

- 1 -

Biotechnologisches Syntheseverfahren von organischen Verbindungen mit alkL-Genprodukt

Gebiet der Erfindung

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von organischen Verbindungen unter Zuhilfenahme mindestens eines alkL-Genproduktes.

Stand der Technik

- 10 Fettsäuren und deren Derivate werden heute ausschließlich aus pflanzlichen und tierischen Ölen bzw. Fetten gewonnen. Dies hat eine Vielzahl von Nachteilen:
Insbesondere tierische Fette treffen in Folge der BSE-Krise als Rohstoffe kaum noch auf Kundenakzeptanz. Pflanzliche Öle, die kurz- und mittelkettige Fettsäuren enthalten, sind entweder schwer verfügbar oder werden in tropischen Regionen produziert. Hier ist in vielen Fällen die Nachhaltigkeit der Produktion in Frage gestellt, da gegebenenfalls Regenwald
15 gerodet wird, um die Anbauflächen bereit zu stellen.
Außerdem besitzen pflanzliche und tierische Öle bzw. Fette für den jeweiligen Rohstoff spezifische, aber festgelegte Fettsäurespektren. Daher findet hier eine Koppelproduktion statt, die für eine bestimmte Fettsäurespezies preisbestimmend sein kann. Zu guter letzt sind viele der pflanzlichen Öle gleichzeitig auch Nahrungsmittel, so dass unter bestimmten Umständen
20 eine Konkurrenz zwischen stofflicher Verwertung und einer Verwertung als Nahrungsmittel auftreten kann.

- Aus diesem Grund wird nach alternativen Quellen und Produktionswegen für Fettsäuren gesucht, wodurch zur Zeit viel Forschungsaufwand zur Herstellung von Fettsäuren in
25 beispielsweise Algen, aber auch insbesondere in rekombinanten Mikroorganismen wie beispielweise Hefen und Bakterien investiert wird.

- Obwohl sich eine Reihe von Technologien für die Herstellung von auf Fettsäuren basierenden Treibstoffen und Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen, insbesondere Kohlenhydraten,
30 in der Entwicklung befinden, sind die erreichten Ausbeuten für eine sinnvolle kommerzielle Nutzung zu gering.

- 2 -

Aufgabe der Erfindung war es, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von organischen Verbindungen mit einer höheren Produktivität bereitzustellen..

5 Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die im Folgenden beschriebene Co-Expression eines alkL-Genproduktes in dem produzierenden Mikroorganismus die der Erfindung gestellte Aufgabe zu lösen vermag.

- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Mikroorganismen, die organische Substanzen synthetisieren und verstärkt alkL exprimieren.
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorgenannten Mikroorganismen zur Herstellung von organischen Substanzen sowie ein Verfahren zur Herstellung von organischen Substanzen unter Einsatz der Mikroorganismen.

15

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass die Produktinhibition im Herstellungsverfahren stark reduziert werden kann.

Ein weiterer Vorteil ist es, dass die Raum-Zeit-Ausbeute und Kohlenstoffausbeute des Verfahrens erhöht ist, verglichen zu Mikroorganismen die kein oder weniger alkL exprimieren.

- 20 Noch ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass die Produktkonzentration im Kulturüberstand erhöht wird, so dass eine effiziente Aufarbeitung erleichtert wird.

Alle angegebenen Prozent (%) sind, wenn nicht anders angegeben, Massenprozent.

- 25 Die Erfindung umfasst Methoden für die Generierung von rekombinanten mikrobiellen Zellen, die in der Lage sind, organische Substanzen, wie Carbonsäuren und Carbonsäurederivate wie zum Beispiel Carbonsäureester, Alkane, Alkan-1-ole, Alkan-1-ale, Alkan-1-amine sowie 1-Alkene, aus nicht verwandten Kohlenstoffquellen herzustellen.
- 30 Die vorliegende Erfindung umfasst somit einen Mikroorganismus, der eine erste gentechnische Modifikation aufweist, so dass er verglichen zu seinem Wildtyp mehr organische Substanz aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermag, dadurch gekennzeichnet, dass

der Mikroorganismus eine zweite gentechnische Modifikation aufweist, so dass er verglichen zu seinem Wildtyp mehr alkL-Genprodukt bildet.

Unter dem Begriff „eine erste gentechnische Modifikation“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung mindestens eine gentechnische Veränderung des Mikroorganismus verstanden, bei dem ein oder mehrere Gene in ihrer Expression verglichen zum Wildtypstamm verändert, d.h. erhöht oder reduziert, wurden.

Unter dem Begriff „einfache Kohlenstoffquelle“ werden im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Kohlenstoffquellen verstanden, bei denen im Kohlenstoffgerüst mindestens eine C-C-Bindung aufgebrochen und/oder mindestens ein Kohlenstoffatom der einfachen Kohlenstoffquelle mit mindestens einem Kohlenstoffatom eines anderen Moleküls mindestens eine neue Bindung ausbilden muss, um zu dem Kohlenstoffgerüst der „mehr gebildeten organischen Substanz“ zu gelangen.

Unter dem Begriff „alkL-Genprodukt“ werden im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Proteine verstanden, die mindestens eine der nachfolgenden beiden Bedingungen erfüllen:

1.) Das Protein wird als ein Mitglied der Superfamilie der OmpW-Proteine (Proteinfamilie 3922 in der „Conserved Domain Database“ (CDD) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI)) identifiziert, wobei diese Zuordnung durch ein Alignment der Aminosäuresequenz des Proteins mit den in der CDD des NCBI vorhandenen

Datenbankeinträgen, die bis zum 22.03.2010 hinterlegt wurden, unter Nutzung der Standardsuchparameter, einem E-Wert (englisch „e-value“) kleiner 0,01 und unter Verwendung des Algorithmus „blastp 2.2.23+“, erfolgt,

2.) bei einer Suche nach in der betreffenden Aminosäuresequenz enthaltenen konservierten Proteindomänen in der NCBI CDD (Version 2.20) mittels RPS-BLAST wird die Präsenz der konservierten Domäne „OmpW, Outer membrane protein W“ (COG3047) mit einem E-Wert (englisch „e-value“) kleiner 1×10^{-5} festgestellt (englisch „domain hit“).

Bevorzugte organische Substanzen der vorliegenden Erfindung stellen solche dar, die über mehr als ein, insbesondere 3 bis 36, bevorzugt 6 bis 24, insbesondere 10 bis 18

Kohlenstoffatome aufweisen. Die organischen Substanzen können linear, verzweigt, gesättigt oder ungesättigt und gegebenenfalls mit anderen Gruppen substituiert sein.

- 4 -

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die organische Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, bevorzugt bestehend aus,

Carbonsäuren, insbesondere mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18, Kohlenstoffatomen,

- 5 Carbonsäureester, insbesondere mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18, Kohlenstoffatomen im Carbonsäureanteil, bei denen die Alkoholkomponente sich ableitet von Methanol, Ethanol oder anderen primären Alkoholen mit 3 – 18 Kohlenstoffatomen, insbesondere von Methanol und Ethanol,

Alkane mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18,

- 10 Kohlenstoffatomen,

Alkene mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18,

Kohlenstoffatomen,

einwertige Alkohole mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18,

Kohlenstoffatomen,

- 15 Aldehyde mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18,

Kohlenstoffatomen,

einwertige Amine mit 3 bis 34, bevorzugt mit 6 bis 22, besonders bevorzugt mit 6 bis 18,

Kohlenstoffatomen,

sowie substituierte Verbindungen der vorgenannten Gruppenmitglieder, die insbesondere als

- 20 weitere Substituenten einen oder mehrer Hydroxy-, Amin-, Keto-, Carboxyl-, Methyl-, Ethyl-, Cyclopropyl- oder Epoxy-Funktionen tragen, wobei unsubstituierte bevorzugt sind.

Besonders bevorzugt sind die organischen Substanzen Fettsäuren, Fettsäureester, Alkan-1-ale, Alkan-1-ole und Alkan-1-amine, Alkane und Alkene, insbesondere 1-Alkene, wobei die Ester bei den vorgenannten Verbindungen bevorzugt solche sind, bei denen die Alkoholkomponente sich
25 ableitet von Methanol, Ethanol oder anderen primären Alkoholen mit 3 – 18 Kohlenstoffatomen, insbesondere von Methanol und Ethanol.

Besonders bevorzugt sind die organischen Substanzen ausgewählt aus Fettsäuren und Fettsäureester, bei denen die Fettsäurekomponente ausgewählt ist aus der Gruppe Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure,

- 30 Önanthsäure, Caprylsäure, Pelargonsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Pentadecansäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Nonadecansäure, Arachinsäure, Behensäure, Lignocerinsäure, Cerotinsäure, Montansäure, Melissinsäure,

Undecylensäure, Myristoleinsäure, Palmitoleinsäure, Petroselinensäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Vaccensäure, Gadoleinsäure, Icosensäure, Cetoleinsäure, Erucasäure, Nervensäure, Pelargonsäure, Linolsäure, α -Linolensäure, γ -Linolensäure, Calendulasäure, Punicinsäure, α -Elaeostearinsäure, β -Elaeostearinsäure, Arachidonsäure, Timnodonsäure, Clupanodonsäure, 5 Cervonsäure, Vernolsäure, Ricinolsäure

sowie

deren Derivate in Form von korrespondierenden Alkan-1-alen, Alkan-1-olen, Alkan-1-aminen bzw. im Fall von ungesättigten Fettsäuren, wie etwa Palmitoleinsäure, Ölsäure, Linolsäure, α -Linolensäure, γ -Linolensäure auch Alken-1-alen, Alken-1-olen, Alken-1-aminen, durch 10 enzymatische Reduktion und Decarbonylierung von vorgenannten Fettsäuren hergestellte Alkane und Alkene sowie durch enzymatische Decarboxylierung von vorgenannten Fettsäuren hergestellte Alkene, insbesondere 1-Alkene, ggf. mit weiteren, nicht-terminalen Doppelbindungen.

Unter dem Begriff „korrespondierende Alkan/Alken-1-Verbindungen“ ist in diesem

15 Zusammenhang zu verstehen, dass die Carboxylgruppe der betrachteten Fettsäure durch ein -COH, ein -CH₂OH oder ein -CH₂NH₂ ersetzt ist.

Werden im Folgenden Enzymaktivitäten im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung beschrieben, die Reaktionen katalysieren, an denen direkt oder indirekt Alkansäuren, Alkan-1-ale, Alkan-1-ole oder Alkan-1-amine beteiligt sind, so ist davon auszugehen, dass Alkansäuren, 20 Alkan-1-ale, Alkan-1-ole oder Alkan-1-amine, die zusätzlich eine oder mehrere, nicht terminale, Doppelbindungen besitzen, in der Regel bei der angegebenen Enzymaktivität miterfasst sind.

Als Kohlenstoffquelle können Kohlehydrate wie z. B. Glukose, Saccharose, Arabinose, Xylose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose und Hemicellulose, aber auch Glycerin 25 oder einfachste organische Moleküle wie CO₂, CO oder Synthesegas eingesetzt werden.

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass aufgrund der guten genetischen Zugänglichkeit Mikroorganismen eingesetzt werden; ausgewählt aus der Gruppe der Bakterien, besonders aus der Gruppe enthaltend, bevorzugt bestehend aus, , *Magnetococcus*, *Mariprofundus*, 30 *Acetobacter*, *Acidiphilium*, *Afipia*, *Ahrensia*, *Asticcacaulis*, *Aurantimonas*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Bartonella*, *tribocorum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *subvibrioides*, *Brucella*, *Caulobacter*, *Chelativorans*, *Citricella*, *Citromicrobium*,

- Dinoroseobacter, Erythrobacter, Fulvimarina, Gluconacetobacter, Granulibacter, Hirschia, Hoeflea, Hyphomicrobium, Hyphomonas, Ketogulonicigenium, Labrenzia, Loktanella, Magnetospirillum, Maricaulis, Maritimibacter, Mesorhizobium, Methylobacterium, Methylocystis, Methylosinus, Nitrobacter, Novosphingobium, Oceanibulbus, Oceanicaulis, Oceanicola,*
- 5 *Ochrobactrum, Octadecabacter, Oligotropha, Paracoccus, Parvibaculum, Parvularcula, Pelagibaca, Phaeobacter, Phenyllobacterium, Polymorphum, Pseudovibrio, Rhodobacter, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Roseibium, Roseobacter, Roseomonas, Roseovarius, Ruegeria, Sagittula, Silicibacter, Sphingobium, Sphingomonas, Sphingopyxis, Starkeya, Sulfitobacter, Thalassiobium, Xanthobacter, Zymomonas,*
- 10 *Agrobacterium, Rhizobium, Sinorhizobium, Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia, Orientia, Rickettsia, Wolbachia, Bordetella, Burkholderia, Cupriavidus, taiwanensis, Lautropia, Limnobacter, Polynucleobacter, Ralstonia, Chromobacterium, Eikenella, corrodens, Basfia, Kingella, Laribacter, Lutiella, Neisseria, Simonsiella, Achromobacter, Acidovorax, Alicyclophilus, Aromatoleum, Azoarcus, Comamonas, Dechloromonas, Delftia, Gallionella, Herbaspirillum,*
- 15 *Herminiimonas, Hylemonella, Janthinobacterium, Leptothrix, Methylibium, Methylobacillus, Methylophilales, Methyloversatilis, Methylovorus, Nitrosomonas, Nitrosospora, Oxalobacter, Parasutterella, Polaromonas, Polaromonas, Pusillimonas, Rhodoferax, Rubrivivax, Sideroxydans, Sutterella, wadsworthensis, Taylorella, Thauera, Thiobacillus, Thiomonas, Variovorax, Verminephrobacter, Anaeromyxobacter, Bdellovibrio, bacteriovorus, Bilophila,*
- 20 *Desulfarculus, Desulfatibacillum, Desulfobacca, Desulfobacterium, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfohalobium, Desulfitobacterium, Desulfomicrobium, Desulfonatronospira, Desulfotalea, Desulfovibrio, Desulfuromonas, Geobacter, Haliangium, Hippea, Lawsonia, Myxococcus, Pelobacter, Plesiocystis, Sorangium, Stigmatella, Syntrophobacter, Syntrophus, Arcobacter, Caminibacter, Campylobacter, Helicobacter, Nitratifractor, Nitratiruptor,*
- 25 *Sulfuricurvum, Sulfurimonas, Sulfurospirillum, Sulfurovum, Wolinella, Buchnera, Blochmannia, Hamiltonella, Regiella, Riesia, Citrobacter, Cronobacter, Dickeya, Edwardsiella, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Klebsiella, Pantoea, Pectobacterium, Proteus, Providencia, Rahnella, Salmonella, Serratia, Shigella, Sodalis, Wigglesworthia, Glossina, Xenorhabdus, Yersinia, Acidithiobacillus, Acinetobacter, Aeromonas, Alcanivorax, Alkalilimnicola, Allochromatium,*
- 30 *Alteromonadales, Alteromonas, Baumannia, Beggiatoa, Bermanella, Carsonella, Ruthia, Vesicomysocius, Cardiobacterium, Chromohalobacter, Colwellia, Congregibacter, Coxiella, Dichelobacter, Endoriftia, Enhydrobacter, Ferrimonas, Francisella, Glaciecola, Hahella,*

- 7 -

Halomonas, Halorhodospira, Halothiobacillus, Idiomarina, Kangiella, Legionella, Marinobacter, Marinomonas, Methylobacter, Methylococcus, Methylomicrobium, Methylophaga, Moraxella, Moritella, Neptuniibacter, Nitrococcus, Pseudoalteromonas, Psychrobacter, Psychromonas, Reinekea, Rickettsiella, Saccharophagus, Shewanella, Succinatimonas, Teredinibacter,
 5 *Thioalkalimicrobium, Thioalkalivibrio, Thiomicrospira, Tolumonas, Vibrionales, Actinobacillus, Aggregatibacter, Gallibacterium, Haemophilus, Histophilus, Mannheimia, Pasteurella, Azotobacter, Cellvibrio, Pseudomonas, Aliivibrio, Grimontia, Photobacterium, Photobacterium, Vibrio, Pseudoxanthomonas, Stenotrophomonas, Xanthomonas, Xylella, Borrelia, Brachyspira, Leptospira, Spirochaeta, Treponema, Hodgkinia, Puniceispirillum, Liberibacter, Pelagibacter,*
 10 *Odyssella, Accumulibacter,* insbesondere
E. coli, Pseudomonas sp., Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas stutzeri,, Acinetobacter sp., Burkholderia sp., Burkholderia thailandensis, Cyanobakterien, Klebsiella sp., Klebsiella oxytoca, Salmonella sp., Rhizobium sp. und Rhizobium meliloti,
 wobei *E. coli* besonders bevorzugt ist.

