^[19j] und Cadaverin.^[19a] AmyA: α -Amylase; AraABD: L-Ribulokinase, L-Arabinose-Isomerase, L-Ribulose-5-phosphat-4-Epimerase; AraE: Arabinose-Transporter; BglA: Phospho- β -glucosidase; BglF: β -Glucosid-spezifisches Enzym IIBCA-Komponente (PTS); CelE: Endoglucanase; Dld: D-Lactat-Dehydrogenase; GalKTEM: Galactokinase, Galactose-1-phosphat-Uridyl-Transferase, UDP-Glucose-4-Epimerase, Aldose-1-Epimerase; GlpF: Aquaglyceroporin (Helferprotein für Glycerinaufnahme); GlpKD: Glycerin-Kinase, Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; LacY: Lactose-Permease; LacZ: β -Galactosidase; PgsA: Ankerprotein; XylAB: Xylose-Isomerase, Xylulokinase; XysA: Xylanase. [a] Schätzwert auf Literaturbasis; [b] Einheit $\text{mg}_{\text{BTM}}^{-1}$; BTM = Biotrockenmasse.

engen Verwandtschaft zu pathogenen Mikroorganismen wie *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens* und *Staphylococcus aureus*.^[34] Erst kürzlich wurde eine umfassende systembiologische Studie veröffentlicht, die die Osmoregulation, d. h. die Zellantwort auf osmotischen Stress, von *B. subtilis* auf einer Multi-Omics-Ebene beleuchtete.^[35] Als potenter Produzent von Proteinen, Antibiotika, Insektiziden, Geschmacksstoffen und Vitaminen ist *B. subtilis* darüber hinaus auch für die Industrie von enormem Interesse.^[36] Da er weder Exo- noch Endotoxine bildet, werden die Produkte von *B. subtilis* generell als GRAS anerkannt und können damit im Nahrungsmittelbereich und im Gesundheitswesen eingesetzt werden.

2.6. *Ashbya gossypii*

Der Schimmelpilz *Ashbya gossypii* wurde erstmals 1929 isoliert. Als Pflanzenpathogen verursacht er die so genannte Trockenfäule und war für enorme Produktionsausfälle in der Baumwollproduktion in subtropischen Gebieten verantwortlich.^[37] Wegen seines enormen Synthesepotentials für das Vitamin Riboflavin^[38] ergänzte *A. gossypii* jedoch schon bald die Sammlung der biotechnologisch genutzten Produktionsstämme.^[39] Dank der Entschlüsselung des eher kleinen und haploiden Genoms^[40] und der Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur gezielten genetischen Manipulation^[41] konnten optimierte Stämme mit verbesserter Syntheseleis-

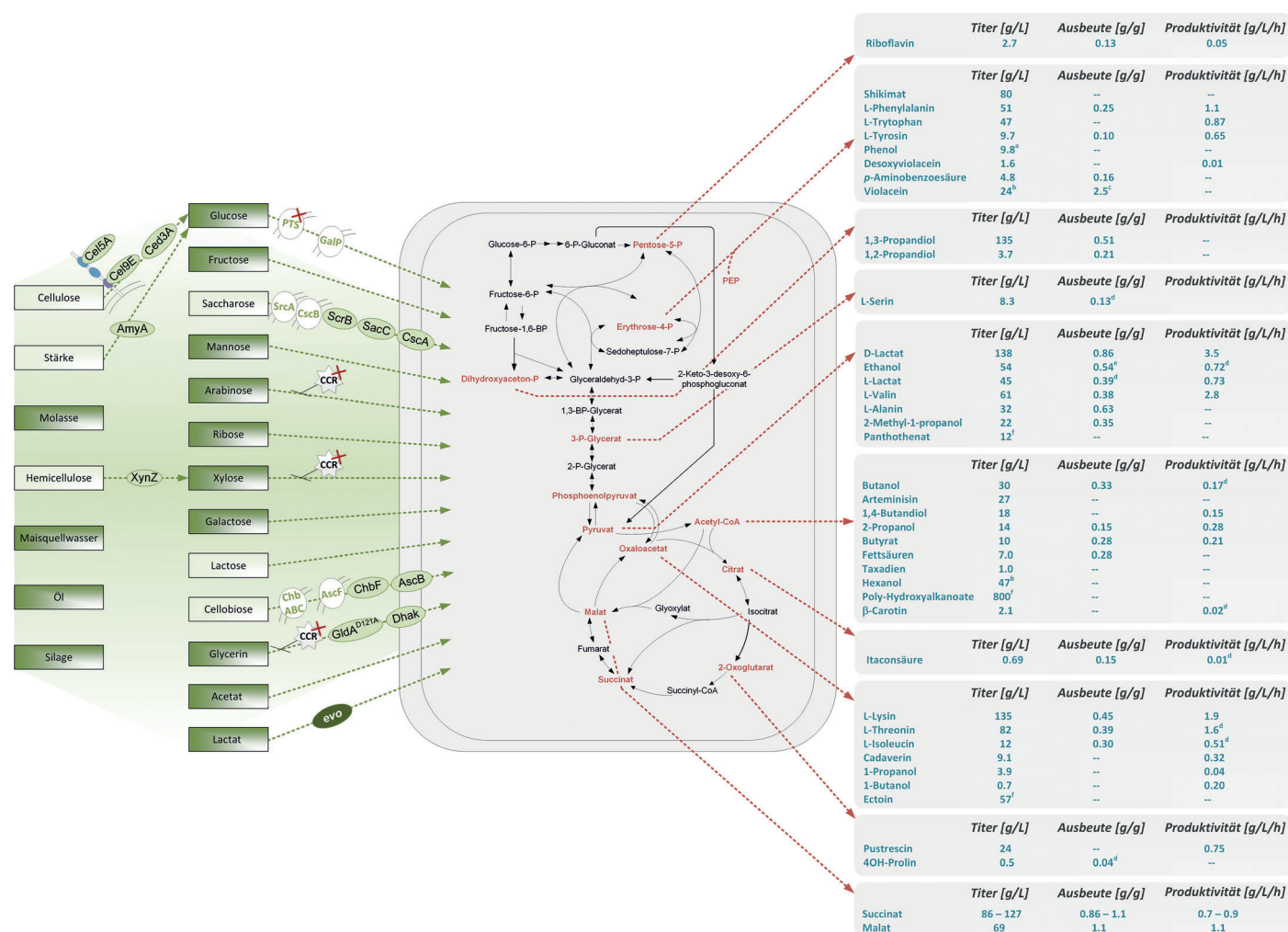


Abbildung 3. Biobasierte Produktionswege zur fermentativen Herstellung von Chemikalien, Treibstoffen und Materialien mithilfe genetisch optimierter Zellfabriken auf Basis von *E. coli*. Natürliche (dunkelgrün) und nichtnatürliche (hellgrün) Kohlenstoffquellen werden im Stoffwechsel in zentrale Intermediate (rot) umgewandelt, die weiter zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden. Die Produktionseigenschaften wurden aus Literaturdaten übernommen.^[7c, 11b, 19e, 22, 23b, 24] Falls nicht anders gekennzeichnet, sind die Ausbeuten in $\text{g}_{\text{g}_{\text{Glc}}}^{-1}$ angegeben. Herauszuhebende Arbeiten sind die Produktion von L-Lysin,^[24ix] L-Threonin,^[24ad] Taxadien^[23a] und 1,3-Propandiol.^[24f] AscB: Phospho-β-glucosidase; AscF: Cellobiose/Arbutin/Salicin-Transporter; CcGH: β-Glucosidase; CCR: Katabolitrepresseion; Ced3A: Cellodextrinase; Cel⁵A: Endoglucanase; Cel9E: Exoglucanase; ChbABC: PEP-abhängiger Transporter; ChbF: Glucosidase; ChbG: Protein mit unbekannter Funktion; ChbR: dualer Aktivator/Regulator; CscB: Saccharose-H⁺-Symporter; CscK: Fructokinase; CscA: Saccharose-6-phosphat-Hydrolase; DHAK: Dihydroxyaceton-Kinase; Evo: evolutive Adaption; GalP: Galactose-Permease; GldA: Glycerin-Dehydrogenase; GlpD: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase; GlpK: Glycerin-Kinase; PHB: Polyhydroxybutyrat; PTS: Phosphotransferasesystem; SacC: β-Fructofuranosidase; ScrB: Saccharose-6-phosphat-Hydrolase; ScrA: Saccharose-Transporter; XynZ: Xylanase. [a] Konzentration in Extraktionsphase; [b] Einheit: mg L^{-1} ; [c] Einheit: $\text{mg g}_{\text{CDM}}^{-1}$; [d] Schätzwert auf Literaturbasis; [e] höher als das theoretische Maximum aufgrund komplexer Medienbestandteile; [f] Einheit: $\text{mg g}_{\text{CDM}}^{-1}$.

tung generiert werden.^[42] Heute beläuft sich die jährliche Riboflavinproduktion mit *A. gossypii* auf über 4000 Tonnen, was etwa 50 % des gesamten Weltmarktes entspricht.^[43]

3. Systems und Synthetic Metabolic Engineering

Obwohl sich im zellulären Stoffwechsel von Mikroorganismen eine Vielzahl von interessanten Molekülen wiederfindet, haben sich diese Kleinstlebewesen leider nicht dazu entwickelt, diese nach unseren Vorstellungen in ausreichender Konzentration und Ausbeute zu synthetisieren. Die effiziente Produktion eines bestimmten Zielmoleküls erfordert daher eine Veränderung des Stoffwechsels, die die Synthe-

leistung verbessert.^[44] Anfänglich durchliefen die Produktionsstämme dazu einen iterativen Prozess aus chemischer oder UV-Licht-basierter Mutagenese, wodurch schrittweise immer bessere Stämme mit letztlich bemerkenswerten Produktionseigenschaften erzeugt wurden.^[39, 45] Diese eher ungerichtete Vorgehensweise führte allerdings zu einer metabolischen Belastung der Zellen durch die inhärente Anhäufung von Nebenmutationen, die im besten Fall ohne Auswirkung auf die Produktion sind, im schlimmsten Fall jedoch physiologische Nachteile mit sich bringen. Ein durch Zufallsmutagenese und Selektion erzeugter Produktionsstamm kann mehrere tausend Mutationen tragen, von denen vermutlich nur ein Bruchteil tatsächlich hilfreich für die Produktion ist. Derart generierte Stämme zeigen typischerweise

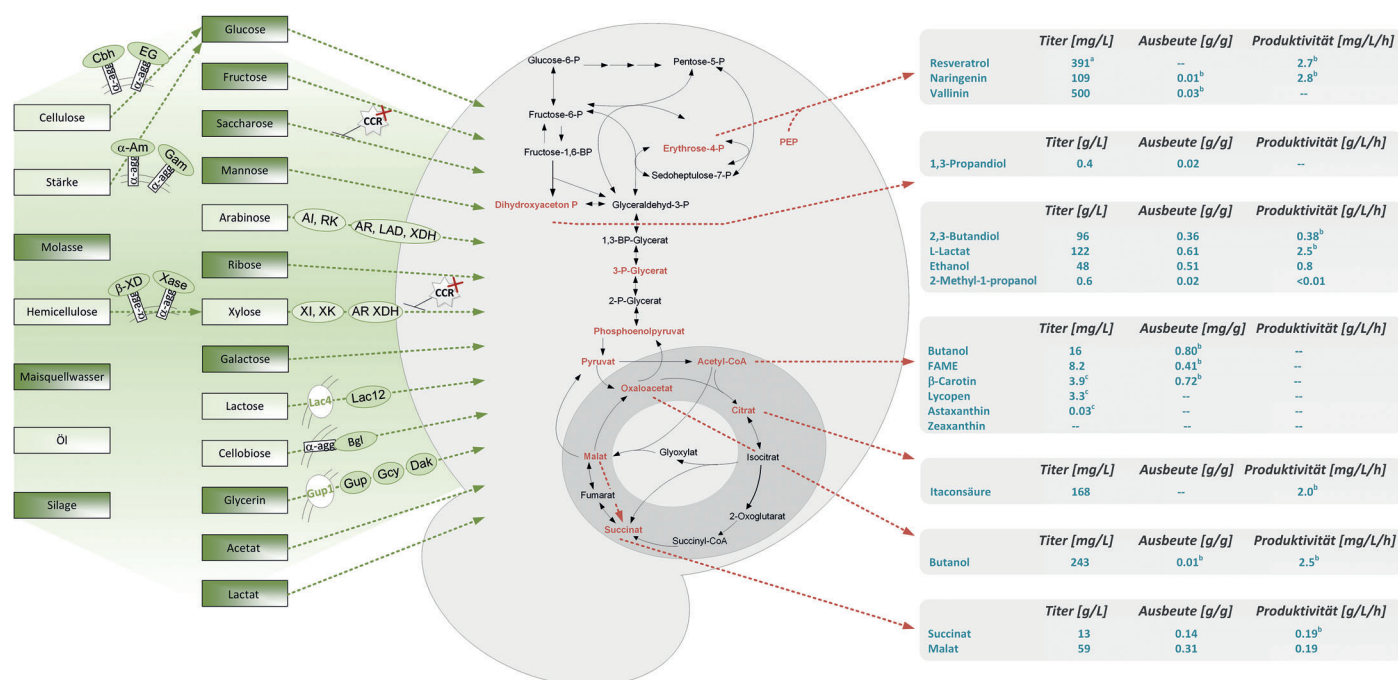


Abbildung 4. Biobasierte Produktionswege zur fermentativen Herstellung von Chemikalien, Treibstoffen und Materialien mithilfe genetisch optimierter Zellfabriken auf Basis von *S. cerevisiae*. Natürliche (dunkelgrün) und nichtnatürliche (hellgrün) Kohlenstoffquellen werden im Stoffwechsel in zentrale Intermediate (rot) umgewandelt, die weiter zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden. Die Produktionseigenschaften wurden aus Literaturdaten übernommen.^[29] Falls nicht anders gekennzeichnet, sind die Ausbeuten in $\text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$ angegeben. Herauszuhebende Arbeiten sind die Produktion von Lactat,^[29] 2,3-Butandiol^[29] und Malat.^[29] α -agg: α -Agglutinin; AI: Arabinose-Isomerase; α -Am: α -Amylase; AR: Aldose-Reduktase; BGL: β -Glucosidase; CBH: Cellobiose-Hydrolase; Dak: Dihydroxyaceton-Kinase; EG: Endoglucanase; Gam: Glucoamylase; Gcy: Glycerin-Dehydrogenase; Gup1: Glycerin-Aufnahmeprotein; LAC4: β -Galactosidase; LAC12: Lactose-Permease; LAD: Arabitol-Dehydrogenase; RK: Ribulokinase; Xase: Xylanase; β -Xd: β -Xylosidase; XDH: Xylit-Dehydrogenase; XI: Xylose-Isomerase; XK: Xylulokinase; ALX: Xylulose-Reduktase. [a] Aus Cumarsäure synthetisiert; [b] Schätzwert auf Literaturbasis; [c] Einheit: $\text{mg}_{\text{CDM}}^{-1}$.

Wachstumsdefizite, geringe Stresstoleranzen und erhöhte Nährstoffanforderungen. Das Metabolic Engineering hat nun, ermöglicht durch die rekombinante DNA-Technologie, die Stammerzzeugung zu einer wissenschaftlichen und zielgerichteten Methode gemacht, die uns in die Lage versetzt, eine neue Generation von Produktionsstämmen hervorzubringen.^[46] Für bereits etablierte Industrieprozesse schien es bislang allerdings äußerst anspruchsvoll, die Leistung der klassischen Produktionsstämmen zu erreichen. Bedingt durch die eher lokale Fokussierung auf bestimmte Stoffwechselbereiche, fehlte dem Konzept des Metabolic Engineering der stoffwechselübergreifende und globale Blick auf die komplexen Interaktionen des gesamten metabolischen Netzwerkes.^[11b] Dieser globale Charakter wurde mittlerweile durch die Einführung des Systems und Synthetic Metabolic Engineering geschaffen, wodurch das Forschungsfeld der Stammoptimierung auf eine neue Ebene gehoben wurde (Abbildung 5). Die enormen konzeptionellen und technologischen Errungenschaften in den Bereichen der quantitativen und systemweiten Analyse von zellulären Komponenten und Stoffwechselaktivitäten, die Modellierung metabolischer und regulatorischer Netzwerke, das Protein-Engineering sowie die gezielten Genomveränderungen haben die Stammkonstruktion in der Tat zu einer Design-Wissenschaft erhoben.^[11b,44,47] Das Systems und Synthetic Metabolic Engineering erzeugt maßgeschneiderte Zellfabriken mit optimierten

Eigenschaften als vielversprechende Grundlage für den ökonomischen Erfolg einer bio-basierten Industrie.