15

Bevorzugte in den erfindungsgemäßen Mikroorganismen enthaltene alkL-Genprodukte sind dadurch gekennzeichnet, dass die Produktion des alkL-Genproduktes im nativen Wirt durch Dicyclopropylketon induziert wird; in diesem Zusammenhang ist weiterhin bevorzugt, dass die
 20 Expression des alkL-Gens als Teil einer Gruppe von Genen, beispielsweise in einem Regulon wie etwa einem Operon, stattfindet.

In den erfindungsgemäßen Mikroorganismen enthaltene alkL-Genprodukte werden bevorzugt kodiert von alkL-Genen aus Organismen ausgewählt aus der Gruppe der gram-negativen Bakterien, insbesondere der Gruppe enthaltend, bevorzugt bestehend aus *Pseudomonas sp.,*
 25 *Azotobacter sp., Desulfitobacterium sp., Burkholderia sp.,* bevorzugt *Burkholderia cepacia, Xanthomonas sp., Rhodobacter sp., Ralstonia sp., Delftia sp. und Rickettsia sp., Oceanicaulis sp., Caulobacter sp., Marinobacter sp. und Rhodopseudomonas sp.,* bevorzugt *Pseudomonas putida, Oceanicaulis alexandrii, Marinobacter aquaeolei,* insbesondere *Pseudomonas putida*
 GPo1 und P1, *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633, *Caulobacter sp. K31* und *Marinobacter*
 30 *aquaeolei* VT8.

In diesem Zusammenhang sind ganz besonders bevorzugte alkL-Genprodukte kodiert durch die alkL-Gene aus *Pseudomonas putida* GPo1 und P1, welche wiedergegeben werden durch SEQ

ID NR. 1 und SEQ ID NR. 29, sowie Proteine mit Polypeptidsequenz SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 30, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 oder mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 30, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der jeweiligen Bezugssequenz SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 30, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird. Eine Methode der Wahl zur Bestimmung der Syntheserate ist den Ausführungsbeispielen zu entnehmen.

Für die Definition der Units gilt hier die in der Enzymkinetik übliche Definition: 1 Unit Biokatalysator setzt 1 μmol Substrat in einer Minute zum Produkt um.

1 U = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$

Änderungen von Aminosäureresten einer gegebenen Polypeptidsequenz, die zu keinen wesentlichen Änderungen der Eigenschaften und Funktion des gegebenen Polypeptides führen, sind dem Fachmann bekannt. So können beispielsweise manche Aminosäuren oft problemlos gegeneinander ausgetauscht werden; Beispiele für solche geeigneten Aminosäuresubstitutionen sind: Ala gegen Ser; Arg gegen Lys; Asn gegen Gln oder His; Asp gegen Glu; Cys gegen Ser; Gln gegen Asn; Glu gegen Asp; Gly gegen Pro; His gegen Asn oder Gln; Ile gegen Leu oder Val; Leu gegen Met oder Val; Lys gegen Arg oder Gln oder Glu; Met gegen Leu oder Ile; Phe gegen Met oder Leu oder Tyr; Ser gegen Thr; Thr gegen Ser; Trp gegen Tyr; Tyr gegen Trp oder Phe; Val gegen Ile oder Leu. Ebenso ist bekannt, dass Änderungen besonders am N- oder C-Terminus eines Polypeptides in Form von beispielsweise

Aminosäureinsertionen oder –deletionen oft keinen wesentlichen Einfluss auf die Funktion des Polypeptides ausüben.

5 *Erste gentechnische Modifikation zur Synthese von Carbonsäuren, Carbonsäure-Estern und anderen Carbonsäurederivaten aus einer einfachen Kohlenstoffquelle*

Erfindungsgemäß weisen die Mikroorganismen eine erste gentechnische Modifikation auf, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr organische Substanz, insbesondere Carbonsäuren und Carbonsäurederivate aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen.

Es ist in diesem Zusammenhang erfindungsgemäß bevorzugt, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme handelt, ausgewählt aus der Gruppe

E_i Acyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Thioesterase, bevorzugt der EC 3.1.2.14 oder EC 3.1.2.22, welche die Hydrolyse eines Acyl-Acyl Carrier Protein-Thioesters katalysiert,

E_{ii} Acyl-CoA (Coenzym A)-Thioesterase, bevorzugt der EC 3.1.2.2, EC 3.1.2.18, EC 3.1.2.19, EC 3.1.2.20 oder EC 3.1.2.22, welche die Hydrolyse eines Acyl-Coenzym A-Thioesters katalysiert,

E_{iiib} Acyl-CoA (Coenzym A):ACP (Acyl Carrier Protein)-Transacylase, welche bevorzugt eine Reaktion katalysiert, in der ein CoA-Thioester in einen ACP-Thioester umgewandelt wird,

E_{iii} Polyketidsynthase, welche eine Reaktion katalysiert, die an der Synthese von Carbonsäuren und Carbonsäure-Estern mitwirkt, und

25 E_{iv} Hexansäuresynthase, eine spezialisierte Fettsäuresynthase des FAS-I-Typs, welche die Synthese von Hexansäure aus 2 Molekülen Malonyl-Coenzym A und einem Molekül Acetyl-Coenzym A katalysiert.

Die nun folgenden Ausführungen zur Erhöhung der Enzymaktivität in Zellen gelten sowohl für die Erhöhung der Aktivität des Enzyms E_i bis E_{iv} als auch für alle nachfolgend genannten Enzyme, deren Aktivität gegebenenfalls erhöht werden kann sowie auch für eine erhöhte alkL-Genprodukt Bildung.

Der Begriff „gesteigerte Aktivität eines Enzyms“, wie er vorstehend und in den nachfolgenden Ausführungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist vorzugsweise als gesteigerte intrazelluläre Aktivität zu verstehen; diese Aussage gilt auch für eine erhöhte alkL-Genprodukt Bildung.

- 5 Grundsätzlich lässt sich eine Steigerung der enzymatischen Aktivität dadurch erzielen, dass man die Kopienzahl der Gensequenz bzw. der Gensequenzen erhöht, welche für das Enzym kodieren, einen starken Promotor verwendet, die Kodonnutzung des Gens verändert, auf verschiedene Art und Weise die Halbwertszeit der mRNA oder des Enzyms erhöht, die Regulation der Expression des Gens modifiziert oder ein Gen oder Allel nutzt, das für ein
- 10 entsprechendes Enzym mit einer gesteigerten Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert. Erfindungsgemäß gentechnisch veränderte Mikroorganismen werden beispielsweise durch Transformation, Transduktion, Konjugation oder eine Kombination dieser Methoden mit einem Vektor erzeugt, der das gewünschte Gen, ein Allel dieses Gens oder Teile davon und einen die Expression des Gens ermöglichenden Promotor enthält. Die heterologe
- 15 Expression wird insbesondere durch Integration des Gens oder der Allele in das Chromosom der Zelle oder einen extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt.

Einen Überblick über die Möglichkeiten zur Erhöhung der Enzym-Aktivität in Zellen am Beispiel der Pyruvat-Carboxylase gibt DE-A-100 31 999, die hiermit als Referenz eingeführt wird und deren Offenbarungsgehalt hinsichtlich der Möglichkeiten zur Erhöhung der Enzym-Aktivität in

20 Zellen einen Teil der Offenbarung der vorliegenden Erfindung bildet.

Die Expression der vorstehend und aller nachfolgend genannten Enzyme bzw. Gene ist mit Hilfe von 1- und 2-dimensionaler Proteingelauftrennung und anschließender optischer Identifizierung der Proteinkonzentration mit entsprechender Auswertesoftware im Gel nachweisbar.

- 25 Wenn die Erhöhung einer Enzymaktivität ausschließlich auf einer Erhöhung der Expression des entsprechenden Gens basiert, so kann die Quantifizierung der Erhöhung der Enzymaktivität in einfacher Weise durch einen Vergleich der 1- oder 2-dimensionalen Proteinauftrennungen zwischen Wildtyp und gentechnisch veränderter Zelle bestimmt werden. Eine gebräuchliche Methode zur Präparation der Proteingele bei Bakterien und zur Identifizierung der Proteine ist
- 30 die von Hermann et al. (Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001)) beschriebene Vorgehensweise. Die Proteinkonzentration kann ebenfalls durch Western-Blot-Hybridisierung mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Sambrook et al., Molecular Cloning: a

laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989) und anschließende optische Auswertung mit entsprechender Software zur Konzentrationsbestimmung (Lohaus und Meyer (1989) Biospektrum, 5: 32-39; Lottspeich (1999), Angewandte Chemie 111: 2630-2647) analysiert werden.

- 5 Diese Methode bietet sich auch immer dann an, wenn mögliche Produkte der durch die zu bestimmende Enzymaktivität katalysierten Reaktion im Mikroorganismus schnell verstoffwechselt werden können oder aber die Aktivität im Wildtyp selber zu gering ist, um die zu bestimmende Enzymaktivität anhand der Produktbildung ausreichend bestimmen zu können. Mit den oben beschriebenen Methoden ist ebenfalls festzustellen, ob ein betrachteter
- 10 Mikroorganismus verglichen zu seinem Wildtyp mehr alkL-Genprodukt bildet.

Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung angeführten Accession-Nummern entsprechen den ProteinBank Datenbank-Einträgen des NCBI mit Datum vom 26.07.2011; in der Regel wird vorliegend die Versionsnummer des Eintrages durch „Ziffer“ wie beispielsweise

15 „.1“, kenntlich gemacht.

Bestimmte Enzyme E_i

- 20 Die durch E_i katalysierte Reaktion unterscheidet sich von der durch E_{ii} katalysierten lediglich dadurch, dass anstelle eines Acyl-Acyl Carrier Protein-Thioesters ein Acyl-Coenzym A-Thioester hydrolysiert wird. Es ist offenbar, dass viele der genannten Enzyme E_i sich aufgrund signifikanter Nebenaktivität ebenfalls als E_{ii} einsetzen lassen werden, wie auch umgekehrt.
- 25 In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_i eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:
- AAC72881.1, ABB71579.1, CAC19934.1, AAC49180.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 10), AAC49783.1, AAC49179.1, CAB60830.1, ABB71581.1, AAC49269.1, CAC19933.1, CAA54060.1, AAC72882.1, Q39513.1, AAC49784.1, ABO38558.1, ABO38555.1, ABO38556.1,
- 30 ABO38554.1, ADB79568.1, ADB79569.1, ACQ57188.1, ACQ57189.1, ABK96561.1, ACQ63293.1, ACQ57190.1, Q9SQI3.1, ABU96744.1, ABC47311.1, XP_002324962.1, AAD01982.1, AAB51525.1, ACV40757.1, XP_002309244.1, CBI28125.3, ABD91726.1,

- 12 -

XP_002284850.1, XP_002309243.1, XP_002515564.1, ACR56792.1, ACR56793.1,
 XP_002892461.1, ABI18986.1, NP_172327.1, CAA85387.1, CAA85388.1, ADA79524.1,
 ACR56795.1, ACR56794.1, CAN81819.1, ACF17654.1, AAB71729.1, ABH11710.1,
 ACQ57187.1, AAX51637.1, AAB88824.1, AAQ08202.1, AAB71731.1, AAX51636.1,
 5 CAC80370.1, CAC80371.1, AAG43858.1, ABD83939.1, AAD42220.2, AAG43860.1,
 AAG43861.1, AAG43857.1, AAL15645.1, AAB71730.1, NP_001068400.1, EAY86877.1,
 NP_001056776.1, XP_002436457.1, NP_001149963.1, ACN27901.1, EAY99617.1,
 ABL85052.1, XP_002437226.1, NP_001151366.1, ACF88154.1, NP_001147887.1,
 XP_002453522.1, BAJ99650.1, EAZ37535.1, EAZ01545.1, AAN17328.1, EAY86884.1,
 10 EEE57469.1, Q41635.1, AAM09524.1, Q39473.1, NP_001057985.1, AAC49001.1,
 XP_001752161.1, XP_001770108.1, XP_001784994.1, XP_002318751.1, NP_001047567.1,
 XP_002322277.1, XP_002299627.1, XP_002511148.1, CBI15695.3, XP_002299629.1,
 XP_002280321.1, CAN60643.1, XP_002459731.1, XP_002975500.1, XP_002962077.1,
 XP_001773771.1, NP_001151014.1, XP_002317894.1, XP_002971008.1, XP_001774723.1,
 15 XP_002280147.1, XP_002526311.1, XP_002517525.1, XP_001764527.1, ABI20759.1,
 BAD73184.1, XP_002987091.1, XP_002985480.1, CBI26947.3, ABI20760.1, XP_002303055.1,
 XP_002885681.1, ADH03021.1, XP_002532744.1, EAY74210.1, EEC84846.1, EEE54649.1,
 AAG35064.1, AAC49002.1, CAD32683.1, ACF78226.1, BAJ96402.1, XP_002462626.1,
 NP_001130099.1, XP_002462625.1, ABX82799.3, Q42712.1, NP_193041.1, AAB51524.1,
 20 NP_189147.1, ABR18461.1, XP_002863277.1, AAC72883.1, AAA33019.1, CBI40881.3,
 XP_002262721.1, AAB51523.1, NP_001063601.1, ADB79567.1, AAL77443.1, AAL77445.1,
 AAQ08223.1, AAL79361.1, CAA52070.1, AAA33020.1, CAA52069.1, XP_001785304.1,
 CAC39106.1, XP_002992591.1, XP_002968049.1, XP_001770737.1, XP_001752563.1,
 AAG43859.1, XP_002978911.1, XP_002977790.1, ACB29661.1, XP_002314829.1,
 25 XP_002991471.1, EAZ45287.1, XP_002986974.1, EEC73687.1, XP_002312421.1,
 ACJ84621.1, NP_001150707.1, AAD28187.1, XP_001759159.1, XP_001757193.1,
 XP_002322077.1, ABE01139.1, XP_002447294.1, AAX54515.1, AAD33870.1, AEM72521.1
 insbesondere
 AAC72881.1, ABB71579.1, CAC19934.1, AAC49180.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 10),
 30 AAC49783.1, AAC49179.1, CAB60830.1, ABB71581.1, AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID
 NR: 8), CAC19933.1, CAA54060.1, AAC72882.1, Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9),

AAC49784.1, AAC72883.1, Q41635.1, AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37),
AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35)

sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
5 bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste
gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
10 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
15 des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP–Thioester
verstanden wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im
folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung erste
20 gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit der zweiten
gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen
Modifikation im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2010063031 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0007] bis [0008], [0092]
bis [0100], [0135] bis [0136], [0181] bis [0186] und [0204] bis [0213] sowie den
25 Ausführungsbeispielen 4 bis 8 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die
eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr
mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die
Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen in
insbesondere den Abschnitten [0012] bis [0013], [0155], [0160] bis [0163], [0185] bis [0190] und
30 [0197] bis [0199], Abbildung 12, den Ausführungsbeispielen 4 bis 8 sowie Tabelle 3.

Die WO2010063032 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0007] bis [0008], [0092]
bis [0100], [0135] bis [0136], [0181] bis [0186] und [0204] bis [0213], den Ausführungsbeispielen

4 bis 8 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen in insbesondere den

5 Abschnitten [0012] bis [0013], [0155], [0160] bis [0163], [0185] bis [0190] und [0197] bis [0199], Abbildung 12, den Ausführungsbeispielen 4 bis 8 sowie Tabelle 3.

Die WO2011003034 A2 beschreibt insbesondere auf Seite 3, zweiter Abschnitt, bis Seite 7, erster Abschnitt, Seite 20, zweiter Abschnitt, bis Seite 22, zweiter Abschnitt, und auf Seite 156 bis Seite 166, fünfter Abschnitt, sowie in den Ansprüchen 1 bis 100 erfindungsgemäß bevorzugt
10 eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Adipinsäure, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere auf Seite 35, dritter Abschnitt, und Seite 36, erster Abschnitt.

15 Die WO2011008565 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0018] bis [0024] sowie [0086] bis [0102] und den Ausführungsbeispielen 2, 4, 7, 9 und 10 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren, Alkan-1-ale, Alkan-1-ole, Alkane und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen
20 Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen in insbesondere den Abschnitten [0009] bis [0018] und [0073] bis [0082], Abbildungen 1 bis 3 und 7, Tabelle 4, den Ausführungsbeispielen 1 bis 10 sowie den Ansprüchen 1 bis 5 und 11 bis 13.

Die WO2009076559 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0013] bis [0051] und
25 [0064] bis [00111] sowie den Ansprüchen 1 bis 10 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren, Alkan-1-ole, Alkane oder Alkene, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen in
30 insbesondere Tabelle 1, den Abschnitten [0021], [0024] bis [0030] und [0064] bis [00111] sowie Abbildung 6.

Die WO2010017245 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0011] bis [0015] und [00114] bis [00134], dem Ausführungsbeispiel 3 sowie den Ansprüchen 1 bis 2 und 9 bis 11 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und

- 5 Fettsäurederivate aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen in insbesondere Tabellen 1, 2 und 3, den Abschnitten [0080] bis [00112] sowie den Ansprüchen 3 bis 8.

- Die WO2010127318 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 1 bis 9 und 11 bis 16, den
10 Ausführungsbeispielen 1, 2 und 4, den Abbildungen 1A bis 1E sowie den Ansprüchen 23 bis 43, 62 bis 79 und 101 bis 120 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Biodiesel-Äquivalente und andere Fettsäurederivate, vor allem Fettsäureethylester, Fettsäure-Ester, Wachsester, Alkan-1-ole und
15 Alkan-1-ale, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen auf insbesondere Seiten 17, 19 bis 23.

- Die WO2008100251 A1 beschreibt insbesondere auf den Seiten 4 bis 7 und 45 bis 46, den Abbildungen 1A bis 1E sowie den Ansprüchen 9 bis 13 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte
20 Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen auf insbesondere Seiten 4 bis 5 und 45 bis 46.

- 25 Die WO2007136762 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 2 bis 4 und 17 bis 18, der Tabelle 7, den Abbildungen 2 bis 4, den Ausführungsbeispielen 2 bis 8 sowie den Ansprüchen 13 und 35 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester,
30 Kohlenwasserstoffe und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und

deren Sequenzen insbesondere auf den Seiten 17 bis 18, in den Tabellen 1, 7, 8 und 10 sowie der Abbildung 10.

Die WO2008113041 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 35 bis 41 und 64 bis 67, der Abbildung 2, den Ausführungsbeispielen 6 und 10 sowie den Ansprüchen 7 und 36

5 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester, Kohlenwasserstoffe, aliphatische Ketone und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen
10 insbesondere in Abbildung 7 und den Ausführungsbeispielen 6 und 10.

Die WO2010126891 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0034] bis [0091], [0195] bis [0222] und [0245] bis [0250], den Abbildungen 3 bis 5 und den Ausführungsbeispielen 1 bis 5 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und
15 Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0245] bis [0250], der Tabelle 1 und den Ausführungsbeispielen 1 bis 5.

Die WO2010118410 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0022] bis [0043], [0158] bis [0197], den Abbildungen 1 bis 4, den Ausführungsbeispielen 3 und 5 bis 8 sowie den
20 Ansprüchen 1 bis 53 und 82 bis 100 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester und Wachsester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch
25 erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0158] bis [0197], der Tabelle 1, den Abbildungen 3 und 4 und den Ausführungsbeispielen 3 sowie 5 bis 8.

Die WO2010118409 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0134] bis [0154], den Abbildungen 1 bis 3 sowie 6 und dem Ausführungsbeispiel 3 erfindungsgemäß bevorzugt
30 eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester und Wachsester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen.

Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0134] bis [0154], den Abbildungen 3 und 6 und dem Ausführungsbeispiel 3.

Die WO2010075483 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0061] bis [0090], und
5 [0287] bis [0367], den Abbildungen 1, 4 und 5, den Ausführungsbeispielen 1 bis 38 sowie den Ansprüchen 18 bis 26 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren, Fettsäuremethylester, Fettsäureethylester, Alkan-1-ole, Fettalkyl-Acetate, Alkan-1-ale, Fettamine, Fettamide,
10 Fettsulfate, Fettether, Ketone, Alkane, interne und terminale Olefine, Dicarbonsäuren, α,ω -Dicarbonsäuren und α,ω -Diole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0012] bis [0060], den Tabellen 7, 17, 26 und 27, den Abbildungen 1, 44 bis 47 und 55 bis 59, den Ausführungsbeispielen 1 bis 38 sowie den
15 Ansprüchen 1 bis 17.

Die WO2010062480 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0022] bis [0174] und [0296] bis [0330], den Ausführungsbeispielen 3 und 5 bis 8 sowie den Ansprüchen 17 und 24 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und
20 Fettsäurederivate, insbesondere Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0022] bis [0174], der Tabelle 1, sowie den Ausführungsbeispielen 3 und 5 bis 8.

Die WO2010042664 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0022] bis [0143] und
25 [0241] bis [0275], dem Ausführungsbeispiel 2 sowie den Ansprüchen 3 und 9 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Alkan-1-ale, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere
30 in der Tabelle 1, der Abbildung 5 und dem Ausführungsbeispiel 2.

Die WO2011008535 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0024] bis [0032], und [0138] bis [0158] sowie der Abbildung 13 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte

Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Carbonsäuren, Hydroxy-Carbonsäuren und deren Lactone aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen.

- 5 Die WO2010022090 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0022] bis [0143] und [0238] bis [0275], den Abbildungen 3 bis 5, dem Ausführungsbeispiel 2 sowie den Ansprüchen 5, 15, 16 und 36 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester und Wachsester, aus
10 mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in der Tabelle 1, der Abbildung 6 und dem Ausführungsbeispiel 2.

- Die WO2009140695 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0214] bis [0248] und den Ausführungsbeispielen 22 bis 24 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die
15 eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Kohlenwasserstoffe, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in Tabelle 1, der Abbildung 40 und den Ausführungsbeispielen 22 bis 24.

- 20 Die WO2010021711 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0009] bis [0020] und [0257] bis [0317], den Abbildungen 3 bis 5 und 19, den Ausführungsbeispielen 2 bis 24 sowie den Ansprüchen 4, 5 und 30 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester und Wachsester, aus
25 mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere in Tabelle 3, der Abbildung 6 und den Ausführungsbeispielen 2 bis 24.

- Die WO2009085278 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0188] bis [0192] und Abbildung 10 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste
30 gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Olefine, aus mindestens einer einfachen

Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in der Tabelle 1 und der Abbildung 10.

Die WO2011019858 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0023], [0064] bis [0074] und [0091] bis [0099], den Ausführungsbeispielen 1 bis 13, der Abbildung 1 und dem Anspruch

5 8 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0085] bis [0090], den

10 Ausführungsbeispielen 1 bis 13 und Tabelle 1.

Die WO2009009391 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0010] bis [0019] und [0191] bis [0299], den Abbildungen 3 bis 5, den Ausführungsbeispielen 2, 4 bis 6, 9 bis 14, 17 und 19 sowie den Ansprüchen 16, 39, 44 und 55 bis 59 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie

15 verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0010] bis [0019] und [0191] bis [0299], der Abbildung 9 sowie den Ausführungsbeispielen 2, 4 bis 6, 9 bis 14, 17 und 19.

20 Die WO2008151149 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0009], [0015] bis [0033], [0053], [0071], [0174] bis [0191], [0274] und [0396], den Ansprüchen 53 bis 114, 188 bis 206 und 344 bis 355 sowie den Tabellen 1 bis 3 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu

25 bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen in insbesondere Tabelle 5.

Die WO2008147781 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0147] bis [0156], den Ausführungsbeispielen 1 bis 3, 8, 9 und 14 sowie den Ansprüchen 65 bis 71 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen,

30 so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Kohlenwasserstoffe, Olefine und aliphatische Ketone, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte

Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Ausführungsbeispielen 1 bis 3, 8, 9 und 14.

Die WO2008119082 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 3 bis 5, 8 bis 10 und 40 bis 77, in den Abbildungen 4 und 5, den Ausführungsbeispielen 2 bis 5 und 8 bis 18 sowie den

5 Ansprüchen 3 bis 39 und 152 bis 153 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester, Triglyceride, Biodiesel, Gasolin, Flugzeugtreibstoff und Alkan-1-ole aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch
10 erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in der Tabelle 1, der Abbildung 1, den Ausführungsbeispielen 2 bis 5 und 8 bis 18 sowie den Ansprüchen 124 bis 134 und 138 bis 141.

Die WO2010135624 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0067] bis [0083], und [0095] bis [0098] erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste
15 gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0067] bis [0083] und [0095] bis [0098].

20 Zheng Z, Gong Q, Liu T, Deng Y, Chen JC und Chen GQ. (Thioesterase II of *Escherichia coli* plays an important role in 3-hydroxydecanoic acid production. Appl Environ Microbiol. 2004. 70(7):3807-13) beschreiben insbesondere auf den Seiten 3808 bis 3810 und 3012 sowie Tabelle 1, 3 und 4 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr
25 Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen auf insbesondere den Seiten 3807 und in der Tabelle 2.

Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre SB und Keasling
30 JD (*Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass*. Nature. 2010. 463(7280):559-62) beschreiben insbesondere auf S.559, dritter Absatz, bis S.559, erster Absatz, erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste

gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere in der

5 Supplementären Tabelle 1.

Lennen RM, Braden DJ, West RA, Dumesic JA und Pfleger BF (*A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in Escherichia coli and catalytic conversion to alkanes*. Biotechnol Bioeng. 2010. 106(2):193-202) beschreiben insbesondere in S.193, erster Absatz, S.194, erster und zweiter Absatz, S.195, zweiter Absatz bis S. 197, 10 zweiter Absatz, S.198, zweiter Absatz bis S. 199, dritter Absatz, erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, 15 insbesondere auf S.193, erster Absatz, S.194, erster und zweiter Absatz, S.196, zweiter Absatz, und im Supplementären Material.

Liu T, Vora H und Khosla C. (Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in E. coli. Metab Eng. 2010 Jul;12(4):378-86.) beschreiben insbesondere in den Abschnitten 2.2, und 3.1 sowie in Tabelle 1 und 2 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die 20 eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere in Tabelle 1.

Yuan L, Voelker TA und Hawkins DJ. (*Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov 25 7;92(23):10639-43) beschreiben insbesondere auf S. 10641, vierter Absatz, sowie in Abbildung 2 und Tabelle 1 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus 30 mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere auf S.10639

erster Absatz, S. 10640, zweiter, dritter und letzter Absatz, S. 10641, zweiter und dritter Absatz, sowie in Abbildung 1 und Tabelle 1 und 2.

Lu X, Vora H und Khosla C. (*Overproduction of free fatty acids in E. coli: implications for biodiesel production*. Metab Eng. 2008. 10(6):333-9.) beschreiben insbesondere in S.334,

5 zweiter Absatz, den Abschnitten 2.2, 2.3 und 3 (erster bis vierter Absatz) sowie in Tabelle 1 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß
10 bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere in Abschnitt 2.2.

Liu X, Sheng J und Curtiss III R. (*Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. 108(17):6899-904) beschreiben insbesondere auf S. 6899,

vierter und letzter Absatz, S.6900, erster bis vorletzter Absatz, und in Tabelle S1 der „Supporting Information“ erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine
15 erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere auf S. 6899, sechster und letzter Absatz.

20

Bestimmte Enzyme E_{ii}

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im
25 folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung erste gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit der zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

30 Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre SB und Keasling JD (*Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass*. Nature. 2010. 463(7280):559-62) beschreiben insbesondere auf S.559, dritter Absatz, bis S.559, erster

Absatz, erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Carbonsäuren und Carbonsäure-Ester, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch
5 erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere in der Supplementären Tabelle 1.

Lennen RM, Braden DJ, West RA, Dumesic JA und Pfleger BF (*A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in Escherichia coli and catalytic conversion to alkanes*. Biotechnol Bioeng. 2010. 106(2):193-202) beschreiben insbesondere in
10 S.193, erster Absatz, S.194, erster und zweiter Absatz, S.195, zweiter Absatz bis S. 197, zweiter Absatz, S.198, zweiter Absatz bis S. 199, dritter Absatz, erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Carbonsäuren und Carbonsäure-Ester, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden
15 vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere auf S.193, erster Absatz, S.194, erster und zweiter Absatz, S.196, zweiter Absatz, und im Supplementären Material.

Liu T, Vora H und Khosla C. (*Quantitative analysis and engineering of fatty acid biosynthesis in E. coli*. Metab Eng. 2010 Jul;12(4):378-86.) beschreiben insbesondere in den Abschnitten 2.2,
20 und 3.1 sowie in Tabelle 1 und 2 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Carbonsäuren und Carbonsäure-Ester, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere in Tabelle 1.

Yuan L, Voelker TA und Hawkins DJ. (*Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov
25 7;92(23):10639-43) beschreiben insbesondere auf S. 10641, vierter Absatz, sowie in Abbildung 2 und Tabelle 1 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr
30 Carbonsäuren und Carbonsäure-Ester, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere auf S.10639

erster Absatz, S. 10640, zweiter, dritter und letzter Absatz, S. 10641, zweiter und dritter Absatz, sowie in Abbildung 1 und Tabelle 1 und 2.

Lu X, Vora H und Khosla C. (*Overproduction of free fatty acids in E. coli: implications for biodiesel production*. Metab Eng. 2008. 10(6):333-9.) beschreiben insbesondere in S.334,

5 zweiter Absatz, den Abschnitten 2.2, 2.3 und 3 (erster bis vierter Absatz) sowie in Tabelle 1 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Carbonsäuren und Carbonsäure-Ester, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß
10 bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere in Abschnitt 2.2.

Liu X, Sheng J und Curtiss III R. (*Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. 108(17):6899-904) beschreiben insbesondere auf S. 6899,

vierter und letzter Absatz, S.6900, erster bis vorletzter Absatz, und in Tabelle S1 der „Supporting Information“ erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine
15 erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Carbonsäuren und Carbonsäure-Ester, insbesondere Fettsäuren und Fettsäure-Ester, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere auf S. 6899, sechster und letzter Absatz.

20

Bestimmte Enzyme E_{iii}

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im
25 folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung erste gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit der zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2009121066 A1 beschreibt insbesondere in den Ansprüchen 8 bis 14 erfindungsgemäß
30 bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Dicarbonsäuren, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die

- 25 -

Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{iii} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [00026] bis [0054], den Ausführungsbeispielen 1 bis 6, den Abbildungen 4 bis 10 und den Ansprüchen 1 bis 7.

Die WO2009134899 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0079] bis [0082], dem
 5 Ausführungsbeispiel 1 und dem Anspruch 20 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Carbonsäuren, Hydroxy-Carbonsäuren und deren Lactone, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{iii} und
 10 deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0009] bis [0010] und [0044] bis [0078], dem Ausführungsbeispiel 1, den Abbildungen 1 sowie 5 bis 8 und den Ansprüchen 15 bis 17 und 19.