3.1. Systembiologische Analyse

Ein grundlegendes Verständnis der zellulären Physiologie und ihrer Regulation bildet die Wissensbasis für die rationale Stammoptimierung. So genannte „Omics“-Plattform-Technologien bieten, was dafür notwendig ist: umfassende und quantitative Daten auf den verschiedenen Ebenen der Gene, Transkripte, Proteine, Metaboliten und Stoffwechselwege, deren Auswertung und Integration die beste Strategie für die Gentechniker offenlegt, wie der Organismus zu verändern ist. Hierbei trägt das Genom das gesamte genetische Repertoire. Heute kann ein mikrobielles Genom innerhalb weniger Tage sequenziert werden. In den letzten Jahren unterstützte die Genomsequenzierung grundlegend das Verständnis mikrobieller Systeme durch die Identifikation von Biosynthesewegen sowie die Aufdeckung evolutiver Pfade.^[40,48] Insbesondere die Computer-gestützte Modellierung hat stark von der großen Menge der anfallenden Genomsequenzen profitiert.^[49] Deren Verfügbarkeit erleichterte darüber hinaus die Abläufe der rekombinanten Gentechnologie sowie das Transkriptom- und Proteom-Profilierung. Vergleichende Sequenzanalysen von nichtproduzierenden und klassisch opti-

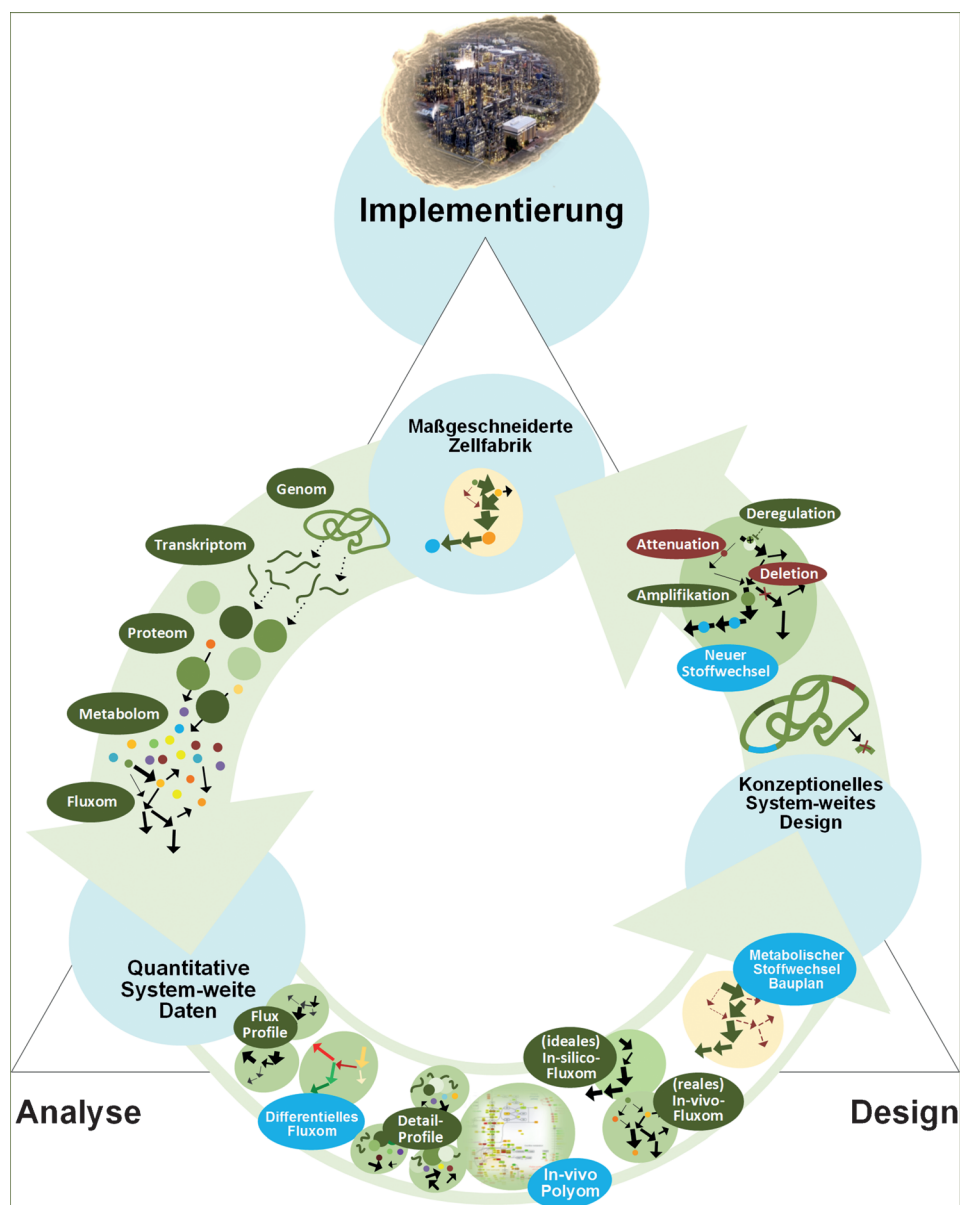


Abbildung 5. Iterativer Ansatz des Systems Metabolic Engineering zur Erzeugung optimierter industrieller Produktionsstämme. Die Vorgehensweise basiert auf systembiologischen Studien, die moderne Omics-Methoden zur Entschlüsselung des Genoms, Transkriptoms, Proteoms, Metaboloms und Fluxoms heranziehen, wobei diese alternativ als Einzelstudie oder als integrierte Multi-Omics-Studie durchgeführt werden können. Die umfassenden Datensätze sowie deren Auswertung in Kombination mit Softwarepaketen und metabolischer Modellierung ermöglichen dann ein konzeptionelles systemübergreifendes metabolisches Stoffwechsel-design, das in einen genetischen Bauplan zur gezielten Genommanipulation übersetzt werden muss, um eine optimierte Zellfabrik zu generieren.

mierten Stämmen oder der Vergleich von Wildtyp und evolutiv adaptierten Stämmen ermöglichen sogar eine direkte Identifizierung genetischer Ziele, die für gewünschte Phänotypen kodieren. Dies hat sich beispielsweise im Zuge des Genome Breedings bewährt, bei dem auf Basis des Erbgutvergleichs zwischen Wildstamm und Produktionsstamm wertvolle Punktmutationen identifiziert und dann gezielt in den Wildstamm eingebracht werden können. Durch den selektiven Einbau solcher Mutationen wurde zum ersten Mal ein minimal mutierter *C. glutamicum*-Stamm für die effiziente L-Lysin-Produktion entwickelt.^[50] Basierend auf Ge-

nomsequenzdaten wurden DNA-Mikroarrays für die systemweite Analyse des Transkriptoms entwickelt, mit denen dynamische Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Stämmen, Kultivierungsbedingungen und Wachstumsphasen aufgedeckt werden können. Dies ermöglichte beispielsweise neue Einblicke in physiologische Aspekte des Kohlenstoff-,^[51] Stickstoff-^[52] oder Schwefel-Stoffwechsels.^[53] Mittlerweile wird die Transkriptomanalyse eingesetzt, um globale regulatorische Netzwerke in Mikroorganismen aufzuklären,^[54] und auch für das rationale Stammesdesign. Beispiele umfassen die Verbesserung der Produktion von L-Lysin,^[55] Diaminopentan^[56] und L-Valin^[57] mit *C. glutamicum*, die Produktion von L-Valin^[58] und L-Threonin^[24ad] mit *E. coli*, die Riboflavin-Produktion mit *B. subtilis*^[59] sowie die Verwertung von Xylose durch modifizierte *S. cerevisiae*-Stämme.^[60] Als fortschrittlichere Technik ermöglicht die RNA-Sequenzierung heute auch die absolute Quantifizierung von RNA-Transkripten und liefert Daten mit noch höherem Informationsgehalt und höherer Genauigkeit als DNA-Mikroarrays.^[61] Diese Technologie gab neue Einblicke in die transkriptionelle Organisation von Zellen und die regulatorische Funktion von kleinen RNAs, was zukünftig zur Aufklärung globaler Transkriptionsnetzwerke genutzt werden kann.^[62]

Die Proteomanalyse stützt sich auf eine effiziente elektrophoretische oder chromatographische Trennung von Proteinen oder daraus erzeugten proteolytischen Peptiden, in Verbindung mit deren Identifikation mithilfe von Massenspektrometrie und Datenbankrecherchen.^[63] Im systembiologischen Kontext gab die Proteomanalyse Einblicke in die zelluläre Antwort von Bakterien auf Umweltveränderungen,^[35,64] einschließlich Mangelernährung^[35] und Nährstoffverfügbarkeit.^[65] Darüber hinaus ermöglichte diese Technik Genfunktions-Analysen, die Aufklärung von Stoffwechselwegen oder die Korrektur falscher Gen-Annotationen, mit möglichen Auswirkungen für industrielle Anwendungen.^[66]

Die Metabolomanalyse, die auf eine quantitative Erfassung zellulärer Metaboliten ausgerichtet ist, ist einer der anspruchsvollsten „Omics“-Ansätze. Eine verlässliche Analyse erfordert nicht nur ein effizientes Abstoppen des Stoffwechsels, um den metabolischen Status der Zelle zu fixieren, ohne dabei jedoch das Metabolom durch so genannte Leakage-Effekte, d.h. Metabolitverluste aus den Zellen während der Probenahme und -behandlung, zu verfälschen,^[67] sondern bedarf ebenso einer leistungsstarken Analyseplattform, die eine parallele Quantifizierung einer Vielzahl von chemisch diversen, oft gering konzentrierten und teilweise instabilen Metaboliten in geringen Probenvolumina ermöglicht. Aktuell arbeiten Forschergruppen kontinuierlich daran, den experimentellen Workflow sowie die Analyse zu verbessern, um Metabolomdatensätze mit relevanter biologischer Bedeutung zu erzeugen.^[67a,68] Sorgfältig und gewissenhaft eingesetzt, kann die Metabolomanalyse als wertvolles Hilfsmittel verwendet werden, um metabolische Flaschenhälse, bis dato unbekannte Stoffwechselwege und biochemische Reaktionen zu identifizieren.^[69] Das Fluxom, d.h. die In-vivo-Aktivität von biochemischen Reaktionen und Stoffwechselwegen, reflektiert am besten den physiologischen Phänotyp eines Organismus. Die metabolischen Stoffflüsse repräsentieren dabei einen integrierten Output aller Gene, Transkripte, Proteine und Metaboliten und verknüpfen diese mit zellulären Funktionen. Für ein systembiologisches Verständnis scheint die metabolische Flussanalyse daher unersetzlich.^[47a] Durch die Aufklärung von Stoffwechselfunktionen, die Entdeckung neuer Stoffwechselwege und den Einblick in die Stabilität und Robustheit von metabolischen Netzwerken hat sie bereits ihren Wert bewiesen.^[47a] Die metabolische Flussanalyse wurde darüber hinaus insbesondere zur systematischen Analyse von *C. glutamicum* eingesetzt, mit dem Augenmerk auf spezifischen Stammunterschieden,^[70] Kultivierungsbedingungen^[71] und Wachstumsphasen.^[72] Dies hat stark zur Entwicklung verbesserter Produktionsstämme beigetragen.^[7b,73]

3.2. Stoffwechseldesign

Die Erzeugung eines industriell kompetitiven Produktionsstammes erfordert ganz klar ein globales Umleiten der Stoffflüsse. Dies wiederum bedarf einer ausbalancierten Kombination von nützlichen Modifikationen, die sich typischerweise in scheinbar voneinander entfernten Teilen des Metabolismus wiederfinden. An dieser Stelle besteht die Kunst des Wissenschaftlers darin, für das zelluläre Engineering wirklich relevante Informationen aus der großen und komplexen Datenflut zu ziehen, die ein systembiologisches Experiment in der Regel generiert. Modelle, statistische Methoden und Datenbanken sind hierbei hilfreich, um eine solche Multi-Target-Aufgabe zu meistern. Mithilfe statistischer Methoden und geeigneter Softwarepakete lassen sich große Datensätze prozessieren und visualisieren, um biologisch bedeutsame Korrelationen zu erstellen und Schlussfolgerungen zu ziehen.^[35,74] Hier liefern bereits einzelne Omics-Datensätze wichtige Einblicke in den zellulären Metabolismus. Der Wissensgewinn und der Informationsgehalt können

jedoch deutlich erweitert werden, wenn Datensätze aus mehreren Omics-Studien umfassend integriert und kombiniert werden. Häufig kombiniert werden dabei die gängigen Proteom- und Transkriptomanalyse, um Regulationsebenen der Expressionskontrolle aufzudecken.^[47a,75] Die Integration von Metabolom- und Fluxomdaten steht noch am Anfang, auch wenn wegweisende Studien bereits ihren besonderen Wert aufgezeigt haben, um zelluläre Komponenten mit Netzwerkfunktionen und deren Regulation zu verknüpfen.^[35,47a,72a] Insbesondere bewährt hat sich in diesem Zusammenhang auch die Computer-gestützte Rekonstruktion metabolischer Netzwerke auf Basis von Genomsequenzendaten. Sie dienen dabei als informative Bibliographien, die eine Zuordnung von experimentellen Daten zu zellulären Komponenten sowie deren Einordnung in einen globalen biologischen Kontext erlauben. Zusätzlich ermöglichen sie eine theoretische Untersuchung des Netzwerkverhaltens, seiner Robustheit sowie der natürlichen biologischen Grenzen.^[49] Entsprechende Netzwerke wurden eingesetzt, um ausschließlich simulationsbasiert relevante Aspekte der Produktion von L-Methionin,^[76] L-Lysin,^[12a,49b,77] Riboflavin,^[78] Succinat^[79] und diversen Alkoholen^[78b,80] zu beleuchten, einschließlich der Vorhersage optimaler Ausbeuten, Stoffwechselwege und genetischer Targets. Der derzeit ausgereifteste Ansatz für das modellbasierte Zelldesign integriert In-vivo- und Computer-gestützte Fluxdaten, um darauf aufbauend eine netzwerkweite Vorhersage genetischer Ziele zu treffen, die die gewünschten Flussveränderungen herbeiführen sollen. Entsprechende Flux-Designs wurden in kürzlich publizierten Studien eingesetzt, um optimierte Zellfabriken für industriell interessante Produkte zu generieren.^[12a,29b,49b,78b,81]

3.3. Genommanipulation

Typischerweise werden Genetiker, die in diesem Feld arbeiten, mit einer anspruchsvollen und breiten Wunschliste konfrontiert. Der metabolische Bauplan, der aus der systemweiten Analyse resultiert, muss nun in einen geeigneten genetischen Bauplan übersetzt werden, der eine präzise und einstellbare Kontrolle der Stoffflüsse ermöglicht. Glücklicherweise wurden in den letzten Jahrzehnten die genetischen „Werkzeuge“ kontinuierlich weiterentwickelt, sodass wir heute gezielt DNA-Fragmente mithilfe der Polymerasekettenreaktion amplifizieren^[82] sowie Restriktionsenzyme^[83] und Ligasen^[84] als molekulare Scheren und Kleber nutzen können. Darüber hinaus ermöglichen fortschrittlichere Techniken mittlerweile die Konstruktion von vollständig künstlichen Genomen^[85] unter Einbeziehung von chemischer Gensynthese^[86] sowie In-vitro- und In-vivo-Assemblierung von DNA.^[87] Insgesamt steht damit ein vielfältiges Methodenrepertoire für die gezielte DNA-Manipulation zur Verfügung, das von einzelnen Punktmutationen bis hin zur Konstruktion von vollständig synthetischen Stoffwechselwegen und genetischen Regelkreisen, die mehrere tausend Basenpaare umfassen, viele Möglichkeiten bietet.

Die Deletion von Genen, d.h. die Entfernung der entsprechenden Stoffwechselreaktion aus dem biochemischen Netzwerk, wird häufig eingesetzt, um den Kohlenstoffver-

brauch durch unerwünschte und konkurrierende Reaktionen zu unterbinden. Insbesondere anaerobe Prozesse leiden häufig unter hohen Nebenproduktflüssen und sind daher häufig auf Deletionsmutanten angewiesen, wodurch eine Mischfermentation vermieden wird.^[16–17,88] Während diese Modifikationen eher die Netzwerkperipherie betreffen, gibt es durchaus auch Situationen, die die Deletion von Reaktionen aus dem Zentralstoffwechsel notwendig machen, häufig, um die Verfügbarkeit von Kohlenstoffbausteinen zu verbessern. Bekannte Beispiele umfassen die Produktion von Lysin, Diaminopentan und Glutamat mit *C. glutamicum*^[69d,89] sowie die Produktion von Arenen, Threonin und Valin mit *E. coli*.^[24ad,45b,58,90] Obwohl Punktmutationen nur ein einzelnes Nukleotid im gesamten Genom verändern, sind sie erstaunlich wirkungsvoll für das Enzym-Engineering und die Expressionskontrolle. An regulatorischen Stellen oder der Substratbindestelle eingebracht, können Punktmutationen Rückkopplungshemmungen und metabolische Kontrollen aufheben,^[91] kinetische Parameter beeinflussen^[50c] sowie Substrat- und Kofaktorspezifitäten von Enzymen verändern.^[92] Sogar stille Mutationen, d.h. Mutationen, die keine Auswirkung auf die Proteinsequenz selbst haben, werden zur Expressionskontrolle auf Ebene der Translationseffizienz eingesetzt.^[93] Darauf basiert die so genannte Codon-Optimierung, mit der die heterologe Expression von Spendergenen in einem fremden Wirtstamm verbessert werden kann.^[7b,15b,19v,94] Umgekehrt kann durch eine Variation des Startcodons der Proteintranslation ein konkurrierender Stoffwechselweg graduell abgeschwächt werden, ohne diesen dabei radikal durch eine Deletion zu eliminieren,^[95] da Deletionen häufig unerwünschte Nebeneffekte nach sich ziehen können.^[96] Die Codon-Strategie macht dadurch auch solche Enzyme und Stoffwechselwege genetisch zugänglich, die eher empfindlich auf genetische Modifikationen reagieren und essentiell für Wachstum und Vitalität sind.

Praktisch alle Optimierungsstrategien enthalten in irgendeiner Form die Überexpression von Genen, die produktionsrelevante Proteine kodieren. Der direkteste Weg zur Überexpression ist in der Regel die Verwendung von episomalen, autonom replizierenden Plasmiden, mit deren Hilfe die Anzahl der Genkopien in der Zelle erhöht werden kann.^[15b,24k,97] Die Gendosis ist bei der Verwendung solcher Plasmide jedoch kaum einstellbar, was bei zu starker Expression unter Umständen zur Bildung von Einschlusskörpern und damit zum Funktionsverlust des Zielproteins führen kann.^[22a] Der Einbau von zusätzlichen Genkopien direkt in das Genom kann hier von größerem Nutzen sein, weil damit das Expressionsniveau genauer einstellbar ist.^[12a] Im praktischen Einsatz hat sich jedoch die Verwendung von alternativen Promotoren bewährt. Die Forschung der letzten Jahrzehnte brachte bereits ein beachtliches Repertoire an konstitutiven und induzierbaren natürlichen Promotoren hervor,^[97b,98] die kürzlich durch die Erzeugung synthetischer Promotoren ergänzt wurden. Für das Systems Metabolic Engineering ist diese Palette an Promotoren mit vielfältiger Expressionsstärke ein entscheidender Durchbruch, weil dadurch eine individuelle Feinanpassung der Genexpression ermöglicht wurde.^[99] Als weitere gentechnische Strategie ist die Expression von Fremdgenen zu nennen, durch die na-

türliche genetische Grenzen überwunden werden können: Fremdgene von Spenderorganismen können heterolog in ausgewählte Produktionswirte eingebracht werden, um in diesen neue metabolische Funktionen zu vermitteln. Dadurch konnte sowohl das Produkt- als auch das Substratspektrum von industriellen Produzenten substanziell erweitert werden.^[1b,c,29h,44] Klassische Klonierungstechniken, die die Gensequenz des Spenders unverändert lassen, werden mittlerweile mehr und mehr durch Vorgehensweisen ersetzt, die synthetische Gene, Gencluster und Operons verwenden. Die Synthese künstlicher Gene profitiert dabei stark von der oben genannten Codon-Optimierung, d.h. der Anpassung der Gensequenz an die Expressionsmaschinerie des Wirtes, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen und starken Expression deutlich erhöht wird.^[100] Dies scheint besonders nützlich im Hinblick auf die Produktion von komplexen Molekülen aus höheren Organismen wie Pflanzen und Säugetieren in mikrobiellen Systemen.