Bestimmte Enzyme E_{iv}

15

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_{iv} eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:

AAS90071.1, XP_002379948.1, AAS90024.1, XP_001821514.2, BAE59512.1, AAL99898.1, AAS90001.1, AAS90049.1, XP_001911518.1, ACH72901.1, XP_681084.1, AAC49198.1,
 20 EFW18013.1, XP_003070494.1, XP_001241401.1, XP_002384449.1, XP_001827206.1, XP_002836001.1, XP_001393196.1, XP_660984.1, XP_001395284.1, XP_002148677.1, XP_001827151.2, BAE66018.1, XP_001217254.1, CAK40139.1, XP_001393516.2, XP_002477829.1, XP_002146311.1, XP_002340042.1, XP_002544942.1, CBF87553.1, XP_002149766.1, 2UV8_A, XP_682676.1, CBX98966.1, XP_002560069.1, XP_001273102.1, P15368.1, XP_001273530.1, CBX99714.1, AAB41493.1, XP_001823764.1, XP_001388458.1,
 25 XP_748738.1, EDP53207.1, XP_001259179.1, XP_001825741.2, BAE64608.1, XP_001213437.1, XP_002377327.1, XP_002152724.1, EFZ04065.1, XP_001792784.1, EGP89632.1, XP_001407660.1, EFQ31023.1, XP_003040066.1, 2UV9_A, XP_002486436.1, XP_001585982.1, EFY87204.1, XP_002620504.1, XP_003295647.1, EEQ86108.1,
 30 XP_001938586.1, XP_001547465.1, XP_001906653.1, XP_001402457.2, CAK40502.1, XP_002568116.1, XP_003230922.1, XP_001647236.1, XP_385497.1, EGD94294.1, EGE05134.1, XP_002849847.1, XP_003015737.1, EFX06093.1, XP_003019052.1,

EEH03423.1, XP_001942351.1, EGC45478.1, XP_002556020.1, XP_003011025.1,
CAY86729.1, EDN60916.1, EGA84463.1, EGA56454.1, EEU05652.1, NP_015093.1,
XP_003231214.1, XP_445956.1, EGA60201.1, XP_003349949.1, XP_003070417.1,
XP_001241314.1, EGR48038.1, XP_002615278.1, EFW15042.1, EGO59647.1, XP_452914.1,
5 XP_962466.1, XP_001537327.1, XP_002796517.1, XP_003305240.1, XP_002543037.1,
XP_002499262.1, NP_985412.2, XP_003019770.1, EFW96269.1, XP_002843350.1,
EEH43965.1, XP_457388.1, XP_001799391.1, EEH21370.1, BAD08376.1, XP_001486434.1,
BAF79876.1, EFY90998.1, XP_001939431.1, EER44845.1, EFZ02060.1, XP_001386834.2,
XP_501096.1, XP_003299758.1, XP_002419391.1, XP_002490414.1, ACZ66251.1,
10 XP_002548204.1, P43098.1, XP_002176039.1, XP_002479407.1, EEQ44526.1, AAA34601.1,
XP_001791764.1, XP_003009337.1, BAA11913.1, NP_593823.1, BAB62031.1, BAB62032.1,
BAB62030.1, 2PFF_A, XP_380212.1, ADN94478.1, EGF83443.1, XP_681149.1, EGG00662.1,
ADN94479.1, ABC94883.1, XP_571099.1, EFY94095.1, EFW39589.1, XP_003194430.1,
XP_003031600.1, XP_001836417.1, XP_001880844.1, XP_762607.1, EGN98830.1,
15 EGO24420.1, ACD87451.1, XP_003328630.1, XP_002997955.1, CCA25392.1,
XP_002901724.1, EFY86381.1, XP_002901728.1, ADN97213.1, XP_759118.1,
XP_003325251.1, XP_003169619.1, XP_002555446.1, ABJ98780.1, XP_723161.1,
EDZ68993.1, XP_001526334.1, XP_001223165.1, YP_889015.1, AAO43178.1,
YP_001702252.1, XP_003026305.1, YP_003659808.1, ZP_08155637.1, ZP_04749666.1,
20 ZP_08022190.1, YP_004007770.1, YP_954908.1, YP_004522637.1, YP_640811.1,
ZP_04448562.1, NP_301868.1, ZP_06851996.1, YP_003273140.1, YP_001071929.1,
YP_001133797.1, YP_004076455.1, YP_701403.1, ZP_03324816.1, YP_002778327.1,
ZP_02028077.1, YP_909119.1, YP_880884.1, YP_002767320.1, NP_961266.1,
ZP_07457010.1, ZP_08206945.1, ZP_02917151.1, ZP_04387794.1, YP_003359863.1,
25 EGO39886.1, ABE96385.1, ZP_05228143.1, ZP_06522069.1, EGL13180.1, ZP_06976698.1,
YP_001852225.1, ZP_06596502.1, YP_907384.1, ZP_06518033.1, AEF27803.1,
YP_003374392.1, ZP_07485570.1, NP_217040.1, ZP_03742148.1, NP_856198.1,
YP_004724192.1, NP_337093.1, AEJ51135.1, ZP_05765008.1, YP_004745991.1,
AEJ47516.1, ZP_06927266.1, ZP_03646962.1, AEF31807.1, YP_003939358.1,
30 YP_003971698.1, YP_003986333.1, ZP_05750911.1, ADD61451.1, ZP_07942485.1,
YP_004209716.1, YP_004221489.1, AEI96705.1, NP_696693.1, AEG82252.1,
YP_004001156.1, ZP_03976473.1, ZP_04663991.1, ZP_00121397.1, YP_003662064.1,

- 27 -

YP_003646283.1, YP_004630447.1, YP_002323720.1, YP_002835610.1, YP_117466.1,
ZP_02963252.1, ADC85342.1, NP_940183.1, NP_739002.1, ZP_06755645.1, ADL21513.1,
YP_003784047.1, ADL11108.1, ZP_06608499.1, ZP_07967121.1, ZP_05966223.1,
ZP_08682531.1, ZP_03918327.1, ZP_07879655.1, ZP_03972703.1, ZP_06162645.1,
5 ZP_06837277.1, ZP_07990916.1, ZP_03394081.1, CAA46024.1, YP_004760934.1,
ZP_06751771.1, ZP_03934033.1, NP_601696.1, BAB99888.1, YP_001139316.1,
ZP_03926457.1, NP_737523.1, ZP_02044858.1, ZP_07404023.1, ZP_03709883.1,
XP_002388648.1, ZP_07402466.1, ZP_03710807.1, ZP_08294093.1, ZP_08232611.1,
XP_682514.1, ZP_06837028.1, YP_001137826.1, CAA61087.1, ZP_06043461.1,
10 YP_002833817.1, YP_225128.1, NP_600065.1, ABU23831.1, ZP_07716892.1,
ZP_03935133.1, ZP_02549600.1, ZP_05215994.1, YP_004494858.1, XP_001526333.1,
AAS90085.1, XP_002379947.1, AAS90025.1, XP_001821515.1, AAL99899.1, AAS90002.1,
AAS90050.1, XP_001911517.1, ACH72900.1, XP_681083.1, AAC49199.1, XP_003070495.1,
XP_001241402.1, EFW18012.1, CBX98970.1, EEH03422.1, EEQ86107.1, EGC45479.1,
15 XP_002620503.1, XP_001537328.1, XP_002796516.1, 2UVA_G, EEH43966.1, DAA05950.1,
EGR47893.1, XP_003070418.1, XP_001241316.1, XP_001827193.1, XP_002384436.1,
XP_682677.1, XP_002486435.1, EGP88608.1, EDP53206.1, XP_001259180.1, EEH21369.1,
XP_002543038.1, XP_748739.1, XP_003015735.1, EGE05135.1, XP_002152723.1,
XP_002560068.1, XP_001273529.1, XP_003230923.1, EFX05327.1, XP_003019051.1,
20 XP_001585981.1, XP_361644.2, XP_001223166.1, XP_003349948.1, XP_002380737.1,
AAB41494.1, XP_001823765.1, XP_962465.1, EGO59648.1, XP_001906652.1,
XP_003039864.1, XP_001213436.1, XP_385498.1, XP_003295646.1, EFQ31022.1,
XP_002849848.1, XP_002148679.1, CBX99715.1, XP_002149767.1, EFY87205.1,
EFZ04064.1, XP_002340041.1, EGD94295.1, XP_001938587.1, CAK45758.1,
25 XP_001792785.1, XP_001393189.2, XP_003169620.1, XP_001547461.1, XP_001217253.1,
XP_001939430.1, BAA92930.1, Q92215.1, EDK38075.2, EFW97345.1, XP_002495511.1,
XP_451653.1, XP_500912.1, CAA42211.1, XP_001486502.1, XP_002477835.1, XP_445436.1,
NP_594370.1, XP_001827152.2, BAE66019.1, BAA36384.1, BAB62141.1, XP_003299759.1,
XP_002553365.1, XP_002489642.1, 2UV8_G, XP_457311.1, CAY80909.1, XP_001395285.1,
30 EGA61562.1, EDN60099.1, EDV12927.1, NP_012739.1, XP_002616181.1, XP_002420328.1,
XP_001524822.1, XP_002550943.1, XP_001386364.2, NP_984945.2, 227846, AAB59310.1,
XP_001646561.1, XP_716877.1, XP_001836417.1, XP_002146312.1, P34731.1, EGO24420.1,

XP_002544941.1, EFZ02054.1, XP_002175228.1, XP_001393490.2, XP_003031600.1,
 XP_002479408.1, XP_002568119.1, XP_001825735.2, XP_002377320.1, EGN98830.1,
 ACD87451.1, XP_001880844.1, XP_571100.1, ABC94882.1, XP_775164.1, BAE64602.1,
 EFY90992.1, XP_003194424.1, XP_001273103.1, XP_681142.1, XP_003011020.1,
 5 AAA34602.1, XP_003231209.1, XP_003019765.1, ADN94478.1, EEQ46070.1,
 XP_001799393.1, CAK40504.1, AAM75418.1, ADN94479.1, XP_002843356.1, CAA27616.1,
 XP_380213.1, ADN97213.1, XP_759118.1, XP_762607.1, CAK49094.1, EER44843.1,
 XP_003009335.1, XP_002997955.1, XP_002901724.1, CCA25392.1, CAK36856.1,
 XP_001388457.2, ABO37974.1, ABJ98780.1, XP_660985.1, EDZ71063.1, XP_001402459.2,
 10 XP_001791765.1, XP_003324647.1, EGG10429.1, EFW15039.1, XP_002384390.1,
 XP_003031976.1, EDZ71062.1, EFW39589.1, ACZ80683.1, XP_002901728.1,
 XP_003328630.1, XP_681125.1, XP_003325251.1,

sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
 15 bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste
 gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
 20 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
 pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
 25 des Enzyms E_{iv} generell insbesondere die Umsetzung zu Hexansäure aus 2 Molekülen
 Malonyl-Coenzym A und einem Molekül Acetyl-Coenzym A verstanden wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im
 folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung erste
 30 gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit der zweiten
 gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen
 Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2011003034 A2 beschreibt insbesondere in S. 2 bis 3, S. 5 dritter Abschnitt, in den Ausführungsbeispielen 1 bis 4, 7 bis 9 und 12 bis 14 sowie den Ansprüchen 1 bis 100 erfindungsgemäß bevorzugte eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und

5 Fettsäurederivate, insbesondere Hexansäure aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{iv} und deren Sequenzen auf insbesondere S. 5 und im Ausführungsbeispiel 3.

Hitchman TS, Schmidt EW, Trail F, Rarick MD, Linz JE und Townsend CA. (*Hexanoate synthase, a specialized type I fatty acid synthase in aflatoxin B1 biosynthesis*. Bioorg Chem.

10 2001. 29(5):293-307) beschreiben insbesondere auf S. 296, vorletzter Absatz, bis S. 298, zweiter Absatz, erfindungsgemäß bevorzugte eingesetzte Mikroorganismen, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Hexansäure, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte

15 Enzyme E_{iv} und deren Sequenzen in insbesondere S. 299, vierter Absatz, bis S. 302, erster Absatz.

Es kann im Zusammenhang mit der ersten gentechnischen Modifikation förderlich sein, anstelle

20 des Enzyms E_i eine Kombination der Aktivitätserhöhung verglichen zu der des Wildtyps eines Enzyms E_{ii} gepaart mit der eines Enzyms E_{iib} einzusetzen, welches eine Reaktion katalysiert, in der ein CoA-Thioester in einen ACP-Thioester umgewandelt wird.

Entsprechende Enzyme E_{iib} sind als Acyl-CoA (Coenzym A):ACP (Acyl Carrier Protein)-Transacylasen bekannt. Bevorzugte Enzyme E_{iib} sind ausgewählt aus

25 XP_003402554.1, YP_002908243.1, YP_001778804.1, YP_001670627.1, YP_004703658.1, YP_001747923.1, YP_004348703.1, YP_004352505.1, YP_004379169.1, ADR61731.1, YP_001269622.1, YP_001186851.1, YP_004659609.1, YP_003519049.1, YP_001811696.1, YP_004616040.1, NP_252697.1, NP_252169.1, NP_249421.1, ZP_06456665.1, ZP_01167071.1, ZP_08557569.1, ZP_08554397.1, YP_001157914.1, YP_004475334.1,

30 EGM20156.1, BAK10182.1, YP_347066.1, Q9KJH8.1, YP_002987902.1, ZP_03794633.1, ZP_03627777.1, YP_004434330.1, NP_743567.1, ZP_03456835.1, ZP_07911512.1, ZP_07264431.1, ZP_02265387.2, ZP_03456013.1, ZP_07577798.1, ZP_08429367.1,

- 30 -

YP_004055319.1, YP_004053883.1, YP_275219.1, YP_276116.1, YP_003882762.1,
 EGH97259.1, EGH95622.1, EGH90852.1, EGH85976.1, EGH81248.1, EGH79586.1,
 EGH79549.1, EGH73565.1, EGH66549.1, EGH64812.1, EGH58099.1, EGH54896.1,
 EGH50352.1, EGH43364.1, EGH41593.1, EGH29888.1, EGH29417.1, EGH22392.1,
 5 EGH22129.1, EGH11618.1, EGH10011.1, ZP_04589662.1, CCA60711.1, YP_003004716.1,
 BAK16630.1, YP_003264146.1, YP_371314.1, YP_439272.1, NP_762892.1, ADW02533.1,
 YP_003291774.1, EGC99875.1, ZP_08139631.1, YP_003333890.1, EGC08366.1,
 YP_080427.1, YP_258557.1, YP_001985016.1, YP_002875182.1, YP_002871082.1,
 YP_237050.1, YP_236199.1, NP_794008.1, NP_793082.1, YP_609790.1, EFW81598.1,
 10 EFW79804.1, ZP_07261632.1, ZP_07229875.1, ZP_06458504.1, ZP_05640568.1,
 ZP_03399268.1, ZP_03398232.1, ZP_08004496.1, ZP_06876938.1, ZP_03227482.1,
 ZP_02511781.1, ZP_02503964.1, ZP_02477255.1, ZP_02466678.1, ZP_02465791.1,
 ZP_02461688.1, ZP_02417235.1, ZP_02414413.1, ZP_02408727.1, ZP_02376540.1,
 ZP_02358949.1, ZP_07778021.1, ZP_07774051.1, ZP_07795409.1, ZP_07089008.1,
 15 YP_776393.1, ZP_07684652.1, ZP_06640022.1, ZP_03054335.1, ZP_02907621.1,
 ZP_02891475.1, ZP_01862226.1, ZP_01769192.1, ZP_01367441.1, ZP_01366930.1,
 ZP_01364106.1, ZP_01312991.1, ZP_01173135.1, ZP_07005523.1, ZP_04955702.1,
 ZP_04943305.1, ZP_04936014.1, ZP_04932415.1, ZP_04930223.1, ZP_04905334.1,
 ZP_04893870.1, ZP_04893165.1, ZP_04892059.1, ZP_04884056.1, YP_002438575.1,
 20 YP_002234939.1, YP_001488024.1, YP_001346487.1, YP_001350135.1, YP_001347031.1,
 YP_990329.1, YP_860279.1, YP_789111.1, YP_792557.1, YP_623139.1, YP_175644.1,
 YP_111362.1, YP_110557.1, YP_105231.1, NP_937516.1, AAU44816.1, AAA25978.1,
 XP_002721010.1, AAK81868.1, AAK71350.1, AAK71349.1, ZP_06499968.1, ZP_06498781.1,
 YP_003472045.1, ACA03779.1, ABL84756.1, AAQ16175.1, AAT51302.1, AAT51199.1,
 25 ZP_05639386.1, ACH70299.1, ACA60824.1, BAB32432.1,
 insbesondere
 AAK81868.1, NP_743567.1, AAK71349.1, YP_001269622.1, ADR61731.1, AAU44816.1,
 AAQ16175.1, YP_001670627.1, ACH70299.1, Q9KJH8.1, YP_004703658.1, ZP_08139631.1,
 YP_609790.1, YP_001747923.1, YP_258557.1, YP_347066.1, YP_002871082.1,
 30 YP_004352505.1, ACA60824.1, ZP_07774051.1, BAB32432.1, ZP_05640568.1, EGH58099.1,
 EGH64812.1, EGH11618.1, ZP_06456665.1, YP_276116.1, EFW81598.1, EGH95622.1,
 EGH22129.1, NP_794008.1, ZP_03399268.1, ZP_07264431.1, EGH73565.1, YP_237050.1,

- 31 -

ZP_06498781.1, EGH29888.1, EGH79586.1, EGH50352.1, YP_792557.1, YP_001350135.1,
 ZP_01364106.1, ZP_04932415.1, NP_249421.1, YP_004379169.1, ACA03779.1,
 YP_001186851.1, YP_004475334.1, ZP_04589662.1, ZP_03398232.1, EGH10011.1,
 ZP_07229875.1, ZP_05639386.1, EGH66549.1, YP_275219.1, ZP_07005523.1, EFW79804.1,
 5 ZP_06458504.1, EGH85976.1, YP_236199.1, EGH43364.1, ZP_07261632.1, ZP_06499968.1,
 EGH29417.1, EGH54896.1, EGH22392.1, EGH97259.1, NP_793082.1, EGH90852.1,
 EGH41593.1, NP_252169.1, ZP_01366930.1, YP_001347031.1, ZP_07778021.1,
 YP_002875182.1, AAA25978.1, ABL84756.1, EGH81248.1, ZP_07795409.1
 und besonders bevorzugt AAU44816.1, NP_743567.1, YP_001269622.1, ADR61731.1,
 10 AAK71349.1, YP_001670627.1, AAK81868.1, AAQ16175.1, Q9KJH8.1, ACH70299.1,
 YP_004703658.1, ZP_08139631.1, YP_609790.1, YP_001747923.1, AAK71350.1,
 sowie
 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
 bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste
 15 gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
 20 pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
 des Enzyms E_{iib} generell insbesondere die Umsetzung von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu
 25 Dodecanoyl-ACP-Thioester verstanden wird.