4. Bio-basierte Chemikalien

4.1. Propandiol

Propandiole (PDOs) sind Plattformchemikalien mit drei Kohlenstoffatomen, die derzeit aus nicht nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden. Der Einsatzbereich von 1,2-PDO erstreckt sich dabei von der Verwendung als Enteisener und Frostschutzmittel, über Feuchtigkeitscreme bis hin zu Lebensmittelzusätzen. 1,3-PDO wird dagegen überwiegend als Polymerbaustein verwendet. Das Metabolic Engineering zur 1,2-PDO-Produktion stützt sich überwiegend auf die Methylglyoxal-Route, die die Enzyme Methylglyoxal-Synthase und Glycerin-Dehydrogenase verwendet. In *E. coli* führte bereits die Überexpression der nativen Gene zur 1,2-PDO-Produktion, während für *S. cerevisiae* und *C. glutamicum* eine heterologe Genexpression erforderlich war.^[17c,101] *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden über diese grundlegende Machbarkeitsstudie hinaus weiter optimiert, wobei in beiden Fällen eine Deletion der Triosephosphat-Isomerase von Nutzen war.^[24e,101b] Die beste Produktion von 3.7 g L⁻¹ 1,2-PDO wurde mit *E. coli* erzielt, der durch einen kombinierten Ansatz von rationalem und evolutivem Engineering erzeugt wurde.^[24e] Für die Produktion von 1,3-PDO ist Glycerin die bevorzugte Kohlenstoffquelle, da lediglich zwei Enzyme – Glycerin-Dehydratase und 1,3-PDO-Oxidoreduktase, den Umsatz von Glycerin zu 1,3-PDO katalysieren.^[24e] Für *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden allerdings auch Stämme beschrieben, die 1,3-PDO de novo aus Glucose über Glycerin als Zwischenprodukt synthetisieren.^[24f,29d] DuPont und Genencor International, Inc. schafften dabei mit ihrem proprietären *E.-coli*-Stamm sogar den Sprung in die kommerzielle biotechnologische Produktion.^[102] Der Stamm wurde dabei weitreichend modifiziert durch:

- 1) die Expression des Glycerinstoffwechsels (Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase und Glycerin-3-phosphat-Phosphatase) aus *S. cerevisiae*,
- 2) die Expression der Glycerin-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae*,

- 3) die endogene Expression der 1,3-PDO-Dehydrogenase, deren katalytische Effizienz mittels fehlerbehafteter Polymerasekettenreaktion (error-prone PCR) verbessert wurde,
- 4) die Eliminierung der Glycerinverstoffwechselung,
- 5) die Abschwächung der Expression der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase,
- 6) den Austausch des Phosphotransferasesystems durch die PEP-unabhängige Glucoseaufnahme mittels Galactose-Permease und Glucokinase.^[24f, 102]

Der optimierte Stamm akkumulierte 135 g L^{-1} 1,3-PDO in einer Ausbeute von 0.51 g g^{-1} (= g Produkt pro g Substrat).^[24f]

4.2. Butandiol

Vergleichbar zu den Propandiolen werden auch die beiden Butandiole (BDOs) 1,4-Butandiol und 2,3-Butandiol als vielseitige Plattformchemikalien für die Produktion von Medikamenten, Kosmetika, Lösungsmitteln und Polymeren eingesetzt, mit einem Jahresproduktionsvolumen von mittlerweile 2.5 Millionen Tonnen.^[29g, 103] 2,3-BDO ist ein natürliches Fermentationsprodukt von *S. cerevisiae*, das häufig in obergärigen Bieren vorkommt. Die Produktion wurde optimiert, indem konkurrierende Stoffwechselwege ausgeschaltet wurden, die Biosynthese stimuliert wurde und die Glucoseaufnahmerate durch evolutive Ansätze verstärkt wurde.^[29g] Darüber hinaus wurde das Substratspektrum für die 2,3-BDO-Produktion auf Xylose und Cellobiose erweitert.^[104] Die Glucose-basierte Produktion ermöglichte allerdings die höchste Konzentration von 96 g L^{-1} .^[29g] In *E. coli* wurde die 2,3-BDO-Produktion ermöglicht, indem die Gene *budA* (Acetolactat-Decarboxylase), *budB* (Acetolactat-Synthase) und *budC* (Butandiol-Dehydrogenase) aus *K. pneumoniae* implementiert wurden.^[105] Die maximal erzielte Konzentration von ca. 1 g L^{-1} fällt jedoch weit hinter die von Hefe zurück.^[106] Umgekehrt verhält es sich für die 1,4-BDO-Produktion. Hier wurde erstmals *E. coli* für die biokatalytische Umsetzung von nachwachsenden Rohstoffen in 1,4-BDO eingesetzt, mit einer beachtlichen Produktion von 18 g L^{-1} .^[103] Weitere Verbesserungen gipfelten in einer großskaligen BDO-Produktion innerhalb einer gemeinsamen Kampagne von Genomatica und DuPont Tate & Lyle Bio Products Company, bei der über 2000 metrische Tonnen BDO durch direkte Fermentation hergestellt wurden.

4.3. Succinat

In den letzten Jahren hat Succinat als eine der zwölf Top-Value-Chemikalien aus Biomasse einige Aufmerksamkeit auf sich gezogen.^[10] Die wachsende Popularität des „Bio“-Labels für Succinat hat die Entwicklung von Fermentationsprozessen vorangetrieben. Mittlerweile wurde auch von einigen Firmen, darunter Myriant (mit ThyssenKrupp Uhde), Bio-Amber (Joint Venture mit Mitsui & Co.) und Succinity GmbH (Joint Venture von BASF SE und Corbion Purac), das Stadium der industriellen Großproduktion erreicht, wobei proprietäre Organismen wie metabolisch optimierte *E. coli*-Stämme, Hefen und *Basfia succiniciproducens* zum Einsatz

kommen.^[6a, 88a] Auf akademischer Seite wurde aufgezeigt, dass die Produktionsprozesse stark von der Deletion von Genen profitierten, die zu alternativen Fermentationsprodukten wie Lactat, Acetat, Formiat und Ethanol führen.^[19x, 24z, aa, 107] Für *E. coli* und *C. glutamicum* wurden Stämme beschrieben, die bis zu 127 bzw. 146 g L^{-1} Succinat produzieren (Abbildungen 2 und 3), wobei für *C. glutamicum* Wachstums- und Produktionsphasen entkoppelt sind.^[19x, 24y] Durch einen Überschuss an Carbonat im Produktionsmedium konnte die CO_2 -Fixierung über die anaplerotischen Reaktionen stimuliert werden, wodurch sich Ausbeuten von über 1.0 g g^{-1} erzielen ließen.^[107a] Mit *C. glutamicum* konnte auch eine aerobe Succinatproduktion etabliert werden, indem die Nebenproduktbildung unterbunden, der Citratzyklus stromabwärts von Succinat unterbrochen und die anaplerotische Carboxylierung überexprimiert wurde.^[108] Weitere Verbesserungen wurden durch ein Acetat-Recycling sowie einen verstärkten oxidativen Citratzyklusfluss durch Überexpression der Citrat-Synthase erzielt.^[109] Die Produktion erreichte allerdings nicht die Leistung des anaeroben Prozesses. Die *S. cerevisiae*-basierte Succinat-Produktion steht noch in den Anfängen, ist allerdings vielversprechend wegen der guten Wachstumseigenschaften von Hefe bei niedrigen pH-Werten, was sich vorteilhaft auf den Aufarbeitungsprozess auswirken würde.^[29r] Derzeit werden sowohl aerobe als auch anaerobe Prozesse evaluiert,^[28, 29r, 79, 110] wobei eine gemischt oxidativ-reduktive Produktion am vorteilhaftesten scheint.^[111]

4.4. Malat

Gegenüber der chemischen Synthese hat die bio-basierte Produktion von Malat den Vorteil, dass stereospezifisch reines L-Malat hergestellt werden kann. Analog zu Succinat erfolgt die Biosynthese in Mikroorganismen alternativ über den reduktiven oder oxidativen Zweig des Citratzyklus oder über den Glyoxylatweg. Da *E. coli*-basierte Succinatproduzenten bereits Malat als Nebenprodukt bilden,^[24aa] wurde aufbauend auf diesen Stämmen eine weitere Optimierung vorgenommen, die die Deletion der durch die Enzyme Fumarat-Reduktase und Malatenzym katalysierten Malat-assoziierten Reaktionen umfassten.^[112] Obwohl die Endkonzentration von 34 g L^{-1} deutlich niedriger als die erzielte Succinatkonzentration war, erreichten diese Stämme beeindruckend hohe Ausbeuten (1.1 g g^{-1}).^[112] Im Fall von *S. cerevisiae* wurde durch Engineering der Pyruvat-Carboxylase, der Oxalacetat-Reduktase und des Malatexportes ein Stamm generiert, der 59 g L^{-1} Malat in einer Ausbeute von 0.31 g g^{-1} produzierte.^[29t]

4.5. Itaconsäure

Itaconsäure – eine C_5 -Dicarbonsäure – wird häufig für die Homopolymerproduktion von Polyacrylaten und Gummi eingesetzt.^[113] Metabolisch gesehen ist sie eng mit der Zitronensäure verwandt und kann aus diesem zentralen Intermediat des Citratzyklus über *cis*-Acotinat und anschließende Decarboxylierung synthetisiert werden.^[32] Industriell wird

Itaconsäure mittels Submerskulturen von *Aspergillus* spp. hergestellt, wobei hervorragende Konzentrationen (86 g L^{-1}) und Ausbeuten (0.62 g g^{-1}) erzielt werden.^[114] Die erreichte Konzentration liegt dabei sogar bei der maximalen Löslichkeit in Wasser.^[114,115] Erst kürzlich ist es durch die heterologe Expression der Aconitat-Decarboxylase aus *A. terreus* gelungen, *S. cerevisiae* in einen Itaconsäureproduzenten umzuwandeln, wenn auch mit geringer Produktionseffizienz (Abbildung 4).^[29a] Eine ähnliche Strategie ermöglichte auch eine, wenn auch vergleichsweise schwache, Itaconsäureproduktion mit *E. coli*. Titer von bis zu 690 mg L^{-1} wurden dann durch weitere Modifikationen erzielt, darunter die Implementierung der Citrat-Synthase und der Aconitase aus *Corynebacterium glutamicum* und die Deletion der Gene, die für die Phosphatacetyl-Transferase sowie die Lactat-Dehydrogenase kodieren.^[24ae]

5. Materialien

5.1. Diamine

Das C_6 -Diamin Diaminohexan ist einer der bedeutendsten Bausteine der Polymerindustrie (spezifischer der Polyamidindustrie), mit einem Jahresproduktionsvolumen von 6.6 Millionen Tonnen.^[19a] Da Diaminohexan derzeit nicht über fermentative Routen gewonnen werden kann, haben sich Forschungsschwerpunkte herausgebildet, bei denen alternative bio-basierte Möglichkeiten für die Herstellung von Diaminopentan (DAP, Cadaverin) und Diaminobutan (Putrescin) entwickelt werden, um die Rohöl-basierten Wege zu ersetzen.^[1a,15c,22a] Diese beiden Diamine kommen natürlicherweise als Intermediate des Abbaus von L-Lysin und L-Ornithin vor.^[116]

In *E. coli* konnte eine basale Putrescinproduktion erzielt werden, indem der weitere Abbau dieses C_4 -Diamins unterbunden wurde. Durch eine verbesserte Bereitstellung des Bausteins Ornithin und durch Überexpression der Diaminobutan-bildenden Ornithin-Decarboxylase konnte die Produktion dann auf 24 g L^{-1} gesteigert werden.^[22a] Analog zur Putrescinproduktion in *E. coli* ist auch die in *C. glutamicum* abhängig von der Aktivität der Ornithin-Decarboxylase, die in diesem Fall jedoch heterolog eingebracht werden muss.^[15c] Die Entkopplung des Stoffwechselwegs durch die Kontrolle durch ArgR, kombiniert mit einem fein abgestimmten Ornithinverbrauch für die Argininbiosynthese, ermöglichte eine Produktion von 19 g L^{-1} Putrescin in einer Ausbeute von 0.16 g g^{-1} (Abbildung 3).^[15c,19j] Aktuell laufende Arbeiten in diesem Forschungsbereich könnten die Stamm- und Prozessentwicklung noch weiter voranbringen.^[117]

Diaminopentan, das durch Decarboxylierung von Lysin hergestellt werden kann, konnte mit *C. glutamicum* und *E. coli* produziert werden. Die für *E. coli* gewählte Strategie wurde an die der Putrescinproduktion angelehnt und umfasste eine Inaktivierung des Diaminopentanabbaus, eine verbesserte Bereitstellung des Bausteins Lysin und eine verstärkte Expression der DAP-bildenden Lysin-Decarboxylase CadA (Abbildung 3).^[22b] Das Engineering von *C. glutamicum* ging jedoch weit über eine grundlegende Machbarkeitsstudie

hinaus. Erste *C. glutamicum*-basierte DAP-Produzenten, die sich auf die CadA-Variante der Lysin-Decarboxylase aus *E. coli* stützten,^[15a] wurden bald schon durch Stämme übertriften, die die LdcC-Variante aus *E. coli* nutzten, deren Expression zusätzlich durch Promotoraustausch und Codonoptimierung verbessert wurde.^[15b] Im Verlauf der weiteren Stammoptimierung wurden Gene der Biosynthese überexprimiert, konkurrierende Stoffwechselwege wurden eliminiert oder abgeschwächt, die Nebenproduktbildung durch Deletion der verantwortlichen Gene wurde unterbunden, die Produktsekretion wurde verbessert und die Bereitstellung von Kohlenstoffbausteinen und Reduktionskraft wurde verbessert (Abbildung 6).^[15b,19a,69d] Der optimierte *C. glutamicum*-Stamm sekretierte 88 g L^{-1} DAP und erzielte dabei eine Ausbeute von 0.5 g g^{-1} (Abbildung 2).^[19a]

Dieser Stamm wurde darüber hinaus in ein ganzheitliches Bioraffineriekonzept integriert, um hochwertige Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen. Der umfassende Ansatz kombinierte Aspekte der synthetischen Biologie mit der synthetischen Chemie, um das 100 % bio-basierte Polyamid PA5.10 herzustellen.^[19a] Der Prozess umfasste den kompletten Produktionslauf inklusive Upstream-Abläufe, Fermentation mit dem maßgeschneiderten DAP-Überproduzenten, Produktaufreinigung und chemische Polymerisation mit oder ohne Glasfaserverstärkung.^[19a] Systematische Materialtests offenbarten die ausgezeichneten Materialeigenschaften von PA5.10 hinsichtlich Schmelztemperatur und mechanischer Stärke, die dem Rohöl-basierten PA6 und PA6.6 in nichts nachstanden. Die geringe Dichte verspricht sogar energetische Vorteile bei Anwendungen im Bereich des Transportwesens.^[19a]

Durch das zusätzliche Einbringen des Xyloseabbauwegs aus *E. coli* konnten ein Xylose- sowie ein Hemicellulose-basierter Prozess etabliert werden.^[97a] Die in diesem Prozess erzielte Konzentration von 60 g L^{-1} ist ein schönes Beispiel dafür, dass auch alternative Rohstoffe durchaus Potential für die Industrie haben, auch wenn sie derzeit noch kaum Anwendung im Bereich der industriellen Biotechnologie finden.^[1c,97a]

5.2. Lactat und 3-Hydroxypropionat

Aufgrund ihrer difunktionalen chemischen Struktur, bestehend aus einer Hydroxy- und einer Carboxygruppe, sind Lactat (LA) und 3-Hydroxypropionat (3HP) wertvolle Bausteine für die Synthese der bioabbaubaren Polyester Polylactat (PLA) und Poly(3-hydroxypropionat) (P3HP).^[6a] 3HP fungiert außerdem als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Acrylat, das wiederum als Plattformchemikalie und als Polymerbaustein Anwendung findet.

Die heutigen LA-Produktionsanlagen werden mit klassisch optimierten *Lactobacilli* betrieben. Die Hauptanbieter in dem Bereich sind NatureWorks, die sich vollständig im Besitz von Cargill Incorporated (USA) befinden, Purac (Niederlande), Galactec (Belgien) und verschiedene chinesische Firmen.^[118] Unter den bio-basierten Polymeren hat PLA eine vergleichsweise lange Tradition bezüglich seiner Produktion. Die erste Inbetriebnahme einer großtechnischen

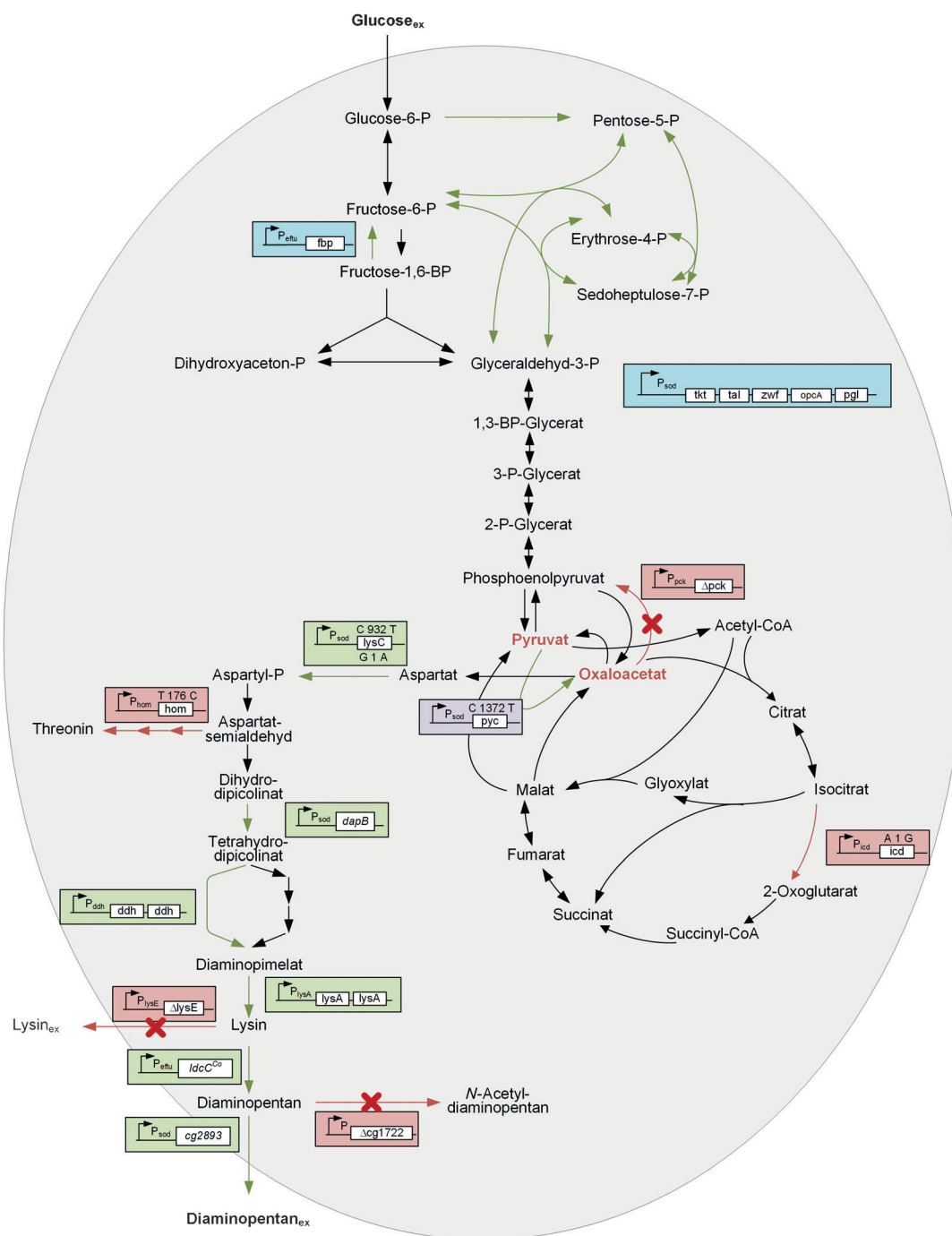


Abbildung 6. Systemweites Stoffwechsel-Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion von Diaminopentant.^[19a] Grüne bzw. rote Pfeile deuten eine Verstärkung bzw. Abschwächung der Stoffwechselreaktion an. Deletionen sind durch das rote „X“ gekennzeichnet. Der Farbcode für die genetischen Modifikationen ist wie folgt: grün: Reaktion der Biosynthese und des Exportes; rot: Konkurrenzreaktionen für Biosynthese oder Bereitstellung von Bausteinen; lila: Reaktionen für die Bereitstellung von Kohlenstoff-Bausteinen; blau: Reaktionen für die NADPH-Bereitstellung. Die Enzyme, die von den entsprechenden Genen kodiert werden, sind: *cg1722*: N-Acetyl-Transferase; *cg2893*: major facilitator permease; *dapB*: Dihydrodipicolinat-Reduktase; *dhc*: Diaminopimelat-Dehydrogenase; *fbp*: Fructose-1,6-bisphosphatase; *hom*: Homoserin-Dehydrogenase; *icd*: Isocitrat-Dehydrogenase; *ldcC*: Lysin-Decarboxylase aus *E. coli*; *lysA*: Diaminopimelat-Decarboxylase; *lysE*: Lysin-Exporter; *lysC*: Aspartokinase; *pck*: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; *pgl*: 6-Phosphogluconolactonase; *pycA*: Pyruvat-Carboxylase; *tal*: Transaldolase; *tkt*: Transketolase; *zwf*: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Anlage erfolgte 2002 durch NatureWorks LLC, die bis heute den größten Marktanteil im PLA-Geschäft innehaben.^[118] Außer den klassischen Produktionsstämmen wurden auch *E. coli*, *C. glutamicum* und *S. cerevisiae* für die Lactatpro-

duktion optimiert (Abbildungen 2–4).^[118] Diverse Studien berichten über die Produktion von enantiomerenreinem D-Lactat und L-Lactat mit veränderten *E.-coli*-Stämmen unter Verwendung von nativen und nichtnativen Kohlenstoffquel-

len.^[24m,119] Metabolische Schlüsselmodifikationen betreffen vor allem die Eliminierung der Nebenproduktbildung.^[24m,p,119c] Mit dem derzeit besten Stamm wird eine Lactatkonzentration von 138 g L^{-1} bei einer Ausbeute von 0.86 g g^{-1} erzielt (Abbildung 2).^[24p] Das zusätzliche Einbringen einer evolutiv verbesserten Propionat-CoA-Transferase sowie einer Polyhydroxyalkanoat(PHA)-Synthase ermöglichte sogar die direkte Produktion von PLA und LA-Propionat-Copolymeren bis zu 56 Gew.-%.^[120] In *C. glutamicum* wird die L-Lactatsekretion natürlicherweise durch ein anaerobes Milieu induziert. Dies wurde für eine Vielzahl von Substraten wie Glucose, Arabinose, Xylose und Cellobiose gezeigt.^[19u,121] Durch Deletion der intrinsischen L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Expression der nichtnativen D-LDH konnten mit *C. glutamicum* 120 g L^{-1} D-Lactat mit einer Reinheit von 99.9 % hergestellt werden.^[19u] Da während der Produktion Nebenprodukte gebildet wurden, ist eine weitere Verbesserung durch Vermeidung der Succinat- und Acetatsekretion zu erwarten. Analog zu *E. coli* gibt es auch für *C. glutamicum* vielversprechende Ansätze zur direkten fermentativen Produktion von Polymeren. Die entsprechenden Stämme produzieren dabei P(LA-co-3HB)-Copolymere aus Lactat und 3-Hydroxybutyrat mit hohem LA-Anteil.^[18a] In *S. cerevisiae* erfordert die Lactatproduktion eine heterologe Expression der LDH.^[29f,122] Da besonders die fermentative Ethanolproduktion mit der gewünschten Lactatsekretion konkurriert, wurde der Ethanolweg durch Deletion ausgewählter Gene unterbrochen.^[122,123] Dadurch konnte hochreines L-Lactat in einer Konzentration von 122 g L^{-1} produziert werden (Abbildung 4).^[29f]

Im Hinblick auf die 3HP-Produktion gibt es von den hier betrachteten Organismen lediglich Studien zu *E. coli* unter Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle.^[124] Dieser Prozess gleicht allerdings eher einer Biotransformation als einer De-novo-Synthese, da für den Umsatz lediglich zwei Enzyme benötigt werden.^[6a,124] Interessanterweise gibt es sehr viel mehr Studien zur direkten P3HP-Produktion, die wohl-gemerkt auch auf eine Bereitstellung von 3HP als Baustein angewiesen ist. Diese Studien umfassen auch alternative Strategien für die 3HP-Synthese aus Glycerin (über die oben erwähnte Route) oder Glucose.^[125] Ansätze zur Glucose-basierten P3HP-Produktion enthalten den β -Alanin-Weg und den Malonyl-CoA-Weg.^[125a,c]

5.3. Polyhydroxyalkanoate

Polyhydroxyalkanoate (PHAs) sind bioabbaubare und biokompatible Polymere, die von vielen Organismen als natürliche Speicherpolymere synthetisiert werden.^[126] Dank der zahlreichen Monomervarianten, die als Bausteine für die Synthese von kurz- (short-chain-length; scl), mittel- (medium-chain-length; mcl) und langkettigen (long-chain-length; lcl) Homo- und Copolymeren genutzt werden können, sind die Materialeigenschaften sehr vielfältig.^[126,127] *E. coli*, *C. glutamicum* und *S. cerevisiae* sind keine typischen PHA-Produzenten, auch wenn diesbezüglich einige erfolgreiche Stammoptimierungen durchgeführt wurden. Im Allgemeinen werden Produktionsstämme mit heterologen Genen des bio-

synthetischen PHA-Operons aus *Ralstonia eutropha*, *Bacillus cereus* oder *Pseudomonaden* ausgestattet.^[19v,26,128] Die Produktion ist meist auf scl-PHAS limitiert, die aus den Bausteinen 3-Hydroxybutyrat (3HB), 2-Hydroxybutyrat (2HB) und 3-Hydroxyvalerat (3HV) gebildet werden. Durch ein gezieltes Engineering der β -Oxidation konnten zumindest für *E. coli* und *S. cerevisiae* die Diversität und Variabilität der Monomere auf mcl-Bausteine erweitert werden.^[26,129]

6. Biotreibstoffe

6.1. Ethanol

Ethanol ist das klassische Fermentationsprodukt von *S. cerevisiae*, was Hefe neben *Zymomonas mobilis* zum wichtigsten Ethanolproduzenten sowohl für Getränke als auch für Treibstoffe macht.^[6a,29h] Entscheidender Vorteil gegenüber *E. coli* ist eine geringe Nebenproduktbildung, kombiniert mit einer hohen Produkttoleranz.^[29h] Die Ethanolproduktion mit *S. cerevisiae* kommt häufig nah an das theoretische Maximum von 0.51 g g^{-1} heran, mit Konzentrationen von 48 g L^{-1} ,^[29h,i] allerdings wird häufig Glycerin als Nebenprodukt detektiert. Dementsprechend wurden zahlreiche Versuche unternommen, dessen Bildung zu minimieren oder völlig zu verhindern.^[6b,130] Entsprechende Null-Mutanten verlieren allerdings die Fähigkeit, anaerob zu wachsen, da der Glycerinstoffwechsel als essentielle Elektronensenke zur Regeneration von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) dient.^[6b,130b] Alternative Strategien zielen auf einen modifizierten Redoxstoffwechsel unter Verwendung von Ersatzmetaboliten für die Elektronenbilanzierung ab.^[130a,131] Bei weiteren Optimierungen standen die Erweiterung des Substratspektrums sowie die Erhöhung der Toleranz im Mittelpunkt.^[29i,j,132] Wegen des natürlicherweise breit gefächerten Substratspektrums ist auch *E. coli* ein vielversprechender Kandidat für die Ethanolproduktion. Tatsächlich kann durch die Expression des Ethanolstoffwechsels aus *Z. mobilis*, kombiniert mit der Deletion des für die Succinatproduktion verantwortlichen Gens *frd*, eine hohe Ethanolproduktion von 54.4 bzw. 41.6 g L^{-1} unter Verwendung von Glucose bzw. Xylose als Substrat erzielt werden.^[24i] In einer weiteren Studie konnte über das Ausschalten kompetitiver Fermentationswege durch Deletion der kodierenden Gene für die Fumarat-Reduktase (*frdABCD*), die Lactat-Dehydrogenase (*ldhA*), die Acetat-Kinase (*ackA*) und die Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) ein nichttransgener Homoethanolproduzent, d.h. ein Produzent mit Ethanol als einzigem Produkt, hergestellt werden. Dieser derart modifizierte Stamm wurde zum effizienten Ausgleich der Redoxbilanz zusätzlich dahingehend verändert, dass die Pyruvat-Dehydrogenase anaerob exprimiert wurde, wodurch die Ethanolausbeute auf 90 % gesteigert werden konnte.^[133] Eine gemischte Zucker-Kofermentation wurde durch Deletion von *mgsA* als Kontrollpunkt des Zuckerstoffwechsels ermöglicht.^[134] Wie auch bei *S. cerevisiae*, bleibt die Produkttoleranz weiterhin ein zentrales Thema der Bioethanolproduktion mit *E. coli*.^[135] In *C. glutamicum* hängt die Ethanolfermentation vollständig von heterolog eingebrachten Genen ab. Modifizierte Stämme, die

die Pyruvat-Decarboxylase (*pdc*) und die Alkohol-Dehydrogenase (*adhB*) aus *Z. mobilis* exprimieren und zusätzlich Lactat-Dehydrogenase- und PEP-Carboxylase-defizient sind, können unter Sauerstoffausschluss bis zu 0.53 g g^{-1} Ethanol produzieren.^[17a] Die Produkttiter und die Toleranz der Stämme sind allerdings gering und erfordern weitere Optimierungen.

6.2. Höhere Alkohole

Wegen ihres niedrigen Dampfdruckes, der geringen Hygroskopie und des hohen Energiegehaltes sind Alkohole mit vier oder mehr Kohlenstoffatomen als Biotreibstoffe besonders vorteilhaft.^[24j] 2-Methyl-1-propanol (Isobutanol) und 1-Butanol sind die derzeit am besten untersuchten Beispiele. Der 2-Methyl-1-propanol-Weg ist eng mit der Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren verknüpft, sodass das Engineering hier stark von in der traditionellen Aminosäurefermentation gesammelten Erfahrungen profitiert hat. In Anlehnung an die Strategie zur Überproduktion von Valin konnte beispielsweise *C. glutamicum* in einen 2-Methyl-1-propanol-Produzenten umgewandelt werden.^[17b] Durch Ausschalten der Lactat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Carboxylase konnte die Produktion auf 4.9 g L^{-1} gesteigert werden. Dabei wurden Spuren anderer höherer Alkohole wie 1-Propanol, 2-Methyl-1-butanol, 1-Butanol und 2-Phenylethanol als Nebenprodukte gefunden. Eine bessere Produktion von bis zu 18 g L^{-1} 2-Methyl-1-propanol wurde durch einen Ansatz erzielt, der sich auf einen 2-Ketovaleratproduzenten stützte. Dieser wurde zusätzlich durch Inaktivierung der Lactat- und Malat-Dehydrogenasen sowie durch Einbringen der Ketosäure-Decarboxylase aus *Lactococcus lactis*, der Alkohol-Dehydrogenase (ADH2) aus *S. cerevisiae* und der Transhydrogenase (PntAB) aus *E. coli* modifiziert.^[136] Durch die Kopplung einer Hochzelllichtfermentation an eine kontinuierliche Lösungsmittelextraktion konnten dann 78 g L^{-1} 2-Methyl-1-propanol in der Lösungsmittelphase angereichert werden.^[19c] Ähnlich wie in *C. glutamicum* erfolgt die 2-Methyl-1-propanol-Produktion auch in *E. coli* über den verzweigt-kettigen Aminosäureweg. Durch Überexpression der Gene *ilvIHCD* für die Biosynthese von 2-Ketoisovalerat in Kombination mit dem Einbau der 2-Ketosäure-Decarboxylase sowie der Alkohol-Dehydrogenase konnte ein Produzent generiert werden. Die Unterbindung der Nebenproduktbildung und die Expression des *alsS*-Gens aus *Bacillus subtilis* steigerten die Produktion auf 22 g L^{-1} .^[24i, 137]

Um eine Butanolproduktion zu erreichen, wurde der komplette native Biosyntheseweg aus *Clostridium acetobutylicum* – abzwiegend vom zentralen Intermediat Acetyl-CoA – in *E. coli* implementiert.^[138] Eine andere Strategie nutzte einen synthetischen Stoffwechselweg ausgehend von Threonin. Eine systematische Verbesserung durch Aufhebung der natürlichen Stoffwechselregulation und Unterbindung der Nebenproduktbildung ermöglichte eine simultane Produktion von 2 g L^{-1} 1-Butanol und 1-Propanol im Verhältnis von etwa 1:1.^[139] Die Acetyl-CoA-Route stellte sich jedoch als effizienter heraus. Eine synthetische Rekonstruktion dieses Stoffwechselweges mit ausgewählten Genen aus verschiede-

nen Donorstämmen erwies sich dabei als besser gegenüber der ausschließlichen Nutzung von Genen aus *C. acetobutylicum*.^[24u, 140] Insgesamt konnte die Produktion auf 30 g L^{-1} gesteigert werden.^[24u] Eine Verlängerung des Butanolweges ermöglichte darüber hinaus die Produktion von 1-Hexanol in *E. coli*.^[24r] Auch mithilfe der umgekehrten β -Oxidation war die Produktion längerketiger Alkohole (mehr als vier C-Atome) grundlegend möglich, was diese Methode zu einer neuen und vielversprechenden Technologie für die Produktion höherwertiger Biotreibstoffe macht.^[24s]

In *S. cerevisiae* wurde die 2-Methyl-1-propanol-Produktion erstmals durch endogene Überexpression der Valinbiosynthese realisiert.^[141] Die zelluläre Kompartimentierung erschwerte allerdings die Produktion, sodass für eine verbesserte Produktion der Valinstoffwechsel vom Mitochondrium in das Cytosol transferiert wurde.^[29e] Die Leistungsfähigkeit der Stämme (Abbildung 4) erreichte allerdings nicht die von *C. glutamicum* und *E. coli*.