*Dritte gentechnische Modifikation für die Herstellung von Carbonsäure-Estern aus einer
 einfachen Kohlenstoffquelle*

30 Insbesondere für die Herstellung von Carbonsäure-Estern ist es vorteilhaft, wenn der
 Mikroorganismus zusätzlich eine dritte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen

mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_{iib} , E_v , E_{vi} oder E_{vii} umfasst.

Es ist in diesem Zusammenhang erfindungsgemäß bevorzugt, dass es sich bei dieser gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme handelt, ausgewählt aus der Gruppe

E_{iib} Acyl-CoA (Coenzym A):ACP (Acyl Carrier Protein)-Transacylase, welche einen ACP-Thioester in einen CoA-Thioester bzw. einen CoA-Thioester in einen ACP-Thioester umwandelt,

E_v Wachsester-Synthase oder Alkohol-O-Acyltransferase, bevorzugt der EC 2.3.1.75 oder EC 2.3.1.84, welche die Synthese eines Esters aus einem Acyl-Coenzym A-Thioester oder einem ACP-Thioester und einem Alkohol katalysiert,

E_{va} Fettsäure-O-Methyltransferase, bevorzugt der EC 2.1.1.15, welche die Synthese eines Fettsäuremethylesters aus einer Fettsäure und S-Adenosylmethionin katalysiert,

E_{vi} Acyl-CoA (Coenzym A)-Synthetase, bevorzugt der EC 6.2.1.3, welche die Synthese eines Acyl-Coenzym A-Thioesters katalysiert, und

E_{vii} Acyl-Thioesterase, bevorzugt der EC 3.1.2.2, EC 3.1.2.4, EC 3.1.2.18, EC 3.1.2.19, EC 3.1.2.20 oder EC 3.1.2.22, welche die Umsetzung eines Acyl-Thioesters mit einem Alkohol zu einem Carbonsäure-Ester katalysiert.

In diesem Zusammenhang ist es insbesondere bevorzugt, dass die dritte gentechnische Modifikation Kombinationen der gesteigerte Aktivitäten der Enzyme ausgewählt aus

E_v , E_{va} , E_{vii} , $E_{va}E_{vii}$, E_vE_{vi} , $E_{vi}E_{vii}$, $E_{vi}E_{vii}E_{iib}$ umfasst.

Bevorzugte Enzyme E_{iib} in Zusammenhang mit der dritten gentechnischen Modifikation entsprechen den oben als bevorzugt herausgestellten Enzymen E_{iib} in Zusammenhang mit der ersten gentechnischen Modifikation.

Bestimmte Enzyme E_v

- 33 -

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_v eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:

- NP_808414.2, NP_001178653.1, XP_003272721.1, XP_002720111.1, NP_001002254.1, XP_529027.1, XP_002831804.1, BAC28882.1, XP_549056.2, XP_002918053.1,
- 5 XP_001085075.1, XP_002763005.1, XP_002700092.1, XP_599558.4, EDL95940.1, XP_001496780.1, CAD89267.1, EFB28125.1, YP_004747160.1, YP_004746900.1, YP_004746665.1, YP_004746558.1, YP_004746531.1, YP_004746530.1, YP_004745948.1, YP_004745222.1, YP_004744358.1, YP_004743710.1, YP_002492297.1, AEK40846.1, YP_001847685.1, YP_001712672.1, YP_001706290.1,
- 10 YP_004724737.1, YP_004723134.1, AEJ51098.1, AEJ48174.1, AEJ47480.1, YP_004392630.1, YP_004099725.1, YP_003912033.1, YP_003652731.1, YP_003301387.1, YP_003298139.1, YP_001509672.1, YP_001505948.1, YP_001432486.1, YP_001432432.1, YP_924893.1, YP_923981.1, YP_922869.1, YP_922597.1, YP_922419.1, ZP_08629145.1, ZP_08628906.1, YP_001380027.1, YP_001280731.1, YP_001280730.1, YP_888966.1,
- 15 YP_890540.1, YP_888236.1, YP_888223.1, YP_888574.1, YP_884705.1, YP_889488.1, YP_886248.1, YP_882534.1, YP_881069.1, YP_881444.1, YP_883472.1, YP_879642.1, YP_884073.1, YP_880917.1, YP_882201.1, YP_879422.1, YP_707862.1, YP_707847.1, YP_707633.1, YP_707572.1, YP_707571.1, YP_706785.1, YP_706267.1, YP_705586.1, YP_705294.1, YP_702929.1, YP_701572.1, YP_700576.1, YP_700081.1, YP_700033.1,
- 20 YP_700018.1, YP_700017.1, YP_699999.1, CCB78299.1, CCB78283.1, CCB72233.1, YP_004663601.1, YP_004525283.1, YP_004524901.1, YP_004524237.1, YP_004524223.1, YP_004523752.1, YP_004522677.1, YP_004521797.1, YP_004521441.1, YP_004020500.1, YP_004014348.1, EGO40684.1, EGO38684.1, EGO38655.1, EGO37244.1, EGO36970.1, EGO36701.1, YP_003951335.1, YP_003812176.1, YP_003811992.1, YP_003810691.1,
- 25 YP_003810418.1, YP_003809501.1, ZP_08574204.1, CCA19760.1, XP_002900672.1, ZP_06414567.1, ZP_06413635.1, ZP_06411773.1, ZP_06411772.1, ZP_06271823.1, ZP_05620754.1, ZP_05360001.1, ZP_04752019.1, ZP_04751943.1, ZP_04750965.1, ZP_04750465.1, ZP_04750453.1, ZP_04750228.1, ZP_04750091.1, ZP_04749363.1, ZP_04749348.1, ZP_04749293.1, ZP_04749287.1, ZP_04749022.1, ZP_04748677.1,
- 30 ZP_04747379.1, ZP_04747377.1, ZP_04747348.1, ZP_04747282.1, ZP_04747159.1, ZP_04747093.1, ZP_04746958.1, ZP_04717323.1, ZP_04684258.1, ZP_04386203.1, ZP_04385082.1, ZP_04384030.1, ZP_04384029.1, ZP_03534755.1, ZP_01115502.1,

- 34 -

ZP_01102322.1, YP_004583872.1, YP_004583323.1, YP_004573656.1, YP_004571392.1,
YP_003513699.1, ZP_08553011.1, ZP_08552672.1, YP_003467054.1, YP_003572597.1,
YP_579515.1, YP_001136465.1, YP_001136231.1, YP_001135959.1, YP_001135349.1,
YP_001133828.1, YP_001133806.1, YP_001133693.1, YP_001133270.1, YP_001132329.1,
5 YP_001131721.1, YP_001131631.1, YP_001073715.1, YP_001073143.1, YP_001072388.1,
YP_001072036.1, YP_001071893.1, YP_001071814.1, YP_001071689.1, YP_001070856.1,
YP_001069682.1, YP_001069164.1, YP_001068496.1, YP_939377.1, YP_642242.1,
YP_641664.1, YP_641419.1, YP_640919.1, YP_640783.1, YP_640704.1, YP_640572.1,
YP_640571.1, YP_640494.1, YP_639709.1, YP_639198.1, YP_638523.1, YP_638030.1,
10 YP_637968.1, YP_637380.1, YP_446603.1, NP_001185377.1, NP_200151.2, NP_568547.1,
NP_197641.1, NP_200150.1, NP_197139.1, NP_190490.1, NP_190488.1, NP_177356.1,
YP_004495408.1, YP_004495023.1, YP_004494197.1, YP_004494168.1, YP_004493973.1,
YP_004493936.1, YP_004493628.1, YP_004493589.1, YP_004493509.1, YP_004493477.1,
YP_004493462.1, YP_004492352.1, YP_004492155.1, YP_004492039.1, YP_004491716.1,
15 YP_004491715.1, YP_004491501.1, YP_003375642.1, YP_003411203.1, YP_003410436.1,
YP_003395271.1, YP_003395089.1, YP_003393635.1, YP_003384208.1, YP_003379551.1,
ZP_04388235.1, YP_002134168.1, ZP_01900421.1, ZP_01900085.1, ZP_01899829.1,
ZP_01898741.1, BAK05274.1, BAJ93623.1, BAJ97841.1, BAK08349.1, BAJ93204.1,
BAJ92722.1, BAK06983.1, BAJ86545.1, BAK02325.1, BAJ85619.1, BAJ84892.1,
20 ZP_05218281.1, ZP_05218149.1, ZP_05217310.1, ZP_05216978.1, ZP_05216447.1,
ZP_05216446.1, ZP_05216025.1, ZP_05214687.1, ZP_08476543.1, ZP_04749239.1,
YP_823060.1, ADP99639.1, ADP98951.1, ADP98855.1, ADP98710.1, ADP96265.1,
ZP_08461736.1, ZP_08461735.1, ZP_07608690.1, YP_045555.1 (kodiert durch SEQ ID NR:
19), YP_872243.1, YP_004009106.1, YP_004008736.1, YP_004008003.1, YP_004007600.1,
25 YP_004006799.1, YP_004006436.1, YP_004006072.1, YP_004005008.1, YP_003486913.1,
NP_301898.1, ZP_08434757.1, YP_004079491.1, YP_004078785.1, YP_004077880.1,
YP_004076486.1, YP_004076464.1, YP_004076350.1, YP_004075391.1, YP_004074864.1,
ZP_01103855.1, YP_465274.1, ZP_08403393.1, ZP_08402717.1, ZP_08402716.1,
YP_004427559.1, YP_001277083.1, YP_001276783.1, YP_524767.1, YP_522739.1,
30 YP_521788.1, YP_004335162.1, YP_004333708.1, YP_004332973.1, YP_004332349.1,
YP_004157731.1, YP_004224204.1, YP_003275673.1, YP_003275371.1, YP_003274979.1,
YP_003274924.1, YP_003274705.1, YP_956544.1, YP_955502.1, YP_955007.1,

- 35 -

YP_954887.1, YP_954886.1, YP_954859.1, YP_954399.1, YP_953715.1, YP_953073.1,
YP_952592.1, YP_951909.1, YP_951298.1, YP_951083.1, ZP_08287899.1, ZP_08272356.1,
ZP_08270967.1, CCA60099.1, CCA56737.1, YP_983728.1, YP_550833.1, YP_549124.1,
YP_121795.1, YP_120815.1, YP_118589.1, YP_117783.1, YP_117375.1, YP_003646883.1,
5 YP_003646055.1, YP_003645661.1, EGE49469.1, ZP_08234310.1, CBZ53121.1,
YP_004010866.1, EGE24961.1, EGE18726.1, EGE15701.1, EGE12950.1, EGE10026.1,
EGB03968.1, ZP_08206563.1, ZP_08205089.1, ZP_08204958.1, ZP_08204416.1,
ZP_08203326.1, YP_714381.1, YP_713817.1, YP_694462.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 67),
YP_693524.1, YP_003341775.1, YP_003339587.1, ZP_08197177.1, ADW01905.1,
10 YP_004242683.1, ZP_07484742.2, ZP_07441979.2, ZP_07441978.2, ZP_07437333.2,
ZP_06960424.1, ZP_06801236.1, ZP_06799517.1, ZP_05769718.1, ZP_05768326.1,
ZP_05767970.1, ZP_05766272.1, ZP_05763839.1, YP_003204265.1, YP_003203570.1,
YP_003200768.1, YP_003134884.1, YP_003134608.1, ZP_05140320.1, NP_001140997.1,
EEE64643.1, EEE55448.1, EEE32548.1, ZP_03534756.1, ZP_03533653.1, ZP_03531929.1,
15 EEC71274.1, EAY98969.1, EAY75974.1, EAY75973.1, ADZ24988.1, ZP_08157247.1,
ZP_08156660.1, ZP_08156249.1, ZP_08153292.1, ZP_08152876.1, ZP_08152662.1,
YP_002946672.1, YP_960669.1, YP_960629.1, YP_960328.1, YP_958134.1, YP_957462.1,
YP_001022272.1, ZP_08123690.1, ZP_08120547.1, ZP_08119498.1, EGB29195.1,
EGB27143.1, YP_003770089.1, YP_003769971.1, YP_003764703.1, YP_003764513.1,
20 YP_003103950.1, YP_003168536.1, YP_003168331.1, YP_003166844.1, CAJ88696.1,
NP_769520.1, YP_001141853.1, YP_001108534.1, YP_001106516.1, YP_907824.1,
YP_907344.1, YP_906945.1, YP_906856.1, YP_906855.1, YP_906831.1, YP_906494.1,
YP_906243.1, YP_905962.1, YP_905765.1, YP_905343.1, YP_905239.1, YP_325796.1,
YP_130413.1, NP_625255.1, NP_624462.1, NP_338129.1, NP_338004.1, NP_337859.1,
25 NP_337740.1, NP_337694.1, NP_336266.1, NP_335919.1, NP_335351.1, NP_334638.1,
NP_218257.1, NP_218251.1, NP_217997.1, NP_217888.1, NP_217751.1, NP_217750.1,
NP_217646.1, NP_217604.1, NP_217603.1, NP_217000.1, NP_216801.1, NP_216276.1,
NP_215941.1, NP_215410.1, NP_214735.1, ZP_04661667.1, EFW44815.1, EFW44455.1,
ZP_08024634.1, ZP_08024620.1, ZP_08023777.1, ZP_08023597.1, YP_002784032.1,
30 YP_002783585.1, YP_002782904.1, YP_002782647.1, YP_002780099.1, YP_002779887.1,
YP_002778497.1, YP_002777657.1, YP_002777402.1, ZP_07966321.1, ZP_07944768.1,
CBI21867.3, CBI40547.3, CBI40544.3, CBI40540.3, CBI40536.3, CBI40534.3, CBI40533.3,