Wie auch für *E. coli* wurden für die Butanolproduktion zwei alternative Routen in Hefe getestet. Der heterologe Weg, ausgehend von Acetyl-CoA, ermöglichte lediglich eine Produktion von 16 mg L^{-1} Butanol.^[29k] Der endogene Weg über Threonin – mit einer Produktion von 243 mg L^{-1} Butanol – erwies sich hier als deutlich vorteilhafter.^[29s]

6.3. Biodiesel

Biodiesel setzt sich hauptsächlich aus Fettsäuremethylestern (FAMES), -propylestern und -ethylestern zusammen. Deren mikrobielle Herstellung ist sehr wünschenswert für eine nachhaltige Produktion und wurde bisher durch ein Engineering von *S. cerevisiae* und *E. coli* adressiert.^[142] Die erste mikrobielle Biodieselproduktion mit *E. coli* erfolgte dabei mithilfe von Umesterung von endogen gebildetem Ethanol und zugesetzter Ölsäure.^[143] Eine richtige De-novo-Synthese von Fettsäuren wurde erreicht, indem die Biosynthese überexprimiert und die β -Oxidation inaktiviert wurden.^[142] Der erste Schritt zur Biodieselproduktion mittels *S. cerevisiae* stützte sich auf eine Inaktivierung der Synthese von Speicherlipiden. Die heterologe Expression der difunktionalen Wachsester-Synthase aus *Acinetobacter calcoaceticus* ermöglichte anschließend die Bildung von FAMES.^[144] Weitere Stammoptimierungen umfassten die Überexpression der Acetyl-CoA-Carboxylase und die Verwendung alternativer Wachsester-Synthasen aus *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* mit vorteilhafteren katalytischen Eigenschaften.^[29m, 145] Ansätze zur Biodieselproduktion mit *C. glutamicum* beschränken sich derzeit auf die De-novo-Synthese von Fettsäuren, die zur FAME-Produktion noch verestert werden müssen.^[19w]

7. Gesundheit und Ernährung

7.1. L-Glutamat

Von den ersten Anfängen der Aminosäurefermentation bis heute hat die Produktion des Geschmacksverstärkers L-

Glutamat den größten Marktanteil mit derzeit etwa 2.5 Millionen Tonnen pro Jahr. Die industrielle Produktion stützt sich auf *C.-glutamicum*-Stämme, die ursprünglich auch zu diesem Zweck isoliert wurden. Bereits Wildtypstämme sind in der Lage, beachtliche Mengen an L-Glutamat als Antwort auf eine Biotinlimitierung oder eine Behandlung mit Penicillin sowie mit Tensiden zu sekretieren.^[146] Darüber hinaus wurden die Produktionsorganismen durch eine Umleitung des Kohlenstoffflusses durch die anaplerotische, d.h. die den Zitronensäurezyklus auffüllende, Carboxylierung^[89c,147] und durch die Abschwächung der konkurrierenden 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase verbessert.^[146a,b,148] Bisher reichen diese rationalen Ansätze allerdings nicht aus, um klassisch erzeugte Stämme mit Produkttitern von 100 g L⁻¹ aus dem Feld zu schlagen (Abbildung 2).^[19]

7.2. L-Lysin

Die Produktion der essentiellen Futtermittelaminosäure L-Lysin mit einem Weltmarkt von etwa 1.5 Millionen Tonnen pro Jahr hat sich zu einem stark kompetitiven Wettbewerbsgeschäft entwickelt, das die kommerziellen Anbieter zu kontinuierlichen Verbesserungen zwingt. Als Produktionsstämme kommen mit Firmen-spezifischen Patentabdeckungen belegte *E.-coli*- und *C.-glutamicum*-Stämme zum Einsatz.^[45a] Öffentlich zugängliche Forschungsarbeiten konzentrieren sich allerdings hauptsächlich auf *C. glutamicum*, auch wenn erst kürzlich ein *E.-coli*-basierter optimierter Fermentationsprozess in einer Studie publiziert wurde.^[24x] Die enge Verknüpfung der Lysinbiosynthese mit dem Zentralstoffwechsel^[45a] hat in *C. glutamicum* eine lokale Manipulation des Kohlenstoffwechsels stimuliert, um konkurrierende Reaktionen abzuschwächen oder komplett zu unterbinden^[89b,95] und um die Bereitstellung des Bausteins Oxaloacetat^[89a,149] sowie die Reduktionskraft in Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)^[50c,91c,150] zu verbessern. Die Entschlüsselung der Genomsequenz hat stark zu einem tieferen Verständnis von *C. glutamicum* beigetragen und hatte erheblichen Einfluss auf die industrielle Produktion, da Kenntnisse der Genomsequenz das Metabolic Engineering und die genetische Manipulation revolutionierten. Dadurch eröffneten sich neue globale und systemorientierte Optimierungsansätze wie das so genannte „Genome Breeding“^[50b] sowie das umfassende modellgestützte metabolische Stammdesign, d.h. die Herstellung eines maßgeschneiderten Produzenten auf Basis computergestützter Simulationen seiner metabolischen Eigenschaften.^[12a] Die erste dieser globalen Strategien brachte dabei einen minimal mutierten L-Lysinproduzenten hervor, mit dem ein Titer von 100 g L⁻¹ und eine Ausbeute von 0.4 g g⁻¹ erzielt wurden.^[50b] In einer neueren Studie wurde dies dank eines „Synthetic Metabolic Engineering“-Ansatzes sogar noch übertroffen. Dabei reichten zwölf ausgewählte und definierte Genom-basierte Modifikationen aus, um aus einem Wildtypstamm einen effizienten Produzenten zu generieren, mit dem eine Produktion von 120 g L⁻¹ L-Lysin in einer Ausbeute von 0.55 g g⁻¹ möglich war (Abbildung 2). Dank dieses wissensbasierten Designs in Verbindung mit der gezielten genetischen Modifikation

übertrifft dieser rational erzeugte L-Lysin-Überproduzent sogar die Leistung von klassisch optimierten Stämmen.^[12a]

7.3. Aromatische L-Aminosäuren und verwandte Metaboliten

Über viele Jahre hinweg verhinderte die komplexe Stoffwechselregulation bestehend aus metabolischer Inhibition, Repression und Attenuation eine effiziente ökonomische Produktion von L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin.^[151] Eine gezielte Modifikation des terminalen Syntheseweges und der Produktsekretion sowie eine verbesserte Bereitstellung von Bausteinen, kombiniert mit klassischen Optimierungsansätzen, brachten anschließend den Durchbruch,^[45b,73a,152] sodass industriell relevante Produktionsniveaus erreicht wurden (Abbildungen 2 und 3). Dabei wurden *C. glutamicum* und *E. coli* gleichermaßen durch Metabolic Engineering optimiert, wobei leicht bessere L-Tryptophanproduzenten auf Basis von *C. glutamicum* und bessere L-Phenylalaninproduzenten auf Basis von *E. coli* beschrieben sind (Abbildungen 2 und 3). Aktuelle Erfolge versprechen weitere Verbesserungen in der zukünftigen Stammoptimierung.^[62b,91b,153] Das gesammelte Fachwissen in diesem Bereich hat außerdem die Entwicklung von Produktionsprozessen für verwandte aromatische Metaboliten mit *E. coli* beschleunigt.^[90a] Eine Produktion von 80 g L⁻¹ Shikimat, einem Stoffwechselintermediat der aromatischen Aminosäuresynthese, kann hier sicherlich als prominentestes und erfolgreichstes Beispiel aufgeführt werden.^[24a] Andere Intermediate umfassen z.B. Anthranilat und Chorismat.^[45b] Neuere Studien erweiterten die Produktpalette über den natürlichen Biosyntheseweg hinaus auf aromatische Komponenten wie Phenol,^[24c] *p*-Hydroxyzimtsäure, Phenyllactat, Phenylacetat, Phenylethanol^[154] und die komplexen Tryptophan-basierten Derivate Violacein und Desoxyviolacein, wobei letztere vielversprechende antivirale und antitumorale Wirkstoffe sind.^[7c,d,24ac] Ein systemweites Stoffwechseldesign in Verbindung mit optimierten Prozesseinstellungen ermöglichte ein Überschreiten der Ein-Gramm-Grenze mit einer finalen Konzentration von 1.6 g L⁻¹ Desoxyviolacein (Abbildung 3).^[7c] Wegen der generell hohen Toleranz ist auch *Saccharomyces cerevisiae* ein vielversprechender Kandidat für die Produktion von Arenen.^[155] Allerdings ist die Stoffwechselregulation in Hefe wesentlich strikter als in *E. coli* und *C. glutamicum*. Diesen Organismen gegenüber hat sie jedoch den Vorteil, dass heterologe Gene aus Pflanzen von Hefen besser toleriert und akzeptiert werden. Vielversprechende Beispiele umfassen die Produktion von Resveratrol, Naringenin und anderen Flavonoiden, die sich von Cumarsäure ableiten (Abbildung 4).^[29h,156] Ein tieferes Stoffwechselverständnis wird die zukünftige Entwicklung neuer Strategien für eine De-novo-Synthese stärker vorantreiben.^[157]

7.4. L-Threonin

Die meisten Versuche für eine effiziente L-Threoninproduktion wurden bislang für *E. coli* unternommen, dem derzeit auch wichtigsten industriellen Produzenten mit einer jährli-

chen Produktion von rund 250 000 Tonnen. Erste Optimierungsansätze konzentrierten sich dabei auf die Überexpression des biosynthetischen Threoninweges.^[158] In jüngerer Zeit wurde ein genetisch definierter Threoninproduzent mithilfe eines systembiologischen Ansatzes erzeugt, der sich auf komplexe Datensätze aus der Analyse von Genom, Transkriptom, Proteom und Computer-gestützten Stoffwechselberechnungen stützte.^[24ad] In aller Kürze dargestellt umfasste die Optimierung das Aufheben der Rückkopplungshemmung sowie der transkriptionellen Attenuation, eine Plasmid-basierte Überexpression des Threoninweges, eine Abschwächung konkurrierender Stoffwechselwege, eine Verhinderung der Wiederaufnahme von Threonin, eine optimierte anaplerotische Carboxylierung und eine Deletion des Glyoxylat-Regulators *icIR*.^[24ad] Der finale Stamm produzierte 82 g L^{-1} L-Threonin in einer Ausbeute von 0.39 g g^{-1} (Abbildung 3).

7.5. Verzweigt-kettige Aminosäuren und verwandte Metaboliten

L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin haben einen kleinen, aber stetig wachsenden Markt im Bereich der pharmazeutischen und Agrarindustrie gefunden. Verbesserte *C. glutamicum*-Stämme wurden insbesondere dadurch erzeugt, dass die Stoffwechselregulation unterbunden, die terminalen biosynthetischen Reaktionen verstärkt, konkurrierende Reaktionen eliminiert und die Bereitstellung von NADPH verbessert wurden.^[19f,k,s,159] Auf diesem Weg generierte Stämme zeigen beeindruckende Produktionseigenschaften mit Titern bis zu 150 g L^{-1} L-Valin, 24 g L^{-1} L-Leucin und 21 g L^{-1} L-Isoleucin (Abbildung 2). Kürzlich erzielte Erfolge im Bereich des Metabolic Engineering von *C. glutamicum* übertrafen dabei sogar die Leistung von zuvor optimierten *E. coli*-Stämmen für die Produktion von L-Valin und L-Isoleucin (Abbildung 3).^[24k,l,v] Mittlerweile haben auch metabolisch verwandte Moleküle mit möglicher Anwendung als Therapeutika und Aromastoffe das Forschungsinteresse geweckt. Beispielsweise vermitteln Pyrazine, die von *C. glutamicum* natürlicherweise in die Gasphase abgegeben werden, das Aroma von Kaffee, Pfeffer oder Popcorn.^[14] Weitere Metaboliten umfassen 2-Oxoisovalerat,^[19r] 2-Oxoisocaproat^[19t] und das Vitamin Pantothersäure^[13,24n,160] als interessante Basischemikalien für die Synthese von Pharmazeutika oder als Futtermittelzusatz. Das im Bereich der Produktion von L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin gewonnene Wissen wird bei der zukünftigen Stammentwicklung in diesem Bereich von großem Vorteil sein.

7.6. Andere Aminosäuren

C. glutamicum wurde auch gezielt genetisch dahingehend verändert, die C₃-Aminosäuren L-Alanin^[19o,161] und L-Serin zu produzieren.^[19p] Für die Produktion von L-Arginin erwies sich dagegen ein kombinierter Ansatz aus Zufallsmutagenese und Metabolic Engineering als vorteilhaft. Der so erzeugte Stamm produzierte 92.5 g L^{-1} L-Arginin in einer Ausbeute von 0.40 g g^{-1} .^[19y] Darüber hinaus können mit veränderten *C. glutamicum*-Stämmen auch nichtproteinogene Aminosäuren

hergestellt werden, wie pharmazeutisch interessante D-Enantiomere,^[12d] D/L-Ornithin,^[5,19h,z,162] γ -Aminobuttersäure,^[163] 4-Hydroxyprolin^[19e] und L-Citrullin (Abbildung 2).^[12b] Für *E. coli* gibt es Berichte über Basisproduzenten für L-Alanin, L-Serin und 4-Hydroxyprolin (Abbildung 3).^[24o]

7.7. Riboflavin

Riboflavin ist ein essentielles Vitamin, das für die Synthese von Flavin-Mononucleotiden und Flavin-Dinucleotiden benötigt wird, die wiederum als bedeutende Kofaktoren für Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen fungieren.^[39,42] Defizite in der Ernährung von Mensch und Tier können zu entzündlichen Hautveränderungen, Durchfall und verlangsamtem Wachstum führen. Wegen der leuchtend gelben Farbe und da ein übermäßiger Verzehr unschädlich ist, wird Riboflavin auch häufig als Lebensmittelfarbstoff E-101 verwendet.^[39] Die Geschichte der industriellen Riboflavinproduktion ist ein schönes Beispiel für den Wettbewerb, der sich zwischen chemischer und biotechnologischer Industrie für eine kosteneffiziente Produktion entwickelt hat.^[39] Für die biobasierte Produktion kommen heutzutage drei Mikroorganismen zum Einsatz: *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii* und *Candida famanta*.^[39] Die industriellen Produzenten wurden durchweg mithilfe einer kombinierten Strategie aus Mutagenese und Metabolic Engineering generiert und erreichen Produkttitern von $15\text{--}20 \text{ g L}^{-1}$.^[164] In *A. gossypii* waren besonders die Überexpression der biosynthetischen Gene^[165] und eine verbesserte Glycinbereitstellung von Vorteil. Letztere profitierte zum einen von einer Überexpression der Glycin-bildenden Reaktionen^[166] und zum anderen vom Ausschalten der Glycin-verbrauchenden Reaktionen.^[167] Kürzlich ist es durch die Verwendung der neuen Methode der Disparity Mutagenesis, d. h. einer replikationsbasierten Mutagenese der DNA, gelungen, einen Stamm zu generieren, der 14 g L^{-1} Riboflavin produziert und damit an das Leistungsvermögen etablierter industrieller Produzenten heranreicht.^[43] Wie in *A. gossypii* sind auch in *B. subtilis* die Expressionseffizienz des *rib*-Operons und die Aktivität der kodierten Enzyme der terminalen Riboflavinbiosynthese von zentraler Bedeutung.^[168] Ein verbesserter Energiehaushalt sowie ein reduzierter zellulärer Grundumsatz trugen zusätzlich zu einer besseren Produktion bei.^[169] Eine weitere Verbesserung wurde durch Modulation des Vorläufermetabolismus, vermittelt durch einen erhöhten Kohlenstofffluss durch die Purinbiosynthese,^[91d] den Pentosephosphatweg^[170] und eine deregulierte Gluconeogenese,^[171] ermöglicht.^[24af] Aktuell andauernde Forschungsprojekte versprechen weiter verbesserte Produktionsstämme für die Zukunft.^[172] Erst kürzlich wurde beispielsweise die Riboflavinproduktion in *E. coli* ermöglicht. Das metabolische Design orientierte sich dabei eng an dem von *B. subtilis* einschließlich der Überexpression der Biosynthese und der Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den Pentosephosphatweg. Durch eine zusätzliche Reduktion der Acetatsekretion und optimierte Prozessbedingungen konnten 2.7 g L^{-1} Riboflavin hergestellt werden.^[24af]

7.8. Ectoin

Der positive und stabilisierende Effekt der chemischen Chaperone Ectoin und Hydroxyectoin auf Biopolymere hat deren großtechnische Produktion für die pharmazeutische Industrie sowie den Wellnesssektor vorangetrieben.^[7b] Derzeit erfolgt die jährliche Produktion im Tonnenmaßstab in Form des „Bacterial-Milking-Prozesses“, der iterative Betriebszyklen hoher und tiefer Salzgehalte umfasst und bei dem das halophile Proteobakterium *Halomonas elangata* als nativer Ectoinproduzent zum Einsatz kommt.^[173] Es gab allerdings bereits Versuche zur Etablierung heterologer Produktionsprozesse. So konnten in Abhängigkeit von hohen Salzkonzentrationen in *E. coli* bis zu 57 mg g_{CDM}⁻¹ Ectoin akkumuliert werden.^[24w] Eine gezielte synthetische Rekonstruktion des Ectoinsynthesecusters aus *Pseudomonas stutzeri* ermöglichte erst kürzlich die Ectoinproduktion mit *C. glutamicum*, wobei eine beachtliche Konzentration (4.5 g L⁻¹), Ausbeute (0.24 g g⁻¹) und Produktivität erreicht wurden (6.7 g L⁻¹ d⁻¹).^[7b] Vorteilhaft ist dabei die Entkopplung der Produktion von den aggressiven Hochsalzbedingungen des Bacterial Milking, was sowohl die Korrosion der Betriebssysteme als auch die Investitionskosten reduziert.

7.9. Zitronensäure

Der breite Anwendungsbereich von Zitronensäure umfasst außer der Lebensmittelindustrie auch den Hauswirtschaftsbereich sowie den technischen und medizinischen Einsatz. Die fermentative Produktion, die mittlerweile einen Maßstab von 1.5 Millionen Tonnen in Jahr umfasst, wurde bereits in der 1930er Jahren mit *Aspergillus niger* etabliert, der auch bis heute als wichtigster industrieller Produzent eingesetzt wird.^[30a,31] Die Überproduktion erfordert dabei eine einzigartige Kombination von Nährstoffen und Fermentationsbedingungen, wobei ein synergistischer Effekt einer fein abgestimmten Kombination aus im Überschuss verfügbaren Substraten, Protonen und Gelöstsauerstoff mit limitiert dosierten Spurenelementen und Phosphat eine optimale Ausbeute ergibt.^[31] Die meisten Prozesse beruhen auf Submerskulturen, wobei Konzentrationen von 110–140 g L⁻¹ und Ausbeuten von 70–90 % erzielt werden.^[30a] Die wichtigsten industriellen Plattformorganismen wurden bislang noch nicht als alternative Produktionswirte in Betracht gezogen.

7.10. Terpene

Wegen ihrer roten und gelben Pigmentierung erlangten Carotinoide erhebliches Interesse als Farbstoffe.^[174] Darüber hinaus sind einige von ihnen potente Agentien zum Abfangen von Sauerstoffradikalen und UV-Strahlung, die möglicherweise oxidativen Stress entgiften und das Risiko für Krebs und kardiovaskuläre Erkrankungen reduzieren.^[175] Ihre Produktion, die überwiegend auf einer organischen Extraktion aus natürlichen Pflanzenquellen beruht, ist jedoch sehr aufwendig. Ansätze hin zu einer mikrobiellen Produktion um-

fassen hauptsächlich eine heterologe Expression der Carotinoid-Stoffwechselwege in *E. coli* und *S. cerevisiae*,^[174] wodurch eine Produktion von β -Carotin,^[24t,176] Lycopene,^[29n,177] Astaxanthin^[29i,178] oder Zeaxanthin^[29p,179] ermöglicht wurde. Obwohl *C. glutamicum* bereits über einen nativen Biosynthesecuster für Carotinoide verfügt, haben die Arbeiten zu einer gezielten Überexpression erst kürzlich begonnen.^[19]

Außer ihrer Pigmentierung verfügen Terpene und Diterpene auch über interessante und wertvolle Eigenschaften für die Pharmaindustrie. Artemisinin, ein Sesquiterpen-Lacton, das aus der Pflanze *Artemisia annua* isoliert wurde, wird beispielsweise von der Weltgesundheitsorganisation als Malaria-therapeutikum empfohlen.^[27] Da Preis und Verfügbarkeit großen Schwankungen unterliegen, scheint eine rekombinante Produktion vorteilhaft, da dies eine bessere Stabilität und Kontrollierbarkeit verspricht. In diesem Zusammenhang ermöglichte die heterologe Expression des Mevalonatweges in *E. coli* eine fermentative Produktion der Artemisininvorstufe Amorpho-4,11-dien.^[23b] Eine optimierte Expression und Zusammenstellung von Genen aus den Spendern *S. cerevisiae* und *Staphylococcus aureus* in Kombination mit optimierten Prozessparametern ermöglichte eine Produktion von 27 g L⁻¹ Amorpho-4,11-dien.^[23b] In einem sich anschließenden chemischen Prozess kann daraus Artemisinin synthetisiert werden. Ein ähnlicher semi-synthetischer Ansatz konnte auch mit *S. cerevisiae* entwickelt werden.^[180] Das gewonnene Fermentationsprodukt Artemisininsäure, die Vorstufe für die chemische Umwandlung in Artemisinin, akkumulierte in einer Konzentration von bis zu 25 g L⁻¹.^[181]

Das aus der Rinde der Pazifischen Eibe isolierte Diterpen Paclitaxel, das als Taxol vermarktet wird, ist ein sehr potenter zytostatischer Wirkstoff in der Krebstherapie.^[182] Der derzeit für die Produktion eingesetzte semi-synthetische Ansatz kombiniert eine Zellkultur-basierte Baccatin-III-Produktion mit anschließender chemischer Umsetzung. Im Hinblick auf Paclitaxel wurden sowohl *S. cerevisiae* als auch *E. coli* als alternative Produktionswirte in Betracht gezogen, um frühe Intermediate des Stoffwechselweges zu produzieren.^[8a,c,23a,182,183] Mittlerweile konnte eine Produktion im Gramm-Maßstab erzielt werden, was weitere Arbeiten im Bereich des Engineerings und der Prozessoptimierung ermutigt.^[8a]

Die derzeit verfolgte Strategie zur Terpenproduktion ist ein schönes Beispiel dafür, wie synthetische Biologie und synthetische Chemie einander ergänzen können, um alternative Routen für bio-basierte Produktionsprozesse zu etablieren.

8. Schlussbemerkungen und Ausblick

Ermöglicht durch Errungenschaften und Fortschritte im Bereich des Systems und Synthetic Metabolic Engineering konnte die Produktpalette der industriell eingesetzten Mikroorganismen weit über ihre natürlichen Grenzen hinaus erweitert werden. Maßgeschneiderte Zellfabriken bieten neue und alternative Routen für die Synthese von Materialien, Treibstoffen, Basischemikalien, hochwertigen Spezialchemikalien, Inhaltsstoffen für Lebensmittel und Therapeuti-

ka. Dies eröffnet zukünftig vielversprechende Möglichkeiten, Erdöl-basierte Produkte ganz oder teilweise durch nachhaltig hergestellte bio-basierte Produkt zu ersetzen. Erst kürzlich wurde hier ein wichtiger Meilenstein erzielt: die Herstellung eines neuen und bio-basierten Nylons, das zu großen Teilen mithilfe einer metabolisch veränderten Zellfabrik synthetisiert wurde.^[19a] Zugegebenermaßen haben noch nicht alle hier beschriebenen Produkte die Marktreife erlangt, sie liefern jedoch wertvolle Konzepte und Strategien, um darauf aufbauend weitere Verbesserungen zu entwickeln. In diesem Zusammenhang haben uns die letzten Jahre gelehrt, dass die fortschrittlichen Techniken der Systembiologie, der Modellierung und der Gentechnologie äußerst wirksam sind. Das gleiche gilt für die Kombination aus Experiment und Modell, wodurch Synergien für schnellere und noch spezifischer ausgerichtete Prozessentwicklungen geschaffen werden. Zusätzlich muss auch eine intensive Verknüpfung des Metabolic Engineerings mit den Upstream- und Downstream-Bereichen der zu entwickelnden Wertschöpfungskette geschaffen werden, da Produktionsprozesse im Industriemaßstab ihre eigenen Implikationen haben. Beispielsweise treten im großen Maßstab typischerweise Probleme wie begrenztes Mischverhalten, hoher osmotischer Stress, schwankende Konzentrationen und Prozessparameter sowie Variationen in der Rohstoffzusammensetzung auf, die oftmals als Stressoren auf die Produktionsorganismen wirken. Auch wenn es anspruchsvoll ist, könnte eine frühzeitige Berücksichtigung solcher Aspekte im Bereich des zellulären Engineerings die Chancen auf eine erfolgreiche Prozessentwicklung deutlich erhöhen.^[18d] Die Kombination von evolutiver Adaptation mit reverssem Metabolic Engineering ist hier vielversprechend, um genetische Merkmale zu identifizieren, die eine höhere Toleranz und Robustheit der Zellen vermitteln.

Zusammengenommen können wir durch eine Integration von aktuellen und neu entwickelten Strategien im Bereich des Systems und Synthetic Metabolic Engineering eine neue Generation von Produktionsstämmen erwarten. Das stetig wachsende Repertoire des Metabolic Engineering wird die Entwicklung solcher Prozesse weiter beschleunigen und die Produktpalette erweitern und damit den Herzschlag der industriellen Stammentwicklung weiter erhöhen.

Wir bedanken uns bei Oskar Zelder und seinem Team der BASF SE für die stets gute und langjährige Unterstützung und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Eingegangen am 12. September 2014

Online veröffentlicht am 11. Februar 2015

- [1] a) S. Kind, C. Wittmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1287–1296; b) J. Becker, C. Wittmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 631–640; c) N. Buschke, R. Schäfer, J. Becker, C. Wittmann, *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 544–554.
- [2] a) M. Wen, B. B. Bond-Watts, M. C. Chang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 472–479; b) B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3132–3158; c) N. Tibrewal, Y. Tang, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2014**, *5*, 347–366; d) H. Kohls,

- F. Steffen-Munsberg, M. Hohne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180–192.
- [3] C. E. Clifton, *Science* **1943**, *98*, 69–70.
- [4] S. Kinoshita, *Nature* **1972**, *240*, 211.
- [5] S. Udaka, S. Kinoshita, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1958**, *4*, 272–275.
- [6] a) Y. S. Jang, B. Kim, J. H. Shin, Y. J. Choi, S. Choi, C. W. Song, J. Lee, H. G. Park, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2437–2459; b) J. Nielsen, C. Larsson, A. van Maris, J. Pronk, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 398–404.
- [7] a) S. C. Wenzel, F. Gross, Y. Zhang, J. Fu, A. F. Stewart, R. Müller, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 349–356; b) J. Becker, R. Schäfer, M. Kohlstedt, B. J. Harder, N. S. Borchert, N. Stöveken, E. Bremer, C. Wittmann, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 110; c) A. L. Rodrigues, J. Becker, A. O. de Souza Lima, L. M. Porto, C. Wittmann, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 2280–2289; d) A. L. Rodrigues, Y. Göcke, C. Bolten, N. L. Brock, J. S. Dickschat, C. Wittmann, *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 717–720.
- [8] a) P. K. Ajikumar, W. H. Xiao, K. E. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T. H. Phon, B. Pfeifer, G. Stephanopoulos, *Science* **2010**, *330*, 70–74; b) D. K. Ro, E. M. Paradise, M. Ouellet, K. J. Fisher, K. L. Newman, J. M. Ndungu, K. A. Ho, R. A. Eachus, T. S. Ham, J. Kirby, M. C. Chang, S. T. Withers, Y. Shiba, R. Sarpong, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 940–943; c) J. M. Dejong, Y. Liu, A. P. Bollon, R. M. Long, S. Jennewein, D. Williams, R. B. Croteau, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 212–224.
- [9] U. Bornscheuer, K. Buchholz, J. Seibel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10876–10893; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11054–11073.
- [10] T. Werpy, G. Petersen, US Department of Energy, Oak Ridge, **2004**.
- [11] a) S. Kinoshita, S. Udaka, M. Shimono, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1957**, *3*, 193–205; b) J. Becker, C. Wittmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 718–726; c) V. F. Wendisch, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30C*, 51–58.
- [12] a) J. Becker, O. Zelder, S. Haefner, H. Schröder, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 159–168; b) M. Ikeda, S. Mitsunashi, K. Tanaka, M. Hayashi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1635–1641; c) J. Schneider, K. Niermann, V. F. Wendisch, *J. Biotechnol.* **2011**, *154*, 191–198; d) N. Stäbler, T. Oikawa, M. Bott, L. Eggeling, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1702–1709.
- [13] A. T. Hüser, C. Chassagnole, N. D. Lindley, M. Merkamm, A. Guyonvarch, V. Elisakova, M. Patek, J. Kalinowski, I. Brune, A. Pühler, A. Tauch, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3255–3268.
- [14] J. Dickschat, S. Wickel, C. J. Bolten, T. Nawrath, S. Schulz, C. Wittmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2687–2695.
- [15] a) T. Mimitsuka, H. Sawai, M. Hatsu, K. Yamada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 2130–2135; b) S. Kind, W. K. Jeong, H. Schröder, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 341–351; c) J. Schneider, V. F. Wendisch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 859–868.
- [16] M. Inui, S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguchi, A. A. Vertes, H. Yukawa, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *7*, 182–196.
- [17] a) M. Inui, H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertes, H. Yukawa, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *8*, 243–254; b) K. M. Smith, K. M. Cho, J. C. Liao, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 1045–1055; c) S. Niimi, N. Suzuki, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1721–1729.
- [18] a) Y. Song, K. Matsumoto, M. Yamada, A. Gohda, C. J. Brigham, A. J. Sinskey, S. Taguchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1917–1925; b) Y. Song, K. Matsumoto, T. Tanaka, A. Kondo, S. Taguchi, *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *115*, 12–14; c) S. J. Jo, C. R. Leong, K. Matsumoto, S. Taguchi, *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *107*, 409–411; d) H. Wu, Q. Li, R. Lu, Y. Wang, X. Zhuang, N. He, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 1203–1209.

- [19] a) S. Kind, S. Neubauer, J. Becker, M. Yamamoto, M. Völkert, G. V. Abendroth, O. Zelder, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2014**, *25*, 113–123; b) N. Okai, C. Takahashi, K. Hatada, C. Ogino, A. Kondo, *AMB Express* **2014**, *4*, 20; c) S. Yamamoto, M. Suda, S. Niimi, M. Inui, H. Yukawa, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 2938–2948; d) J. V. Jensen, V. F. Wendisch, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 63; e) Y. Yi, H. Sheng, Z. Li, Q. Ye, *BMC Biotechnol.* **2014**, *14*, 44; f) G. E. Colón, T. T. Nguyen, M. S. Jetten, A. J. Sinskey, G. Stephanopoulos, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 482–488; g) S. D. Park, J. Y. Lee, S. Y. Sim, Y. Kim, H. S. Lee, *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 327–336; h) L. Y. Jiang, S. G. Chen, Y. Y. Zhang, J. Z. Liu, *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*, 47; i) S. A. Heider, P. Peters-Wendisch, R. Netzer, M. Stafnes, T. Brautaset, V. F. Wendisch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1223–1235; j) J. Schneider, D. Eberhardt, V. F. Wendisch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 169–178; k) S. Hasegawa, M. Suda, K. Uematsu, Y. Natsuma, K. Hiraga, T. Jojima, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 1250–1257; l) A. Ault, *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 347–355; m) W. Leuchtenberger, K. Huthmacher, K. Drauz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *69*, 1–8; n) M. Ikeda, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2003**, *79*, 1–35; o) S. Yamamoto, W. Gunji, H. Suzuki, H. Toda, M. Suda, T. Jojima, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4447–4457; p) P. Peters-Wendisch, M. Stolz, H. Etterich, N. Kennerknecht, H. Sahm, L. Eggeling, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7139–7144; q) M. Stolz, P. Peters-Wendisch, H. Etterich, T. Gerharz, R. Faurie, H. Sahm, H. Fersterra, L. Eggeling, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 750–755; r) F. S. Krause, B. Blombach, B. J. Eikmanns, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 8053–8061; s) M. Vogt, S. Haas, S. Klaffl, T. Polen, L. Eggeling, J. van Ooyen, M. Bott, *Metab. Eng.* **2014**, *22*, 40–52; t) V. Bückle-Vallant, F. S. Krause, S. Messerschmidt, B. J. Eikmanns, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 297–311; u) S. Okino, M. Suda, K. Fujikura, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 449–454; v) S. J. Jo, K. Matsumoto, C. R. Leong, T. Ooi, S. Taguchi, *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *104*, 457–463; w) S. Takeno, M. Takasaki, A. Urabayashi, A. Mimura, T. Muramatsu, S. Mitsuhashi, M. Ikeda, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 6776–6783; x) S. Okino, R. Noburyu, M. Suda, T. Jojima, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 459–464; y) S. H. Park, H. U. Kim, T. Y. Kim, J. S. Park, S. S. Kim, S. Y. Lee, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4618; z) S. Y. Kim, J. Lee, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 416–421.
- [20] a) A. H. Förster, J. Gescher, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 16; b) K. Richter, J. Gescher, *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1222–1226.
- [21] B. Blombach, B. J. Eikmanns, *Bioeng. Bugs* **2011**, *2*, 346–350.
- [22] a) Z. G. Qian, X. X. Xia, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 651–662; b) Z. G. Qian, X. X. Xia, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 93–103.
- [23] a) Q. Huang, C. A. Roessner, R. Croteau, A. I. Scott, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2237–2242; b) H. Tsuruta, C. J. Paddon, D. Eng, J. R. Lenihan, T. Horning, L. C. Anthony, R. Regentin, J. D. Keasling, N. S. Renninger, J. D. Newman, *PLoS One* **2009**, *4*, e4489.
- [24] a) J. Yi, K. Li, K. M. Draths, J. W. Frost, *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1141–1148; b) G. A. Sprenger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 739–749; c) B. Kim, H. Park, D. Na, S. Y. Lee, *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 621–629; d) J. Wang, L. K. Cheng, Q. Liu, T. Shen, N. Chen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7587–7596; e) D. Na, J. H. Park, Y. S. Jang, J. W. Lee, S. Y. Lee in *Systems Metabolic Engineering* (Hrsg.: C. Wittmann, S. Y. Lee), Springer, Dordrecht, **2012**, S. 117–149; f) C. E. Nakamura, G. M. Whited, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 454–459; g) P. Gu, F. Yang, T. Su, F. Li, Y. Li, Q. Qi, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 1443–1450; h) T. Lütke-Eversloh, G. Stephanopoulos, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 103–110; i) S. Atsumi, J. C. Liao, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 414–419; j) K. Ohta, D. S. Beall, J. P. Mejia, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram, *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 893–900; k) J. H. Park, Y. S. Jang, J. W. Lee, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1140–1147; l) J. H. Park, T. Y. Kim, K. H. Lee, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 934–946; m) D. E. Chang, H. C. Jung, J. S. Rhee, J. G. Pan, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1384–1389; n) F. Elischewski, A. Pühler, J. Kalinowski, *J. Biotechnol.* **1999**, *75*, 135–146; o) M. Lee, G. M. Smith, M. A. Eiteman, E. Altman, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *65*, 56–60; p) Y. Zhu, M. A. Eiteman, K. DeWitt, E. Altman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 456–464; q) M. Saini, Z. W. Wang, C. J. Chiang, Y. P. Chao, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4342; r) Y. Dekishima, E. I. Lan, C. R. Shen, K. M. Cho, J. C. Liao, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11399–11401; s) C. Dellomonaco, J. M. Clomburg, E. N. Miller, R. Gonzalez, *Nature* **2011**, *476*, 355–359; t) J. Zhao, Q. Li, T. Sun, X. Zhu, H. Xu, J. Tang, X. Zhang, Y. Ma, *Metab. Eng.* **2013**, *17*, 42–50; u) C. R. Shen, E. I. Lan, Y. Dekishima, A. Baez, K. M. Cho, J. C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2905–2915; v) K. Hashiguchi, H. Matsui, O. Kurahashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 2023–2024; w) T. Bestvater, P. Louis, E. A. Galinski, *Saline Syst.* **2008**, *4*, 12; x) H. Ying, X. He, Y. Li, K. Chen, P. Ouyang, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 3835–3843; y) C. Chen, S. Ding, D. Wang, Z. Li, Q. Ye, *Bioresour. Technol.* **2014**, *163*, 100–105; z) K. Jantama, X. Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, S. A. Svoronos, L. O. Ingram, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 881–893; aa) K. Jantama, M. J. Haupt, S. A. Svoronos, X. Zhang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1140–1153; ab) G. N. Vemuri, M. A. Eiteman, E. Altman, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28*, 325–332; ac) A. L. Rodrigues, N. Trachtman, J. Becker, A. F. Lohanatha, J. Blotenberg, C. J. Bolten, C. Korneli, A. O. de Souza Lima, L. M. Porto, G. A. Sprenger, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2013**, *20*, 29–41; ad) K. H. Lee, J. H. Park, T. Y. Kim, H. U. Kim, S. Y. Lee, *Mol. Syst. Biol.* **2007**, *3*, 149; ae) K. S. Vuoristo, A. E. Mars, J. V. Sangra, J. Springer, G. Eggink, J. P. Sanders, R. A. Weusthuis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *99*, 221–228; af) Z. Lin, Z. Xu, Y. Li, Z. Wang, T. Chen, X. Zhao, *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 104.
- [25] N. A. Buijs, V. Siewers, J. Nielsen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 480–488.
- [26] B. Zhang, R. Carlson, F. Srienc, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 536–543.
- [27] P. J. Westfall, D. J. Pitera, J. R. Lenihan, D. Eng, F. X. Woolard, R. Regentin, T. Horning, H. Tsuruta, D. J. Melis, A. Owens, S. Fickes, D. Diola, K. R. Benjamin, J. D. Keasling, M. D. Leavell, D. J. McPhee, N. S. Renninger, J. D. Newman, C. J. Paddon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E111–118.
- [28] J. M. Otero, D. Cimini, K. R. Patil, S. G. Poulsen, L. Olsson, J. Nielsen, *PLoS One* **2013**, *8*, e54144.
- [29] a) T. Sydor, S. Schaffer, E. Boles, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3361–3363; b) A. R. Brochado, C. Matos, B. L. Moller, J. Hansen, U. H. Mortensen, K. R. Patil, *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 84; c) F. Koopman, J. Beekwilder, B. Crimi, A. van Houwelingen, R. D. Hall, D. Bosch, A. J. van Maris, J. T. Pronk, J. M. Daran, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 155; d) Z. Rao, Z. Ma, W. Shen, H. Fang, J. Zhuge, X. Wang, *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1768–1776; e) D. Brat, C. Weber, W. Lorenzen, H. B. Bode, E. Boles, *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 65; f) S. Saitoh, N. Ishida, T. Onishi, K. Tokuhiko, E. Nagamori, K. Kitamoto, H. Takahashi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2789–2792; g) S. J. Kim, S. O. Seo, Y. S. Jin, J. H. Seo, *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 274–281; h) L. Liu, H. Redden, H. S. Alper, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 1023–1030; i) S. J. Ha, J. M. Galazka, S. R. Kim, J. H. Choi, X. Yang, J. H. Seo, N. L. Glass, J. H.