- 36 -

CBI32385.3, ZP_05765756.1, ZP_05765643.1, ZP_05765597.1, ZP_05765596.1,
YP_001705267.1, YP_001704692.1, YP_001704281.1, YP_001702654.1, YP_001701260.1,
ZP_05770434.1, ZP_05766274.1, ZP_05762133.1, ZP_05762130.1, ZP_01101223.1,
YP_481580.1, YP_979623.1, YP_979196.1, ZP_07414300.2, ZP_03537340.1,
5 ZP_03537339.1, ZP_03536772.1, ZP_03536404.1, ZP_03433478.1, ZP_03430367.1,
ZP_03430260.1, ZP_03429345.1, ZP_03428583.1, ZP_03426905.1, ZP_03426458.1,
ZP_03426456.1, ZP_03426455.1, ZP_03425014.1, ZP_03424082.1, ZP_03421649.1,
ZP_03419291.1, ZP_03418394.1, ZP_03417976.1, ZP_03414875.1, ZP_06952098.1,
ZP_05528769.1, ZP_05527907.1, ZP_05227984.1, ZP_05227897.1, ZP_05227653.1,
10 ZP_05227585.1, ZP_05227420.1, ZP_05227202.1, ZP_05226387.1, ZP_05226386.1,
ZP_05225355.1, ZP_05225200.1, ZP_05223431.1, ZP_05223402.1, ZP_04697793.1,
ZP_02550609.1, ZP_02548969.1, EEE25493.1, ABO13188.2, ZP_07205208.1, YP_589436.1,
BAJ33896.1, ZP_07718107.1, ZP_07717513.1, ZP_07717390.1, ZP_07716424.1,
ZP_04384387.1, ZP_07376578.1, ZP_06871097.1, ZP_06852444.1, ZP_06852442.1,
15 ZP_06852283.1, ZP_06852150.1, ZP_06852032.1, ZP_06850980.1, ZP_06850766.1,
ZP_06850644.1, ZP_06849846.1, ZP_06849446.1, ZP_06849265.1, ZP_06848894.1,
ZP_06848550.1, ZP_06847321.1, ZP_06847245.1, ZP_06728640.1, ZP_06155537.1,
ZP_03822106.1, ZP_03822105.1, ZP_03264909.1, ZP_01915979.1, ZP_01914209.1,
ZP_01909198.1, ZP_01895985.1, ZP_01893763.1, ZP_01893601.1, ZP_01893547.1,
20 ZP_01864269.1, ZP_01736818.1, ZP_01693481.1, ZP_01626518.1, ZP_01616172.1,
ZP_01461648.1, ZP_01439861.1, ZP_01311414.1, ZP_01222733.1, ZP_01038993.1,
ZP_00997001.1, ZP_06533596.1, ZP_07308012.1, ZP_07282351.1, ZP_07282257.1,
ZP_07278697.1, ZP_07277986.1, ZP_07277799.1, ZP_07011797.1, ZP_06913634.1,
ZP_06711075.1, ZP_06575037.1, ZP_06523715.1, ZP_06522644.1, ZP_06520408.1,
25 ZP_06518751.1, ZP_06514733.1, ZP_06511304.1, ZP_06510466.1, ZP_06509700.1,
ZP_06504004.1, ZP_06452618.1, ZP_06451687.1, ZP_06450049.1, ZP_06444722.1,
ZP_06443996.1, ZP_06443677.1, ZP_06438510.1, ZP_06435077.1, ZP_06434554.1,
ZP_06432969.1, ZP_06431341.1, ZP_06430915.1, ZP_05129423.1, ZP_05127637.1,
ZP_05126217.1, ZP_05096686.1, ZP_05095013.1, ZP_05094400.1, ZP_05093434.1,
30 ZP_05043539.1, ZP_05041631.1, ZP_04959394.1, ZP_04956551.1, ZP_01052702.1,
YP_437020.1, YP_436128.1, YP_432512.1, YP_432391.1, ZP_06072118.1, ZP_06069021.1,
ZP_06065092.1, ZP_06062254.1, YP_003032200.1, YP_003030813.1, YP_002766854.1,

YP_002766842.1, YP_002766292.1, YP_002765623.1, YP_002765076.1, YP_002764977.1,
YP_002764976.1, YP_002764693.1, YP_002764633.1, YP_002646305.1, YP_002646304.1,
YP_001853537.1, YP_001853530.1, YP_001853214.1, YP_001852100.1, YP_001851711.1,
YP_001851686.1, YP_001851684.1, YP_001851611.1, YP_001851610.1, YP_001851579.1,
5 YP_001850950.1, YP_001850935.1, YP_001850900.1, YP_001850899.1, YP_001850378.1,
YP_001849911.1, YP_001849825.1, YP_001849624.1, YP_001849470.1, YP_001848848.1,
YP_001848784.1, YP_001822237.1, YP_001289190.1, YP_001289078.1, YP_001288434.1,
YP_001287727.1, YP_001286168.1, YP_001085790.1, YP_856793.1, YP_629387.1,
YP_615587.1, YP_615252.1, YP_457389.1, YP_263530.1, NP_962591.1, NP_962411.1,
10 NP_962281.1, NP_961234.1, NP_960903.1, NP_960387.1, NP_960090.1, NP_959281.1,
NP_959065.1, NP_857403.1, NP_857149.1, NP_857148.1, NP_857047.1, NP_856907.1,
NP_856759.1, NP_856156.1, NP_855443.1, NP_855112.1, NP_853892.1, NP_828432.1,
NP_603766.1, XP_003081224.1, YP_003778608.1, YP_003730939.1, XP_003059244.1,
ADI13131.1, XP_002992800.1, XP_002963877.1, XP_001419779.1, XP_002988280.1,
15 XP_002987493.1, CBH32551.1, CBH32550.1, CBH19575.1, CBH19574.1, YP_003627553.1,
XP_002879777.1, XP_002877657.1, XP_002877655.1, XP_002873570.1, XP_002871716.1,
XP_002870738.1, XP_002868506.1, XP_002865972.1, XP_002864239.1, XP_002862308.1,
ZP_05823139.1, NP_001043877.1, ZP_06693274.1, ZP_06058985.1, NP_001044374.1,
XP_002835451.1, XP_002787542.1, XP_002785958.1, XP_002785645.1, XP_002783220.1,
20 XP_002774061.1, XP_002767852.1, XP_002766051.1, XP_002765456.1, XP_002765455.1,
XP_002677788.1, XP_002671612.1, XP_002736281.1, CBA31373.1, XP_002184474.1,
XP_002325936.1, XP_002323705.1, XP_002325937.1, XP_002323911.1, XP_002323706.1,
XP_002328965.1, XP_002318416.1, XP_002310400.1, ACY38597.1, ACY38596.1,
ACY38595.1, ACY38594.1, ACY38593.1, ACY38592.1, ACY38591.1, ACY38590.1,
25 ACX81315.1, ACX81314.1, XP_001868729.1, XP_001847517.1, XP_001847515.1,
XP_002502575.1, ACU20370.1, ACU18073.1, XP_002523348.1, XP_002516707.1,
XP_002429016.1, BAH89673.1, XP_002440221.1, XP_002459294.1, XP_002458560.1,
XP_320167.4, XP_001780431.1, XP_002364905.1, XP_002263196.1, XP_002263137.1,
XP_002263409.1, XP_002263252.1, XP_002268615.1, XP_002278404.1, XP_002274522.1,
30 XP_002282418.1, XP_001633379.1, XP_001632267.1, XP_001632004.1, XP_001622638.1,
XP_002155609.1, XP_759225.1, XP_002152406.1, XP_001914129.1, XP_001738032.1,
XP_001731626.1, XP_001209859.1, CAN79451.1, CAN78449.1, CAN72806.1, CAN71951.1,

CAN71950.1, CAN76656.1, CAN62907.1, AAZ08051.1, ABO21022.1, ABO21021.1, ABO21020.1, ABJ96321.1, BAF01088.1, XP_758106.1, BAC42871.1, BAB09801.1, BAB09102.1, insbesondere YP_045555.1 (kodiert durch SEQ ID Nr: 19), YP_694462.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 67) und NP_808414.2.

5 sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

10 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
15 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_v generell insbesondere die Umwandlung von Dodecanoyl-CoA-Thioester und/oder Dodecanoyl-ACP-Thioester mit Methanol zu Dodecanoyl-Methylester verstanden wird.

20 Handelt es sich bei dem Enzym E_v um eine Alkohol-O-Acyltransferase der EC 2.3.1.84, so ist es bevorzugt, dass diese ausgewählt sind aus:

EGA72844.1, NP_015022.1, S69991, AAP72991.1, EDN63695.1, BAA05552.1, AAP72992.1, S69992, AAP72995.1, XP_002552712.1, XP_001646876.1, XP_002551954.1, EGA82692.1, EDN61766.1, EGA86689.1, EGA74966.1, AAU09735.1, NP_011693.1, XP_445666.1,
25 BAA13067.1, AAP72993.1, EGA62172.1, XP_455762.1, EGA58658.1,

sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
30 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des

Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der

5 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_v generell insbesondere die Umwandlung von Dodecanoyl-CoA-Thioester mit Methanol zu Dodecanoyl-Methylester verstanden wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im

10 folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung dritte gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2007136762 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 2 bis 4 und 21 bis 24, den

15 Abbildungen 2 bis 4, den Ausführungsbeispielen 1, 2 und 5 bis 7 sowie den Ansprüchen 1, 2, 5, 6, 9 bis 27 und 33 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine dritte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester, Kohlenwasserstoffe und Alkan-1-ole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu

20 bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_v und deren Sequenzen insbesondere auf den Seiten 21 bis 24, in der Tabelle 10 und der Abbildung 10.

25 *Bestimmte Enzyme E_{va}*

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_{va} eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus YP_001851637.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 114) sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu

30 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt

- 40 -

80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{va} generell insbesondere die Umwandlung von Laurinsäure und S-Adenosylmethionin zu Laurinsäuremethylester und S-Adenosylhomocystein verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_{vi}

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_{vi} eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus YP_001724804.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 18) sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber der vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{vi} generell insbesondere die Synthese von Dodecanoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_{vii}

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung dritte gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2010075483 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0061] bis [0090] und [0287] bis [0367], den Abbildungen 1, 4 und 5, den Ausführungsbeispielen 1 bis 38 sowie den Ansprüchen 18 bis 26 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine dritte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren, Fettsäuremethylester, Fettsäureethylester, Fettalkohole, Fettalkyl-Acetate, Fettaldehyde, Fettamine, Fettamide, Fettsulfate, Fettether, Ketone, Alkane, interne und terminale Olefine, Dicarbonsäuren, α,ω -Dicarbonsäuren und α,ω -Diole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{vii} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0012] bis [0060], den Tabellen 7, 17, 26 und 27, den Abbildungen 1, 44 bis 47 und 55 bis 59, den Ausführungsbeispielen 1 bis 38 sowie den Ansprüchen 1 bis 17.

Vierte gentechnische Modifikation für die Herstellung von Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen, Alkanen, Olefinen, Alken-1-alen, Alken-1-olen und Alken-1-aminen aus einer einfachen Kohlenstoffquelle

Für den Fall, dass die Herstellung von Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen und Olefinen gewünscht ist, kann es vorteilhaft sein, die entsprechenden Carbonsäuren bzw. -Ester, entsprechend enzymatisch zu reduzieren, zu aminieren, zu decarboxylieren oder zu decarbonylieren.

Dazu weisen erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen eine vierte gentechnische Modifikation auf, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der umfasst, ausgewählt aus der Gruppe

- 42 -

E_{iiib} Acyl-CoA (Coenzym A):ACP (Acyl Carrier Protein)-Transacylase, welche einen ACP-Thioester in einen CoA-Thioester bzw. einen CoA-Thioester in einen ACP-Thioester umwandelt,

E_{vi} Acyl-CoA (Coenzym A)-Synthetase, bevorzugt der EC 6.2.1.3, welche die Synthese eines Acyl-Coenzym A-Thioesters katalysiert,

- 5 E_{viii} Acyl-CoA (Coenzym A)-Reduktase, bevorzugt der EC 1.2.1.42 oder EC 1.2.1.50, welche bevorzugt die Reduktion eines Acyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden Alkan-1-al oder Alkan-1-ol katalysiert,

E_{ix} Fettsäurereduktase (auch Fettaldehyd-Dehydrogenase oder Arylaldehyd-Oxidoreduktase), bevorzugt der EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.20 oder EC 1.2.1.48, welche bevorzugt
10 die Reduktion einer Alkansäure zum entsprechenden Alkan-1-al katalysiert,

E_x Acyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Reduktase, bevorzugt der EC 1.2.1.80, welche die Reduktion eines Acyl-ACP-Thioesters zum entsprechenden Alkan-1-al oder Alkan-1-ol katalysiert,

- E_{xi} Cytochrom P450 Fettsäuredecarboxylase, welche die Umsetzung einer Alkansäure mit n
15 Kohlenstoffatomen zu einem entsprechenden terminalen Olefin mit n-1 Kohlenstoffatomen, insbesondere von Dodecansäure zu Undec-10-en-Säure katalysiert,

E_{xii} Alkan-1-al-Decarbonylase, welche die Umsetzung eines Alkan-1-als (n Kohlenstoffatome) zu einem entsprechenden Alkan (n-1 Kohlenstoffatome) katalysiert, und

- E_{xiii} Alkan-1-al-Transaminase, welche die Umsetzung eines Alkan-1-als zu einem
20 entsprechenden Alkan-1-amin katalysiert.

In diesem Zusammenhang ist es insbesondere bevorzugt, dass die vierte gentechnische Modifikation Kombinationen an gesteigerten Aktivitäten der Enzyme ausgewählt aus

E_{ix}, E_x, E_{xi}, E_{vi}E_{viii}, E_{vi}E_xE_{iiib}, E_{viii}E_{xii}, E_{viii}E_{xiii}, E_{ix}E_{xii}, E_{ix}E_{xiii}, E_xE_{xii}, E_xE_{xiii}, E_{vi}E_{viii}E_{xii}, E_{vi}E_{viii}E_{xiii},

- 25 E_xE_{xii}E_{vi}E_{iiib} sowie E_xE_{xiii}E_{vi}E_{iiib} umfasst.

Bevorzugte Enzyme E_{iiib} in Zusammenhang mit der vierten gentechnischen Modifikation entsprechen den oben als bevorzugt herausgestellten Enzymen E_{iiib} in Zusammenhang mit der
30 ersten und dritten gentechnischen Modifikation.

Bevorzugte Enzyme E_{vi} in Zusammenhang mit der vierten gentechnischen Modifikation entsprechen den oben als bevorzugt herausgestellten Enzymen E_{vi} in Zusammenhang mit der dritten gentechnischen Modifikation.

5

Bestimmte Enzyme E_{viii}

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung vierte

10 gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2011008565 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0021], [0103] bis [0106], [0108] und [0129] erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte

15 gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäuren, Fettaldehyde, Fettalkohole, Alkane und Fettsäure-Ester aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen in insbesondere den Abschnitten [0104] bis [0106] sowie [0108] und [0129] und dem

20 Ausführungsbeispiel 11.

Die WO2008151149 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0009], [0015] bis [0037], [0053], [0071], [0171], [0174] bis [0191], [0274] und [0396], den Ansprüchen 53 bis 114, 188 bis 206 und 344 bis 355 sowie den Tabellen 1 bis 3 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen

25 zu ihrem Wildtyp mehr mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen in insbesondere den Abschnitten [0255] bis [0261] und [0269] sowie Tabellen 6 und 7.

Die WO2007136762 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 2 bis 4 und 19 bis 20, den

30 Abbildungen 2 bis 4, den Ausführungsbeispielen 2 bis 7 sowie den Ansprüchen 4, 8 bis 27 und 33 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und

Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester, Kohlenwasserstoffe und Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen insbesondere auf den Seiten 19 bis 20, in der Tabelle 10 und der Abbildung 10.