- Cate, Y. S. Jin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 504–509; j) S. J. Ha, Q. Wei, S. R. Kim, J. M. Galazka, J. H. Cate, Y. S. Jin, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 5822–5825; k) A. Kri-voruchko, C. Serrano-Amatriain, Y. Chen, V. Siewers, J. Nielsen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 1051–1056; l) K. Ukibe, K. Hashida, N. Yoshida, H. Takagi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7205–7211; m) S. Shi, J. O. Valle-Rodriguez, S. Khoomrung, V. Siewers, J. Nielsen, *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 7; n) A. Bahieldin, N. O. Gadalla, S. M. Al-Garni, H. Almehdar, S. Noor, S. M. Hassan, A. M. Shokry, J. S. Sabir, N. Murata, *Plasmid* **2014**, *72*, 18–28; o) N. Lange, A. Steinbüchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1611–1622; p) Z. Shao, Y. Luo, H. Zhao, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *898*, 251–262; q) J. Blazeck, J. Miller, A. Pan, J. Gengler, C. Holden, M. Jamoussi, H. S. Alper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 8155–8164; r) D. Yan, C. Wang, J. Zhou, Y. Liu, M. Yang, J. Xing, *Bioresour. Technol.* **2014**, *156*, 232–239; s) T. Si, Y. Luo, H. Xiao, H. Zhao, *Metab. Eng.* **2014**, *22*, 60–68; t) R. M. Zelle, E. de Hulster, W. A. van Winden, P. de Waard, C. Dijkema, A. A. Winkler, J. M. Geertman, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, A. J. van Maris, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2766–2777.
- [30] a) B. Max, J. M. Salgado, N. Rodriguez, S. Cortes, A. Converti, J. M. Dominguez, *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 862–875; b) H. Driouch, R. Hansch, T. Wucherpfennig, R. Krull, C. Wittmann, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 462–471.
- [31] M. Papagianni, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 244–263.
- [32] M. Okabe, D. Lies, S. Kanamasa, E. Y. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 597–606.
- [33] a) H. Driouch, A. Roth, P. Dersch, C. Wittmann, *Bioeng. Bugs* **2011**, *2*, 100–104; b) H. Driouch, B. Sommer, C. Wittmann, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *105*, 1058–1068.
- [34] R. H. Michna, F. M. Commichau, D. Tödter, C. P. Zschiedrich, J. Stülke, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D692–698.
- [35] M. Kohlstedt, P. K. Sappa, H. Meyer, S. Maass, A. Zapras, T. Hoffmann, J. Becker, L. Steil, M. Hecker, J. M. van Dijk, M. Lalk, U. Mader, J. Stülke, E. Bremer, U. Völker, C. Wittmann, *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 1898–1917.
- [36] a) C. R. Harwood, *Trends Biotechnol.* **1992**, *10*, 247–256; b) M. Papagianni, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 50; c) M. Schallmeyer, A. Singh, O. P. Ward, *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 1–17.
- [37] S. F. Ashby, W. Nowell, *Ann. Bot.* **1926**, *40*, 69–85.
- [38] a) F. W. Tanner, Jr., J. M. Van Lanen, *J. Bacteriol.* **1947**, *54*, 38; b) L. J. Wickerham, M. H. Flickinger, R. M. Johnston, *Arch. Biochem.* **1946**, *9*, 95–98.
- [39] K. P. Stahmann, J. L. Revuelta, H. Seilberger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*, 509–516.
- [40] F. S. Dietrich, S. Voegeli, S. Brachat, A. Lerch, K. Gates, S. Steiner, C. Mohr, R. Pohlmann, P. Luedi, S. Choi, R. A. Wing, A. Flavie, T. D. Gaffney, P. Philippsen, *Science* **2004**, *304*, 304–307.
- [41] a) M. C. Wright, P. Philippsen, *Gene* **1991**, *109*, 99–105; b) S. Steiner, J. Wendland, M. C. Wright, P. Philippsen, *Genetics* **1995**, *140*, 973–987; c) J. Wendland, Y. Ayad-Durieux, P. Knechtle, C. Rebischung, P. Philippsen, *Gene* **2000**, *242*, 381–391.
- [42] T. Kato, E. Y. Park, *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 611–618.
- [43] E. Y. Park, Y. Ito, M. Nariyama, T. Sugimoto, D. Lies, T. Kato, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1315–1326.
- [44] J. W. Lee, D. Na, J. M. Park, J. Lee, S. Choi, S. Y. Lee, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 536–546.
- [45] a) C. Wittmann, J. Becker in *Amino Acid Biosynthesis—Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, Vol. 5 (Hrsg.: V. F. Wendisch), Springer, Berlin, **2007**, S. 40–68; b) G. Gosset, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 651–658.
- [46] a) J. E. Bailey, *Science* **1991**, *252*, 1668–1675; b) D. E. Stafford, G. Stephanopoulos, *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, *4*, 336–340.
- [47] a) M. Kohlstedt, J. Becker, C. Wittmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 1065–1075; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [48] a) F. R. Blattner, G. Plunkett 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science* **1997**, *277*, 1453–1462; b) S. Brachat, F. S. Dietrich, S. Voegeli, Z. Zhang, L. Stuart, A. Lerch, K. Gates, T. Gaffney, P. Philippsen, *Genome Biol.* **2003**, *4*, R45; c) A. M. Earl, M. Eppinger, W. F. Fricke, M. J. Rosovitz, D. A. Rasko, S. Daugherty, R. Losick, R. Kolter, J. Ravel, *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 2378–2379; d) J. Kalinowski, B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfeifferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegand, A. Tauch, *J. Biotechnol.* **2003**, *104*, 5–25.
- [49] a) T. Y. Kim, H. U. Kim, J. M. Park, H. Song, J. S. Kim, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 657–671; b) K. R. Kjeldsen, J. Nielsen, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 583–597; c) Y. K. Oh, B. O. Palsson, S. M. Park, C. H. Schilling, R. Mahadevan, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28791–28799; d) J. L. Reed, T. D. Vo, C. H. Schilling, B. O. Palsson, *Genome Biol.* **2003**, *4*, R54; e) A. Rezola, L. F. de Figueiredo, M. Brock, J. Pey, A. Podhorski, C. Wittmann, S. Schuster, A. Bockmayr, F. J. Planes, *Bioinformatics* **2011**, *27*, 534–540.
- [50] a) M. Ikeda, S. Nakagawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 99–109; b) M. Ikeda, J. Ohnishi, M. Hayashi, S. Mitsuhashi, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 610–615; c) J. Ohnishi, R. Katahira, S. Mitsuhashi, S. Kakita, M. Ikeda, *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *242*, 265–274; d) J. Ohnishi, S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, M. Ikeda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 217–223.
- [51] a) M. Hayashi, H. Mizoguchi, N. Shiraishi, M. Obayashi, S. Nakagawa, J. Imai, S. Watanabe, T. Ota, M. Ikeda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1337–1344; b) K. C. Kao, L. M. Tran, J. C. Liao, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36079–36087; c) V. Haurie, M. Perrot, T. Mini, P. Jen, F. Sagliocco, H. Boucherie, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 76–85; d) K. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Miwa, C. M. Kang, M. Matsunaga, H. Yamaguchi, S. Tojo, M. Yamamoto, R. Nishi, N. Ogasawara, T. Nakayama, Y. Fujita, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 683–692.
- [52] a) M. Silberbach, A. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, B. Walter, R. Krämer, A. Burkovski, *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 357–367; b) M. Silberbach, M. Schäfer, A. T. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, R. Krämer, A. Burkovski, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2391–2402; c) H. Jarmer, R. Berka, S. Knudsen, H. H. Saxild, *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *206*, 197–200.
- [53] D. A. Rey, A. Pühler, J. Kalinowski, *J. Biotechnol.* **2003**, *103*, 51–65.
- [54] a) G. Beckers, J. Strosser, U. Hildebrandt, J. Kalinowski, M. Farwick, R. Krämer, A. Burkovski, *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 580–595; b) N. Rehm, T. Georgi, E. Hiery, U. Degner, A. Schmiedl, A. Burkovski, M. Bott, *Microbiology* **2010**, *156*, 3180–3193; c) C. Rückert, J. Milse, A. Albersmeier, D. J. Koch, A. Pühler, J. Kalinowski, *BMC Genomics* **2008**, *9*, 483; d) S. Yun, J. M. Shin, O. C. Kim, Y. R. Jung, D. B. Oh, S. Y. Lee, O. Kwon, *J. Microbiol.* **2012**, *50*, 665–672; e) T. L. Raivio, S. K. Leblanc, N. L. Price, *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 2755–2767; f) S. M. Waters, J. A. Robles-Martinez, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 4788–4794; g) B. Voigt, R. Schroeter, B. Jurgen, D. Albrecht, S. Evers, J. Bongaerts, K. H. Maurer, T. Schweder, M. Hecker, *Proteomics* **2013**, *13*, 2140–2161.

- [55] M. Hayashi, H. Mizoguchi, J. Ohnishi, S. Mitsuhashi, Y. Yonetani, S. Hashimoto, M. Ikeda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 783–789.
- [56] S. Kind, S. Kreye, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 617–627.
- [57] C. Lange, D. Rittmann, V. F. Wendisch, M. Bott, H. Sahm, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2521–2532.
- [58] J. H. Park, K. H. Lee, T. Y. Kim, S. Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7797–7802.
- [59] S. Shi, T. Chen, Z. Zhang, X. Chen, X. Zhao, *Metab. Eng.* **2009**, *11*, 243–252.
- [60] Y. Shen, X. Chen, B. Peng, L. Chen, J. Hou, X. Bao, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1079–1091.
- [61] a) B. T. Wilhelm, J. R. Landry, *Methods* **2009**, *48*, 249–257; b) Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 57–63.
- [62] a) A. Mentz, A. Neshat, K. Pfeifer-Sancar, A. Pühler, C. Rückert, J. Kalinowski, *BMC Genomics* **2013**, *14*, 714; b) A. Neshat, A. Mentz, C. Rückert, J. Kalinowski, *J. Biotechnol.* **2014**, *190*, 55–63; c) M. K. Thomason, T. Bischler, S. K. Eisenbart, K. U. Forstner, A. Zhang, A. Herbig, K. Nieselt, C. M. Sharma, G. Storz, *J. Bacteriol.* **2015**, *197*, 18–280; d) M. Vital, B. Chai, B. Ostman, J. Cole, K. T. Konstantinidis, J. M. Tiedje, *ISME J.* **2014**, *8*, DOI: 10.1038/ismej.2014.204.
- [63] C. H. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *624*, 16–36.
- [64] a) A. Fanous, F. Weiland, C. Luck, A. Gorg, A. Friess, H. Parlar, *Chemosphere* **2007**, *69*, 25–31; b) A. Fanous, W. Weiss, A. Gorg, F. Jacob, H. Parlar, *Proteomics* **2008**, *8*, 4976–4986; c) C. Bro, B. Regenber, G. Lagniel, J. Labarre, M. Montero-Lomeli, J. Nielsen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32141–32149.
- [65] a) L. Peng, K. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 163–178; b) T. Polen, D. Schluesener, A. Poetsch, M. Bott, V. F. Wendisch, *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *273*, 109–119.
- [66] a) S. Ghaemmaghami, W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea, J. S. Weissman, *Nature* **2003**, *425*, 737–741; b) A. Bachi, T. Bonaldi, *J. Proteomics* **2008**, *71*, 357–367.
- [67] a) C. J. Bolten, P. Kiefer, F. Letisse, J. C. Portais, C. Wittmann, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3843–3849; b) C. J. Bolten, C. Wittmann, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1993–2000; c) H. Meyer, H. Weidmann, M. Lalk, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 69; d) C. Wittmann, M. Hans, E. Heinzle, *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 379–382.
- [68] a) H. Taymaz-Nikerel, M. de Mey, C. Ras, A. ten Pierick, R. M. Seifar, J. C. van Dam, J. J. Heijnen, W. M. van Gulik, *Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 9–19; b) W. M. Van Gulik, A. B. Canelas, H. Taymaz-Nikerel, R. D. Douma, L. P. de Jonge, J. J. Heijnen, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *881*, 279–306; c) R. Zhou, L. Li, *J. Proteomics* **2014**, DOI: 10.1016/j.jprot.2014.08.004; d) B. Luo, K. Groenke, R. Takors, C. Wandrey, M. Oldiges, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1147*, 153–164; e) S. A. Wahl, R. M. Seifar, A. Ten Pierick, C. Ras, J. C. van Dam, J. J. Heijnen, W. M. van Gulik, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1191*, 91–105.
- [69] a) C. J. Bolten, H. Schröder, J. Dickschat, C. Wittmann, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *20*, 1196–1203; b) J. O. Krömer, E. Heinzle, H. Schröder, C. Wittmann, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 609–618; c) L. Wu, W. A. van Winden, W. M. van Gulik, J. J. Heijnen, *Metab. Eng.* **2005**, *7*, 302–310; d) S. Kind, W. K. Jeong, H. Schröder, O. Zelder, C. Wittmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 5175–5180.
- [70] a) C. Wittmann, E. Heinzle, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5843–5859; b) A. Marx, B. J. Eikmanns, H. Sahm, A. A. de Graaf, L. Eggeling, *Metab. Eng.* **1999**, *1*, 35–48; c) A. Marx, K. Striegel, A. A. de Graaf, H. Sahm, L. Eggeling, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 168–180.
- [71] a) C. Wittmann, P. Kiefer, O. Zelder, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 7277–7287; b) P. Kiefer, E. Heinzle, O. Zelder, C. Wittmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 229–239; c) V. F. Wendisch, A. A. de Graaf, H. Sahm, B. J. Eikmanns, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 3088–3096.
- [72] a) J. O. Krömer, O. Sorgenfrei, K. Kloppe, E. Heinzle, C. Wittmann, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1769–1784; b) J. J. Vallino, G. Stephanopoulos, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 633–646.
- [73] a) J. Becker, C. Wittmann in *Corynebacterium glutamicum—Biology and Biotechnology* (Hrsg.: H. Yukawa, M. Inui), Springer, Berlin, **2013**, S. 217–237; b) C. Wittmann, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2010**, *120*, 21–49.
- [74] a) H. Neuweger, M. Persicke, S. P. Albaum, T. Bekel, M. Dondrup, A. T. Huser, J. Winnefeld, J. Schneider, J. Kalinowski, A. Goesmann, *BMC Syst. Biol.* **2009**, *3*, 82; b) B. H. Junker, C. Klukas, F. Schreiber, *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 109; c) K. A. Le Cao, I. Gonzalez, S. Dejean, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2855–2856.
- [75] W. Zhang, F. Li, L. Nie, *Microbiology* **2010**, *156*, 287–301.
- [76] J. O. Krömer, C. Wittmann, H. Schröder, E. Heinzle, *Metab. Eng.* **2006**, *8*, 353–369.
- [77] N. Buschke, J. Becker, R. Schäfer, P. Kiefer, R. Biedendieck, C. Wittmann, *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 557–570.
- [78] a) M. Dauner, U. Sauer, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *76*, 132–143; b) T. Hao, B. Han, H. Ma, J. Fu, H. Wang, Z. Wang, B. Tang, T. Chen, X. Zhao, *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 2034–2044; c) R. Ledesma-Amaro, E. J. Kerkhoven, J. L. Revuelta, J. Nielsen, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 1191–1199.
- [79] R. Agren, J. M. Otero, J. Nielsen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 735–747.
- [80] C. T. Trinh, J. Li, H. W. Blanch, D. S. Clark, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4894–4904.
- [81] a) H. Driouch, G. Melzer, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 47–58; b) I. Poblete-Castro, D. Binger, A. Rodrigues, J. Becker, V. A. Martins Dos Santos, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2013**, *15*, 113–123; c) G. Melzer, M. E. Esfandabadi, E. Franco-Lara, C. Wittmann, *BMC Syst. Biol.* **2009**, *3*, 120; d) S. J. Lee, D. Y. Lee, T. Y. Kim, B. H. Kim, J. Lee, S. Y. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7880–7887; e) S. Y. Lee, S. H. Hong, S. Y. Moon, *Genome Inform.* **2002**, *13*, 214–223.
- [82] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, H. G. Khorana, *J. Mol. Biol.* **1971**, *56*, 341–361.
- [83] M. Meselson, R. Yuan, J. Heywood, *Annu. Rev. Biochem.* **1972**, *41*, 447–466.
- [84] A. D. Malcolm, *Biochem. Soc. Symp.* **1979**, *44*, 1–12.
- [85] D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison 3rd, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* **2010**, *329*, 52–56.
- [86] M. J. Czar, J. C. Anderson, J. S. Bader, J. Peccoud, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 63–72.
- [87] a) D. G. Gibson, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6984–6990; b) D. G. Gibson, L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison 3rd, H. O. Smith, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 343–345.
- [88] a) J. Becker, J. Reinefeld, R. Stellmacher, R. Schäfer, A. Lange, H. Meyer, M. Lalk, O. Zelder, G. von Abendroth, H. Schröder, S. Haefner, C. Wittmann, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 3013–3023; b) I. J. Oh, D. H. Kim, E. K. Oh, S. Y. Lee, J. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *19*, 167–171.
- [89] a) S. Petersen, C. Mack, A. A. de Graaf, C. Riedel, B. J. Eikmanns, H. Sahm, *Metab. Eng.* **2001**, *3*, 344–361; b) S. Kind, J. Becker, C. Wittmann, *Metab. Eng.* **2013**, *15*, 184–195; c) K. Sawada, S. Zen-in, M. Wada, A. Yokota, *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 401–407.
- [90] a) A. Rodriguez, R. Martinez, N. Flores, A. Escalante, G. Gosset, F. Bolivar, *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 128; b) E. Meza,