- 5 Die WO2011019858 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0015] bis [0020], [0064] bis [0074], [0085] bis [0086] und [0092] bis [0099], den Ausführungsbeispielen 1 bis 13, der Abbildung 1 und den Ansprüchen 1 bis 14 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettalkohole, aus
- 10 mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0004] bis [0007] und [0075] bis [0080] sowie den Ausführungsbeispielen 1 bis 13. Die WO2009140695 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0031] bis [0040], [0051] und [0214] bis [0233], den Ausführungsbeispielen 5 bis 24 und 28 bis 30, der Tabelle 1, der
- 15 Abbildung 40, sowie den Ansprüchen 29 bis 30 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Kohlenwasserstoffe, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen insbesondere in den
- 20 Abschnitten [0023] bis [0030], [0056], [0066] bis [0069] und [0193] bis [0208], der Tabelle 1, der Abbildung 39, den Ausführungsbeispielen 5 bis 24 und 28 bis 30 sowie den Ansprüchen 69 bis 74.

- Die WO2011008535 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0023] bis [0024], und [0133] bis [0158], der Abbildung 13, den Ansprüchen 39 und 45 bis 47 sowie den
- 25 Ausführungsbeispielen 1 bis 5 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Carbonsäuren, Hydroxy-Carbonsäuren und deren Lactone aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen
- 30 insbesondere in den Abschnitten [0017] bis [0022], [0084] bis [0132], den Abbildungen 2 bis 12, den Ansprüchen 31 bis 37 und 40 bis 44 sowie den Ausführungsbeispielen 1 bis 5.

Die WO2010063031 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0007], [0092] bis [0100], [0181] bis [0183] und [0199] bis [0213] erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen in insbesondere den Abschnitten [0191] bis [0194] sowie Tabellen 4 und 5. Die WO2010063032 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0007], [0092] bis [0100], [0181] bis [0183] und [0199] bis [0213] erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{viii} und deren Sequenzen in insbesondere den Abschnitten [0191] bis [0194] sowie Tabellen 4 und 5.

15 *Bestimmte Enzyme E_{ix}*

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_{ix} eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus YP_887275.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 117), ABI83656.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 122), sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber der vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{ix} generell insbesondere die Synthese von Laurylaldehyd, NADP, AMP und 2 P_i aus Laurinsäure, ATP, NADPH und H^+ verstanden wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung vierte gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2011019858 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0004] bis [0008], [0064] bis [0074], [0085] bis [0086], [0095] bis [0099], den Ausführungsbeispielen 1 bis 13, der Abbildung 1 und dem Anspruch 7 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ix} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0008] bis [0009], [0074] und [0081] bis [0082] sowie den Ausführungsbeispielen 1 bis 13.

Die WO2010135624 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0005], [0067] bis [0085] und [0092] bis [0102], den Ansprüchen 13 bis 17 und den Ausführungsbeispielen 1 bis 4 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Carbonsäuren, Hydroxy-Carbonsäuren und deren Lactone aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ix} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0005] bis [0006] und [0086] bis [0090], den Abbildungen 3 bis 7, dem Anspruch 28 und den Ausführungsbeispielen 1 bis 4.

Die WO2010062480 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0022] bis [0174] und [0292] bis [0316], den Ausführungsbeispielen 1 und 3 bis 8, der Abbildung 9 sowie den Ansprüchen 17 und 24 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ix} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0019] bis [0032] und [0263] bis [0286], der Tabelle 1, den Abbildungen 6 bis 8 sowie den Ausführungsbeispielen 1 und 3 bis 8.

Die WO201042664 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0236] bis [0261], dem Ausführungsbeispiel 2, der Abbildung 1 und 5 sowie dem Anspruch 25 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{ix} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0211] bis [0233], den Abbildungen 2 bis 4 und den Ausführungsbeispielen 1 bis 2.

Bestimmte Enzyme E_x

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_x eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus BAB85476.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 77), YP_047869.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 79 bzw. 81), YP_959486.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 83), YP_959769.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 139), B9TSP7.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 141), sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber der vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_x generell insbesondere die Synthese von Laurylalkohol und NAD(P)^+ aus Lauryl-ACP, NAD(P)H und H^+ verstanden wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung vierte

gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2007136762 A2 beschreibt insbesondere auf den Seiten 2 bis 4 und 19 bis 20, den
5 Abbildungen 2 bis 4, den Ausführungsbeispielen 2 bis 7 sowie den Ansprüchen 4, 8 bis 27 und 33 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettsäure-Ester, Wachsester, Kohlenwasserstoffe und Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift
10 beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_x und deren Sequenzen insbesondere auf den Seiten 19 bis 20, in der Tabelle 10 und der Abbildung 10.

Die WO2011019858 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0015] bis [0020], [0064] bis [0074], [0085] bis [0086] und [0092] bis [0099], den Ausführungsbeispielen 1 bis 13, der Abbildung 1 und den Ansprüchen 1 bis 14 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte
15 Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_x und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0004] bis [0007] und [0075] bis [0080] sowie den Ausführungsbeispielen 1 bis 13.

20 Die WO2009140695 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0031] bis [0040], [0051] und [0214] bis [0233], Ausführungsbeispielen 5 bis 24 und 28 bis 30, der Tabelle 1, der Abbildung 40, sowie den Ansprüchen 29 bis 30 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Kohlenwasserstoffe,
25 aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_x und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0023] bis [0030], [0056], [0066] bis [0069] und [0193] bis [0208], der Tabelle 1, der Abbildung 39, den Ausführungsbeispielen 5 bis 24 und 28 bis 30 sowie den Ansprüchen 69 bis 74.

30 Die WO2011008535 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0023] bis [0024], und [0133] bis [0158], der Abbildung 13, den Ansprüchen 39 und 45 bis 47 und dem Ausführungsbeispielen 1 bis 5 erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Mikroorganismen, die

eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Carbonsäuren, Hydroxy-Carbonsäuren und deren Lactone aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_x und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0017] bis [0022], [0084] bis [0132], den Abbildungen 2 bis 12, den Ansprüchen 31 bis 37 und 40 bis 44 und den Ausführungsbeispielen 1 bis 5.

Bestimmte Enzyme E_{xi}

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_{xi} eines dar, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus ADW41779.1 (kodiert durch SEQ ID NO. 168) sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{xiii} generell insbesondere die Umsetzung von Natriumpalmitat mit Wasserstoffperoxid zu Pentadecen, CO_2 und Wasser verstanden wird.

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung vierte gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2009085278 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0033] bis [0048], [0056] bis [0063] und [0188] bis [0202], der Abbildung 10, der Tabelle 8, den Ausführungsbeispielen 5

bis 18 sowie den Ansprüchen 28 bis 51 und 188 bis 195 erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Olefine, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch

5 erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{xi} und deren Sequenzen insbesondere in den Abschnitten [0021] bis [0032], [0051] bis [0055], [0081] bis [0084] und [0160] bis [0183], der Tabelle 8, den Ausführungsbeispielen 5 bis 18, den Ansprüchen 1 bis 25 und den Abbildungen 3, 7 und 9.

10

Bestimmte Enzyme E_{xii}

Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die erhalten werden, wenn die im folgenden gelisteten Mikroorganismen aufweisend eine im Sinne der Erfindung vierte

15 gentechnische Modifikation als Ausgangspunkt eingesetzt werden, indem sie mit einer ersten und zweiten gentechnischen Modifikation und gegebenenfalls mindestens einer weiteren gentechnischen Modifikationen im Sinne der Erfindung ausgestattet werden.

Die WO2009140695 A1 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0031] bis [0040], [0051] und [0214] bis [0233], den Ausführungsbeispielen 5 bis 24 und 28 bis 30, der Tabelle 1, der

20 Abbildung 40, sowie den Ansprüchen 29 bis 30 erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate, insbesondere Kohlenwasserstoffe, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{xii} und deren Sequenzen insbesondere in den

25 Abschnitten [0023] bis [0030], [0056], [0066] bis [0069] und [0193] bis [0208], der Tabelle 1, der Abbildung 38, den Ausführungsbeispielen 5 bis 24 und 28 bis 30 sowie den Ansprüchen 69 bis 74.

Die WO2008151149 A2 beschreibt insbesondere in den Abschnitten [0009], [0015] bis [0037], [0053], [0071], [0171], [0174] bis [0191], [0274] und [0396], den Ansprüchen 53 bis 114, 188 bis

30 206 und 344 bis 355 sowie den Tabellen 1 bis 3 erfindungsgemäß bevorzugte

Mikroorganismen, die eine vierte gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr mikrobielles Öl aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu

bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{xii} und deren Sequenzen in insbesondere Tabelle 8.

5 Bestimmte Enzyme E_{xiii}

Erfindungsgemäß bevorzugt handelt es sich bei dem Enzym E_{xiii} um eine ω -Transaminase der EC 2.6.1.-.

Bevorzugte Enzyme E_{xiii} sind ausgewählt aus der Gruppe:

- 10 3HMU_A, AAD41041.1, AAK15486.1, ABE03917.1, ADR60699.1, ADR61066.1, ADR62525.1, AEL07495.1, CAZ86955.1, EFW82310.1, EFW87681.1, EGC99983.1, EGD03176.1, EGE58369.1, EGH06681.1, EGH08331.1, EGH24301.1, EGH32343.1, EGH46412.1, EGH55033.1, EGH62152.1, EGH67339.1, EGH70821.1, EGH71404.1, EGH78772.1, EGH85312.1, EGH97105.1, EGP57596.1, NP_102850.1, NP_106560.1, NP_248912.1,
- 15 NP_248990.1, NP_354026.2, NP_421926.1, NP_637699.1, NP_642792.1, NP_744329.1, NP_744732.1, NP_747283.1, NP_795039.1, NP_901695.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 132), XP_002943905.1, YP_001021095.1, YP_001059677.1, YP_001061726.1, YP_001066961.1, YP_001074671.1, YP_001120907.1, YP_001140117.1, YP_001170616.1, YP_001185848.1, YP_001188121.1, YP_001233688.1, YP_001268866.1, YP_001270391.1, YP_001345703.1,
- 20 YP_001412573.1, YP_001417624.1, YP_001526058.1, YP_001579295.1, YP_001581170.1, YP_001668026.1, YP_001669478.1, YP_001671460.1, YP_001685569.1, YP_001747156.1, YP_001749732.1, YP_001765463.1, YP_001766294.1, YP_001790770.1, YP_001808775.1, YP_001809596.1, YP_001859758.1, YP_001888405.1, YP_001903233.1, YP_001977571.1, YP_002229759.1, YP_002231363.1, YP_002280472.1, YP_002297678.1, YP_002543874.1,
- 25 YP_002549011.1, YP_002796201.1, YP_002801960.1, YP_002875335.1, YP_002897523.1, YP_002912290.1, YP_002974935.1, YP_003060891.1, YP_003264235.1, YP_003552364.1, YP_003578319.1, YP_003591946.1, YP_003607814.1, YP_003641922.1, YP_003674025.1, YP_003692877.1, YP_003755112.1, YP_003896973.1, YP_003907026.1, YP_003912421.1, YP_004086766.1, YP_004142571.1, YP_004147141.1, YP_004228105.1, YP_004278247.1,
- 30 YP_004305252.1, YP_004356916.1, YP_004361407.1, YP_004378186.1, YP_004379856.1, YP_004390782.1, YP_004472442.1, YP_004590892.1, YP_004612414.1, YP_004676537.1, YP_004693233.1, YP_004701580.1, YP_004701637.1, YP_004704442.1, YP_108931.1,

YP_110490.1, YP_168667.1, YP_237931.1, YP_260624.1, YP_262985.1, YP_271307.1,
YP_276987.1, YP_334171.1, YP_337172.1, YP_350660.1, YP_351134.1, YP_364386.1,
YP_366340.1, YP_369710.1, YP_370582.1, YP_426342.1, YP_440141.1, YP_442361.1,
YP_468848.1, YP_521636.1, YP_554363.1, YP_608454.1, YP_610700.1, YP_614980.1,
5 YP_622254.1, YP_625753.1, YP_680590.1, YP_751687.1, YP_767071.1, YP_774090.1,
YP_774932.1, YP_788372.1, YP_858562.1, YP_928515.1, YP_983084.1, YP_995622.1,
ZP_00948889.1, ZP_00954344.1, ZP_00959736.1, ZP_00998881.1, ZP_01011725.1,
ZP_01037109.1, ZP_01058030.1, ZP_01076707.1, ZP_01103959.1, ZP_01167926.1,
ZP_01224713.1, ZP_01442907.1, ZP_01446892.1, ZP_01550953.1, ZP_01625518.1,
10 ZP_01745731.1, ZP_01750280.1, ZP_01754305.1, ZP_01763880.1, ZP_01769626.1,
ZP_01865961.1, ZP_01881393.1, ZP_01901558.1, ZP_02145337.1, ZP_02151268.1,
ZP_02152332.1, ZP_02167267.1, ZP_02190082.1, ZP_02242934.1, ZP_02360937.1,
ZP_02367056.1, ZP_02385477.1, ZP_02456487.1, ZP_02883670.1, ZP_03263915.1,
ZP_03263990.1, ZP_03400081.1, ZP_03452573.1, ZP_03456092.1, ZP_03517291.1,
15 ZP_03529055.1, ZP_03571515.1, ZP_03572809.1, ZP_03587785.1, ZP_03588560.1,
ZP_03697266.1, ZP_03697962.1, ZP_04521092.1, ZP_04590693.1, ZP_04890914.1,
ZP_04891982.1, ZP_04893793.1, ZP_04902131.1, ZP_04905327.1, ZP_04941068.1,
ZP_04944536.1, ZP_04945255.1, ZP_04959332.1, ZP_04964181.1, ZP_05053721.1,
ZP_05063588.1, ZP_05073059.1, ZP_05077806.1, ZP_05082750.1, ZP_05091128.1,
20 ZP_05095488.1, ZP_05101701.1, ZP_05116783.1, ZP_05121836.1, ZP_05127756.1,
ZP_05637806.1, ZP_05742087.1, ZP_05783548.1, ZP_05786246.1, ZP_05843149.1,
ZP_05945960.1, ZP_06459045.1, ZP_06487195.1, ZP_06492453.1, ZP_06493162.1,
ZP_06703644.1, ZP_06731146.1, ZP_06839371.1, ZP_07007312.1, ZP_07266194.1,
ZP_07374050.1, ZP_07662787.1, ZP_07778196.1, ZP_07797983.1, ZP_08099459.1,
25 ZP_08138203.1, ZP_08141719.1, ZP_08142973.1, ZP_08177102.1, ZP_08185821.1,
ZP_08186468.1, ZP_08208888.1, ZP_08266590.1, ZP_08402041.1, ZP_08406891.1,
ZP_08522175.1, ZP_08527488.1, ZP_08631252.1, ZP_08636687.1,
insbesondere NP_901695.1 (kodierte durch Seq ID Nr. 132), ZP_03697266.1, AAD41041.1,
YP_002796201.1, ZP_03697962.1, YP_001859758.1, YP_002229759.1, YP_001120907.1,
30 YP_110490.1, ZP_04964181.1, YP_774932.1, YP_001766294.1, YP_001581170.1,
YP_622254.1, ZP_03588560.1, YP_001809596.1, YP_370582.1, ZP_03572809.1,
NP_248990.1, YP_001888405.1, ZP_04905327.1, YP_001061726.1, YP_001668026.1,

- 53 -

- ZP_01750280.1, ZP_07778196.1, EGH71404.1, NP_744329.1, YP_004147141.1, ADR61066.1, ZP_05783548.1, YP_004701637.1, YP_366340.1, YP_003264235.1, EGD03176.1, YP_001268866.1, ZP_01901558.1, ZP_05121836.1, YP_003692877.1, ZP_03517291.1, YP_002974935.1, YP_001668026.1, ADR61066.1, NP_744329.1,
- 5 YP_001268866.1, YP_004701637.1, ZP_08142973.1, ADR62525.1, YP_610700.1, NP_747283.1, ADR62525.1, YP_001270391.1, YP_004704442.1, YP_610700.1, YP_001747156.1, ZP_08138203.1, ZP_07266194.1, EGH70821.1, YP_351134.1, EGH32343.1, EGH08331.1, EGH67339.1, YP_001668026.1, YP_004701637.1, YP_237931.1, ZP_03400081.1, ZP_05116783.1, ZP_01550953.1, ZP_07662787.1, YP_928515.1,
- 10 YP_788372.1, YP_001021095.1, ZP_07797983.1, YP_003578319.1, YP_004305252.1, NP_248912.1, ZP_08636687.1, YP_003912421.1, YP_751687.1, ZP_08142973.1, YP_271307.1, ZP_05082750.1, YP_001417624.1, YP_353455.1, und besonders bevorzugt NP_901695.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 132), YP_353455.1, sowie
- 15 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
- 20 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
- 25 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{xiii} generell insbesondere die Umsetzung von ω -Oxo-Laurinsäure und/oder ω -Oxo-Laurinsäuremethylester zu ω -Amino-Laurinsäure und/oder ω -Amino-Laurinsäuremethylester verstanden wird.