- J. Becker, F. Bolivar, G. Gosset, C. Wittmann, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 127.
- [91] a) J. Kalinowski, J. Cremer, B. Bachmann, L. Eggeling, H. Sahm, A. Pühler, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 1197–1204; b) C. Zhang, Z. Kang, J. Zhang, G. Du, J. Chen, X. Yu, *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *353*, 11–18; c) J. Becker, C. Klopprogge, A. Herold, O. Zelder, C. J. Bolten, C. Wittmann, *J. Biotechnol.* **2007**, *132*, 99–109; d) T. Shi, Y. Wang, Z. Wang, G. Wang, D. Liu, J. Fu, T. Chen, X. Zhao, *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 101.
- [92] a) S. Schneider, M. Gutierrez, T. Sandalova, G. Schneider, P. Clapes, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 681–690; b) R. R. Bommarreddy, Z. Chen, S. Rappert, A. P. Zeng, *Metab. Eng.* **2014**, *25C*, 30–37.
- [93] a) S. M. O'Donnell, G. R. Janssen, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1277–1283; b) R. L. Vellanoweth, J. C. Rabinowitz, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 1105–1114; c) E. B. Vervoort, A. van Ravestein, N. N. van Peij, J. C. Heikoop, P. J. van Haastert, G. F. Verheijden, M. H. Linskens, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2069–2074.
- [94] B. Wiedemann, E. Boles, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2043–2050.
- [95] a) J. Becker, N. Buschke, R. Bucker, C. Wittmann, *Eng. Life Sci.* **2010**, *10*, 430–438; b) J. Becker, C. Klopprogge, H. Schröder, C. Wittmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7866–7869.
- [96] B. Blombach, M. E. Schreiner, M. Moch, M. Oldiges, B. J. Eikmanns, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 615–623.
- [97] a) N. Buschke, H. Schröder, C. Wittmann, *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 306–317; b) H. Redden, N. Morse, H. S. Alper, *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, DOI: 10.1111/1567-1364.12188.
- [98] a) M. Pátek, J. Holatko, T. Busche, J. Kalinowski, J. Nesvera, *Microb. Biotechnol.* **2013**, *6*, 103–117; b) M. Pátek, G. Muth, W. Wohlleben, *J. Biotechnol.* **2003**, *104*, 325–334; c) M. Patek, J. Nesvera in *Corynebacterium glutamicum—Biology and Biotechnology* (Hrsg.: H. Yukawa, M. Inui), Springer, Berlin, **2013**, S. 51–88; d) J. Blazeck, H. S. Alper, *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 46–58; e) V. Singh, *Gene* **2014**, *535*, 1–11.
- [99] a) J. V. Rytter, S. Helmark, J. Chen, M. J. Lezyk, C. Solem, P. R. Jensen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 2617–2623; b) S. S. Yim, S. J. An, M. Kang, J. Lee, K. J. Jeong, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 2959–2969.
- [100] C. Elena, P. Ravasi, M. E. Castelli, S. Peiru, H. G. Menzella, *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 21.
- [101] a) N. E. Altaras, D. C. Cameron, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1180–1185; b) J. Y. Jung, E. S. Choi, M. K. Oh, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1797–1802.
- [102] E. Celinska, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 519–530.
- [103] H. Yim, R. Haselbeck, W. Niu, C. Pujol-Baxley, A. Burgard, J. Boldt, J. Khandurina, J. D. Trawick, R. E. Osterhout, R. Stephen, J. Estadilla, S. Teisan, H. B. Schreyer, S. Andrae, T. H. Yang, S. Y. Lee, M. J. Burk, S. Van Dien, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 445–452.
- [104] a) S. J. Kim, S. O. Seo, Y. C. Park, Y. S. Jin, J. H. Seo, *J. Biotechnol.* **2014**, *192*, 376–382; b) H. Nan, S. O. Seo, E. J. Oh, J. H. Seo, J. H. Cate, Y. S. Jin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5757–5764.
- [105] M. Lu, S. Lee, B. Kim, C. Park, M. Oh, K. Park, S. Y. Lee, J. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 659–667.
- [106] S. Y. Park, B. Kim, S. Lee, M. Oh, J. I. Won, J. Lee, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2014**, *61*, 535.
- [107] a) B. Litsanov, M. Brocker, M. Bott, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 3325–3337; b) G. N. Vemuri, M. A. Eiteman, E. Altman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1715–1727.
- [108] B. Litsanov, A. Kabus, M. Brocker, M. Bott, *Microb. Biotechnol.* **2012**, *5*, 116–128.
- [109] N. Zhu, H. Xia, Z. Wang, X. Zhao, T. Chen, *PLoS One* **2013**, *8*, e60659.
- [110] a) A. M. Raab, G. Gebhardt, N. Bolotina, D. Weuster-Botz, C. Lang, *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 518–525; b) Y. Ito, T. Hirasawa, H. Shimizu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 151–159.
- [111] A. M. Raab, C. Lang, *Bioeng. Bugs* **2011**, *2*, 120–123.
- [112] X. Zhang, X. Wang, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 427–434.
- [113] T. Willke, K. D. Vorlop, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 289–295.
- [114] A. Kuenz, Y. Gallenmüller, T. Willke, K. D. Vorlop, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1209–1216.
- [115] T. Klement, J. Büchs, *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 422–431.
- [116] J. Schneider, V. F. Wendisch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 17–30.
- [117] H. Choi, H. H. Kyeong, J. M. Choi, H. S. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 7483–7490.
- [118] M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 877–902.
- [119] a) B. S. Dien, N. N. Nichols, R. J. Bothast, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 259–264; b) B. S. Dien, N. N. Nichols, R. J. Bothast, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *29*, 221–227; c) Y. Wang, T. Tian, J. Zhao, J. Wang, T. Yan, L. Xu, Z. Liu, E. Garza, A. Iverson, R. Manow, C. Finan, S. Zhou, *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 2069–2075; d) S. Mazumdar, J. Bang, M. K. Oh, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 1938–1952; e) S. Mazumdar, M. D. Blankschien, J. M. Clomburg, R. Gonzalez, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 7; f) S. Mazumdar, J. M. Clomburg, R. Gonzalez, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4327–4336.
- [120] a) Y. K. Jung, T. Y. Kim, S. J. Park, S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *105*, 161–171; b) Y. K. Jung, S. Y. Lee, *J. Biotechnol.* **2011**, *151*, 94–101.
- [121] a) H. Kawaguchi, M. Sasaki, A. A. Vertes, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1053–1062; b) H. Kawaguchi, A. A. Vertes, S. Okino, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3418–3428; c) M. Sasaki, T. Jojima, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 691–699.
- [122] N. Ishida, S. Saitoh, K. Tokuhito, E. Nagamori, T. Matsuyama, K. Kitamoto, H. Takahashi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1964–1970.
- [123] K. Tokuhito, N. Ishida, E. Nagamori, S. Saitoh, T. Onishi, A. Kondo, H. Takahashi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 883–890.
- [124] C. Rathnasingh, S. M. Raj, J. E. Jo, S. Park, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 729–739.
- [125] a) Q. Wang, C. Liu, M. Xian, Y. Zhang, G. Zhao, *J. Microbiol.* **2012**, *50*, 693–697; b) Q. Wang, P. Yang, C. Liu, Y. Xue, M. Xian, G. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 548–551; c) Q. Wang, P. Yang, M. Xian, L. Feng, J. Wang, G. Zhao, *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 2257–2262; d) B. Andreessen, A. B. Lange, H. Robenek, A. Steinbuchel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 622–626; e) Y. Gao, C. Liu, Y. Ding, C. Sun, R. Zhang, M. Xian, G. Zhao, *PLoS One* **2014**, *9*, e97845.
- [126] Y. Wang, J. Yin, G. Q. Chen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30C*, 59–65.
- [127] I. Poblete-Castro, J. Becker, K. Dohnt, V. M. dos Santos, C. Wittmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 2279–2290.
- [128] a) S. Tomizawa, M. Hyakutake, Y. Saito, J. Agus, K. Mizuno, H. Abe, T. Tsuge, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2660–2666; b) S. J. Park, T. W. Lee, S. C. Lim, T. W. Kim, H. Lee, M. K. Kim, S. H. Lee, B. K. Song, S. Y. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 273–283.
- [129] Q. Zhuang, Q. Wang, Q. Liang, Q. Qi, *Metab. Eng.* **2014**, *24*, 78–86.
- [130] a) Z. P. Guo, L. Zhang, Z. Y. Ding, G. Y. Shi, *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 49–59; b) H. Valadi, C. Larsson, L. Gustafsson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 434–439.

- [131] a) Z. P. Guo, L. Zhang, Z. Y. Ding, Z. X. Wang, G. Y. Shi, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 935–943; b) T. L. Nissen, M. C. Kielland-Brandt, J. Nielsen, J. Villadsen, *Metab. Eng.* **2000**, *2*, 69–77; c) V. Guadalupe Medina, M. J. Almering, A. J. van Maris, J. T. Pronk, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 190–195.
- [132] a) T. Subtil, E. Boles, *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4*, 38; b) H. Shahsavarani, M. Sugiyama, Y. Kaneko, B. Chuenchit, S. Harashima, *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1289–1300; c) A. J. van Maris, A. A. Winkler, M. Kuyper, W. T. de Laat, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2007**, *108*, 179–204; d) S. Benjaphokee, P. Koedrith, C. Auesukaree, T. Asvarak, M. Sugiyama, Y. Kaneko, C. Boonchird, S. Harashima, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *29*, 166–176; e) M. Z. An, Y. Q. Tang, K. Mitsumasa, Z. S. Liu, M. Shigeru, K. Kenji, *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 1367–1374.
- [133] S. Zhou, A. G. Iverson, W. S. Grayburn, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 335–342.
- [134] L. P. Yomano, S. W. York, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1389–1398.
- [135] a) E. N. Miller, L. R. Jarboe, L. P. Yomano, S. W. York, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 4315–4323; b) Y. Wang, R. Manow, C. Finan, J. Wang, E. Garza, S. Zhou, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1371–1377.
- [136] B. Blombach, T. Riester, S. Wieschalka, C. Ziert, J. W. Youn, V. F. Wendisch, B. J. Eikmanns, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3300–3310.
- [137] S. Atsumi, T. Hanai, J. C. Liao, *Nature* **2008**, *451*, 86–89.
- [138] S. Atsumi, A. F. Cann, M. R. Connor, C. R. Shen, K. M. Smith, M. P. Brynildsen, K. J. Chou, T. Hanai, J. C. Liao, *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 305–311.
- [139] C. R. Shen, J. C. Liao, *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 312–320.
- [140] B. B. Bond-Watts, R. J. Bellerose, M. C. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 222–227.
- [141] X. Chen, K. F. Nielsen, I. Borodina, M. C. Kielland-Brandt, K. Karhumaa, *Biotechnol. Biofuels* **2011**, *4*, 21.
- [142] E. J. Steen, Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S. B. Del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature* **2010**, *463*, 559–562.
- [143] R. Kalscheuer, T. Stolting, A. Steinbüchel, *Microbiology* **2006**, *152*, 2529–2536.
- [144] R. Kalscheuer, H. Luftmann, A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 7119–7125.
- [145] E. Holtzapple, C. Schmidt-Dannert, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 3804–3812.
- [146] a) J. Kim, H. Fukuda, T. Hirasawa, K. Nagahisa, K. Nagai, M. Wachi, H. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 911–920; b) J. Kim, T. Hirasawa, Y. Sato, K. Nagahisa, C. Furusawa, H. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 1097–1106; c) E. Kimura in *Handbook of Corynebacterium glutamicum* (Hrsg.: L. Eggeling, M. Bott), CRC, Boca Raton, **2005**, S. 439–463.
- [147] H. Sato, K. Orishimo, T. Shirai, T. Hirasawa, K. Nagahisa, H. Shimizu, M. Wachi, *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *106*, 51–58.
- [148] Y. Asakura, E. Kimura, Y. Usuda, Y. Kawahara, K. Matsui, T. Osumi, T. Nakamatsu, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1308–1319.
- [149] a) P. G. Peters-Wendisch, B. Schiel, V. F. Wendisch, E. Katsooulidis, B. Möckel, H. Sahm, B. J. Eikmanns, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *3*, 295–300; b) P. Peters-Wendisch, K. C. Stansen, S. Gotker, V. F. Wendisch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 2493–2502.
- [150] a) J. Becker, C. Klopprogge, O. Zelder, E. Heinzle, C. Wittmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8587–8596; b) A. Kabus, T. Georgi, V. F. Wendisch, M. Bott, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 47–53.
- [151] J. Becker, S. Kind, C. Wittmann in *Systems Metabolic Engineering* (Hrsg.: C. Wittmann, S. Y. Lee), Springer, Dordrecht, **2012**, S. 152–191.
- [152] M. Ikeda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 615–626.
- [153] a) C. Zhang, J. Zhang, Z. Kang, G. Du, X. Yu, T. Wang, J. Chen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 643–651; b) Z. Zhao, J. Y. Ding, T. Li, N. Y. Zhou, S. J. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 2005–2013; c) P. P. Li, Y. J. Liu, S. J. Liu, *Microbiology* **2009**, *155*, 3382–3391; d) S. Lin, R. Liang, X. Meng, H. OuYang, H. Yan, Y. Wang, G. S. Jones, *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *68*, 173–177; e) K. Gottlieb, C. Albermann, G. A. Sprenger, *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 96; f) R. Ding, L. Liu, X. Chen, Z. Cui, A. Zhang, D. Ren, L. Zhang, *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 2103–2108.
- [154] a) D. Koma, H. Yamanaka, K. Moriyoshi, T. Ohmoto, K. Sakai, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6203–6216; b) T. Vannelli, W. Wei Qi, J. Sweigard, A. A. Gatenby, F. S. Sariaslani, *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 142–151.
- [155] J. O. Krömer, D. Nunez-Bernal, N. J. Aversch, J. Hampe, J. Varela, C. Varela, *J. Biotechnol.* **2013**, *163*, 184–193.
- [156] a) E. Trantas, N. Panopoulos, F. Ververidis, *Metab. Eng.* **2009**, *11*, 355–366; b) S. Y. Shin, N. S. Han, Y. C. Park, M. D. Kim, J. H. Seo, *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 48–53.
- [157] G. Winter, N. J. Aversch, D. Nunez-Bernal, J. O. Krömer, *Yeast* **2014**, *31*, 333–341.
- [158] K. Miwa, T. Tsuchida, O. Kurahashi, S. Nakamori, K. Sano, H. Momose, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 2329–2334.
- [159] a) F. Shi, K. Li, X. Huan, X. Wang, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *171*, 504–521; b) J. Wang, B. Wen, Q. Xu, C. Zhang, N. Chen, X. Xie, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *171*, 20–30; c) L. Yin, F. Shi, X. Hu, C. Chen, X. Wang, *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *114*, 1369–1377; d) B. Blombach, M. E. Schreiner, J. Holatko, T. Bartek, M. Oldiges, B. J. Eikmanns, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2079–2084; e) J. Holátko, V. Elisakova, M. Prouza, M. Sobotka, J. Nesvera, M. Patek, *J. Biotechnol.* **2009**, *139*, 203–210.
- [160] a) C. Chassagnole, A. Diano, F. Letisse, N. D. Lindley, *J. Biotechnol.* **2003**, *104*, 261–272; b) N. Dusch, A. Pühler, J. Kalinowski, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1530–1539; c) H. Sahm, L. Eggeling, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1973–1979.
- [161] T. Jojima, M. Fujii, E. Mori, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 159–165.
- [162] G. H. Hwang, J. Y. Cho, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 573–578.
- [163] a) F. Shi, J. Jiang, Y. Li, Y. Xie, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 1285–1296; b) F. Shi, Y. Li, *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 2469–2474; c) C. Takahashi, J. Shirakawa, T. Tsuchida, N. Okai, K. Hatada, H. Nakayama, T. Tateno, C. Ogino, A. Kondo, *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *51*, 171–176.
- [164] C. M. Burgess, E. J. Smid, D. van Sinderen, *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *133*, 1–7.
- [165] a) A. Jiménez, M. A. Santos, M. Pompejus, J. L. Revuelta, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5743–5751; b) A. Jiménez, M. A. Santos, J. L. Revuelta, *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*, 67.
- [166] N. Monschau, H. Sahm, K. Stahmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4283–4290.
- [167] C. Schlüpen, M. A. Santos, U. Weber, A. de Graaf, J. L. Revuelta, K. P. Stahmann, *Biochem. J.* **2003**, *369*, 263–273.
- [168] a) J. B. Perkins, A. Sloma, T. Hermann, K. Theriault, E. Zachgo, T. Erdenberger, N. Hannett, N. P. Chatterjee, V. I. Williams, G. A. J. Rufo, R. Hatch, J. Pero, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *22*, 8–18; b) M. Hümbelin, V. Griesser, T. Keller, W. Schurter, M. Haiker, H. P. Hohmann, H. Ritz, G. Richter, A. Bacher, A. P. G. M. van Loon, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *22*, 1–7.

- [169] a) N. Zamboni, N. Mouncey, H. P. Hohmann, U. Sauer, *Metab. Eng.* **2003**, *5*, 49–55; b) X. J. Li, T. Chen, X. Chen, X. M. Zhao, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73*, 374–383.
- [170] a) Y. Zhu, X. Chen, T. Chen, S. Shi, X. Zhao, *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1667–1672; b) Z. Wang, T. Chen, X. Ma, Z. Shen, X. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3934–3940.
- [171] S. Tännler, N. Zamboni, C. Kiraly, S. Aymerich, U. Sauer, *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 216–226.
- [172] a) G. Wang, L. Bai, Z. Wang, T. Shi, T. Chen, X. Zhao, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1893–1900; b) M. Birkenmeier, S. Neumann, T. Röder, *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 919–928; c) B. Y. Jeong, C. Wittmann, T. Kato, E. Y. Park, *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *119*, 101–106.
- [173] H. J. Kunte, G. Lentzen, E. A. Galinski, *Curr. Biotechnol.* **2014**, *3*, 10–25.
- [174] A. Das, S. H. Yoon, S. H. Lee, J. Y. Kim, D. K. Oh, S. W. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 505–512.
- [175] S. A. Heider, P. Peters-Wendisch, V. F. Wendisch, *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 198.
- [176] Q. Li, Z. Sun, J. Li, Y. Zhang, *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *345*, 94–101.
- [177] a) Y. S. Kim, J. H. Lee, N. H. Kim, S. J. Yeom, S. W. Kim, D. K. Oh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 489–497; b) S. H. Yoon, J. E. Kim, S. H. Lee, H. M. Park, M. S. Choi, J. Y. Kim, Y. C. Shin, J. D. Keasling, S. W. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 131–139.
- [178] Q. Cheng, L. Tao, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *892*, 143–158.
- [179] T. Nishizaki, K. Tsuge, M. Itaya, N. Doi, H. Yanagawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1355–1361.
- [180] J. R. Lenihan, H. Tsuruta, D. Diola, N. S. Renninger, R. Regentin, *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 1026–1032.
- [181] C. J. Paddon, P. J. Westfall, D. J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D. R. Pollichuk, K. H. Teoh, D. W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Dengrove, D. Diola, G. Dorin, K. W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S. P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, H. Jiang, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L. F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievense, P. S. Cavello, J. D. Keasling, K. K. Reiling, N. S. Renninger, J. D. Newman, *Nature* **2013**, *496*, 528–532.
- [182] M. Jiang, G. Stephanopoulos, B. A. Pfeifer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 841–849.
- [183] a) S. Jennewein, H. Park, J. M. DeJong, R. M. Long, A. P. Bollon, R. B. Croteau, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *89*, 588–598; b) B. Engels, P. Dahm, S. Jennewein, *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 201–206.
- [184] C. A. Abbas, in International Symposium of Innovative Bio-Production, Kobe, **2014**.