30

 E_{xiv} , Hilfsenzym zu E_{xiii}

Es kann in bei einer erhöhten Aktivität des Enzyms E_{xiii} förderlich sein, anstelle des Enzyms E_{xiii} alleine die Kombination eines Enzyms E_{xiii} gepaart mit einem Enzym E_{xiv} einzusetzen, welches die Umsetzung einer α -Keto-Carbonsäure zu einer Aminosäure katalysiert, bevorzugt ist das Enzym E_{xiv} eine Aminosäuredehydrogenase, wie beispielsweise Serin-Dehydrogenasen, Aspartat-Dehydrogenasen, Phenylalanin-Dehydrogenasen und Glutamat-Dehydrogenasen, besonders bevorzugt eine Alanindehydrogenase der EC 1.4.1.1.

Solche bevorzugten Alanindehydrogenasen sind ausgewählt aus

EGR93259.1, YP_004743277.1, YP_004741620.1, YP_004737294.1, YP_002509853.1, YP_002492255.1, YP_002489845.1, YP_002481919.1, YP_001819330.1, YP_004728333.1, ZP_08670930.1, YP_004672392.1, YP_004467026.1, YP_004326214.1, YP_002349951.1, YP_001674437.1, YP_003921585.1, YP_001699731.1, YP_004720756.1, YP_004719515.1, EGQ22316.1, EGQ21760.1, YP_004689232.1, YP_004698526.1, YP_004694875.1, EGP67576.1, YP_001832691.1, YP_001760857.1, AEJ53875.1, AEJ42949.1, YP_004392931.1, YP_004404798.1, YP_004374160.1, YP_004303162.1, YP_004196134.1, YP_004178581.1, YP_004163857.1, YP_004161555.1, YP_004099081.1, YP_004101986.1, YP_004042336.1, YP_003994181.1, YP_003966543.1, YP_003913256.1, YP_003825828.1, YP_003806106.1, YP_003686355.1, YP_003678575.1, YP_003654745.1, YP_003651439.1, YP_003637111.1, YP_003631815.1, YP_003300711.1, YP_002886396.1, ZP_03493991.1, YP_001890813.1, YP_001888849.1, YP_001554753.1, YP_001529018.1, YP_001528954.1, YP_001502090.1, YP_001412833.1, YP_001363812.1, YP_923679.1, NP_440110.1, ZP_08640273.1, ZP_08639751.1, ZP_08637916.1, YP_004171395.1, YP_001366419.1, YP_001327051.1, YP_001262560.1, YP_886996.1, YP_882850.1, YP_704410.1, YP_703508.1, ZP_08624689.1, YP_001230376.1, P17557.1, P17556.1, CCB94892.1, CCB73698.1, YP_001168635.1, YP_004668736.1, YP_911378.1, YP_003686997.1, YP_002263235.1, NP_820115.1, YP_004653761.1, YP_004651159.1, YP_003869397.1, YP_004641708.1, YP_004641134.1, YP_001996597.1, YP_001998297.1, YP_001943676.1, YP_001810799.1, YP_004630087.1, YP_004621893.1, YP_004613083.1, ZP_08621144.1, YP_003954200.1, YP_001372688.1, YP_001233686.1, ZP_08594848.1, ZP_08586665.1, ZP_08578896.1, ZP_08575937.1, YP_004604438.1, YP_004600931.1, ZP_08569139.1, ZP_08566255.1, AEB25326.1, YP_374584.1, YP_004216732.1, ZP_06806151.1, ZP_06440291.1, ZP_06369993.1, ZP_06254238.1, ZP_05844252.1, ZP_05472927.1, ZP_05365401.1, ZP_04747945.1, ZP_04678933.1, ZP_03779761.1, ZP_03728859.1,

- 55 -

ZP_03711891.1, ZP_03697269.1, ZP_01628294.1, ZP_01546224.1, ZP_01444021.1,
ZP_01308570.1, ZP_01228194.1, ZP_01164841.1, ZP_01114638.1, YP_004566582.1,
YP_004572166.1, YP_004571401.1, YP_004569425.1, YP_003513168.1, YP_004561169.1,
ZP_08554945.1, YP_400777.1, ZP_08533479.1, ZP_08533412.1, ZP_08525779.1,
5 ZP_08523693.1, YP_004471329.1, YP_004368103.1, YP_001536790.1, YP_001158763.1,
YP_662032.1, YP_967824.1, YP_004542206.1, YP_002958019.1, YP_645630.1,
ZP_08520595.1, AEG81976.1, YP_002560779.1, YP_496956.1, YP_411850.1, YP_300065.1,
NP_840123.1, ZP_08514775.1, YP_002250769.1, YP_002155665.1, YP_002137991.1,
YP_001135275.1, YP_001070365.1, YP_639268.1, NP_864377.1, YP_004554709.1,
10 YP_004546384.1, YP_004544159.1, ZP_01448725.1, ZP_01255407.1, EGL88594.1,
EGL87587.1, YP_004536059.1, ZP_08512666.1, ZP_08501410.1, ZP_08493566.1,
ZP_08486369.1, YP_004497891.1, YP_004494473.1, YP_003945301.1, YP_003835539.1,
YP_003634898.1, YP_003503876.1, ZP_06503131.1, YP_003376450.1, YP_003409976.1,
YP_003409004.1, YP_003395275.1, YP_003393138.1, YP_003387714.1, YP_003382934.1,
15 ZP_05760008.1, ZP_05300490.1, ZP_04387987.1, ZP_03725713.1, YP_002134125.1,
YP_001618802.1, ZP_01899015.1, ZP_01881250.1, ZP_01731833.1, YP_004529602.1,
YP_004512974.1, YP_004479110.1, YP_004434722.1, YP_004430602.1, CBX28458.1,
ZP_05217624.1, ZP_01074124.1, ZP_01062209.1, ZP_01011939.1, ZP_00956754.1,
YP_388045.1, ZP_07910902.1, ZP_07835291.1, ZP_07831081.1, ZP_07704117.1,
20 ZP_07112933.1, ZP_06860168.1, ZP_05915689.1, YP_002352943.1, YP_826544.1,
YP_004087624.1, ADP99134.1, YP_003590847.1, YP_003589189.1, YP_001192379.1,
ZP_08473868.1, ZP_08469833.1, ZP_08462614.1, ZP_07709417.1, ZP_07672507.1,
ZP_07608107.1, ZP_07404685.1, ZP_07334010.1, ZP_07333254.1, ZP_06888732.1,
ZP_06837313.1, YP_873046.1, YP_004060177.1, YP_004007860.1, YP_003492711.1,
25 ZP_08456143.1, YP_003675989.1, YP_003159562.1, NP_302068.1, YP_004461013.1,
ZP_08426378.1, ZP_08422563.1, YP_004122643.1, YP_004077807.1, YP_004058618.1,
YP_004055696.1, YP_003898888.1, YP_003575339.1, ZP_06186049.1, YP_003314861.1,
YP_003148148.1, YP_002786543.1, YP_001661762.1, YP_001666058.1, YP_001549204.1,
YP_001518627.1, YP_004453289.1, YP_004450492.1, YP_004301609.1, YP_465316.1,
30 ZP_08411512.1, YP_001394062.1, YP_001035553.1, YP_417038.1, YP_301147.1,
YP_014199.1, EGJ45059.1, EGJ36821.1, EGJ36552.1, EGJ19019.1, ZP_08388916.1,
YP_004427278.1, YP_003909234.1, YP_002536659.1, YP_001940410.1, YP_001329977.1,

- 56 -

YP_001323343.1, YP_001114195.1, YP_001096594.1, YP_949547.1, YP_756289.1,
YP_722774.1, YP_525283.1, YP_461225.1, YP_320697.1, YP_289022.1, YP_075651.1,
NP_988633.1, YP_004399762.1, YP_004335185.1, ADX76365.1, YP_004203407.1,
YP_001917832.1, YP_001642542.1, ZP_08332142.1, YP_041174.1, ZP_08328264.1,
5 YP_004225082.1, EGG96712.1, ZP_08311476.1, ZP_08310170.1, ZP_08267322.1,
ZP_08263846.1, ZP_07898723.1, YP_003273311.1, ZP_05909597.1, YP_003073095.1,
YP_003022905.1, YP_003013384.1, YP_003011072.1, ZP_04777180.1, ZP_04432601.1,
YP_001016505.1, YP_953175.1, YP_731492.1, ZP_08302086.1, ZP_08296718.1,
ZP_08285373.1, ZP_08280138.1, ZP_08270040.1, ZP_08261780.1, ZP_08258406.1,
10 ZP_08246570.1, YP_003113209.1, YP_002436565.1, ZP_04409790.1, YP_428767.1,
EGG40837.1, CCA54694.1, YP_004147180.1, YP_550034.1, YP_173042.1, EGF75662.1,
YP_004205024.1, YP_003670363.1, YP_003476027.1, YP_003241464.1, YP_863990.1,
YP_004149630.1, YP_003646700.1, EGF24326.1, BAK15593.1, YP_003991014.1,
YP_003988127.1, YP_003722297.1, YP_003254539.1, YP_003251916.1, NP_901692.1,
15 EGF16043.1, EGF07290.1, YP_003048854.1, YP_149301.1, YP_148605.1, YP_004340432.1,
EFT09946.1, EFS80513.1, EFS51332.1, EFS42459.1, YP_003060895.1, YP_003059033.1,
ZP_03305373.1, YP_002379520.1, YP_372555.1, NP_085655.1, YP_004321492.1,
ZP_08239446.1, YP_003817108.1, YP_002951286.1, YP_002950656.1, YP_002522266.1,
YP_001982538.1, YP_001127463.1, YP_001126767.1, NP_764939.1, NP_761756.1,
20 NP_244046.1, NP_243195.1, YP_003194671.1, YP_003161559.1, YP_002797803.1,
YP_002634404.1, YP_439119.1, YP_314402.1, YP_143482.1, NP_295618.1, ZP_08215173.1,
YP_004282846.1, YP_004267961.1, YP_001867313.1, YP_001301882.1, YP_847214.1,
YP_004095847.1, YP_003338282.1, YP_003337256.1, YP_355846.1, YP_253131.1,
ZP_08197563.1, ZP_08196283.1, ADW06447.1, YP_003370508.1, YP_003317645.1,
25 YP_003184411.1, YP_003198349.1, YP_003084639.1, YP_004294565.1, YP_004243057.1,
CBZ55377.1, EGC26795.1, EGC25718.1, EGC23378.1, ZP_07887872.1, YP_003269716.1,
YP_003203632.1, YP_003199972.1, YP_003153148.1, YP_003146304.1, YP_002893498.1,
ZP_03230841.1, ZP_03229411.1, YP_001050520.1, YP_963387.1, YP_927645.1,
YP_869684.1, YP_734091.1, NP_372233.1, NP_102173.1, ZP_08170259.1, EGD36706.1,
30 EGD32748.1, ZP_08155540.1, YP_004142849.1, YP_002417649.1, YP_001301040.1,
YP_001211208.1, YP_266230.1, ZP_08145165.1, YP_001801454.1, YP_001736003.1,
YP_833487.1, YP_831236.1, YP_384064.1, YP_094958.1, YP_009793.1, NP_975075.1,

- 57 -

NP_847074.1, EGC82166.1, YP_004261609.1, YP_004255502.1, YP_678603.1,
YP_004181700.1, ZP_08122013.1, ADT87541.1, YP_003524764.1, YP_002992990.1,
YP_002992892.1, YP_081348.1, YP_080482.1, YP_002476349.1, ZP_08115025.1,
ZP_08114403.1, YP_003552869.1, YP_002358112.1, ZP_08111138.1, YP_003770046.1,
5 YP_003103898.1, ZP_08101069.1, ZP_08097706.1, ZP_08094005.1, YP_003167240.1,
YP_002371817.1, YP_004231854.1, EGA98455.1, YP_002430239.1, ZP_01049900.1,
NP_769819.1, NP_768378.1, YP_001143837.1, YP_001108475.1, YP_906040.1,
YP_726477.1, YP_575010.1, YP_477594.1, YP_474564.1, YP_130399.1, YP_129373.1,
YP_123314.1, NP_810467.1, NP_646469.1, NP_626044.1, NP_391071.1, ZP_08086822.1,
10 ZP_08084776.1, ZP_08083119.1, NP_465104.1, NP_374819.1, NP_337355.1, NP_217296.1,
ZP_08072064.1, YP_004197762.1, ZP_08065558.1, ZP_08063535.1, ZP_08061612.1,
ZP_08059482.1, ZP_08057644.1, ZP_08055701.1, ZP_08049025.1, ZP_08047015.1,
ZP_04062925.1, YP_269473.1, ZP_08033402.1, ZP_07829339.1, ZP_06603053.1,
ZP_08020768.1, ZP_08013590.1, ZP_08011832.1, YP_003783744.1, YP_002781576.1,
15 YP_002780533.1, ZP_02195873.1, NP_797482.1, ZP_08006697.1, ZP_08006365.1,
ZP_08005962.1, ZP_08004522.1, EFV89241.1, ZP_07980135.1, ZP_07974222.1,
ZP_07970379.1, ZP_07962751.1, ZP_07953732.1, ZP_07945354.1, ZP_06273519.1,
YP_003428808.1, YP_003426902.1, YP_001711555.1, YP_001703831.1, YP_001621081.1,
YP_001223643.1, YP_001228127.1, YP_849789.1, YP_759696.1, NP_969291.1,
20 NP_896596.1, NP_470950.1, YP_359521.1, ZP_01946735.1, ZP_03631968.1,
ZP_01101833.1, YP_002826017.1, YP_003796926.1, ZP_07873974.1, ZP_07870908.1,
ZP_07645051.1, ZP_07643260.1, ZP_06611917.1, AAT40119.1, ZP_07864946.1,
YP_004068409.1, YP_002796203.1, YP_002774420.1, YP_003600348.1, YP_003599946.1,
YP_003565624.1, YP_003565223.1, YP_335198.1, YP_423850.1, YP_155059.1,
25 ZP_07843538.1, ZP_07841226.1, ZP_03566837.1, EFS39373.1, EFS35044.1,
ZP_05287373.1, ZP_05280407.1, ZP_05224249.1, ZP_04701236.1, ZP_04692180.1,
ZP_03561728.1, ZP_03227314.1, ZP_02931419.1, ZP_02731551.1, ZP_02465413.1,
ZP_02451335.1, ZP_02384332.1, ZP_02381808.1, ZP_02330643.1, YP_004047600.1,
EFR99988.1, EFR93766.1, EFR90643.1, EFR84459.1, ZP_04059923.1, ZP_03613601.1,
30 ZP_07743242.1, ZP_07740118.1, ZP_07728760.1, ZP_07728640.1, YP_003557047.1,
ZP_07204792.1, ZP_07033145.1, ZP_06949396.1, ZP_06928932.1, ZP_05692073.1,
ZP_05687006.1, ZP_04867480.1, YP_775531.1, CBE70214.1, ZP_07721182.1, CBW22027.1,

BAJ31519.1, ZP_07694389.1, ZP_07653390.1, ZP_07548028.1, ZP_07547185.1,
ZP_07462497.1, ZP_07458778.1, ZP_07399459.1, ZP_07397253.1, ZP_07397250.1,
ZP_07390390.1, ZP_07390003.1, ZP_07388675.1, ZP_07367724.1, ZP_07206561.1,
ZP_07053170.1, ZP_07048770.1, ZP_06873224.1, ZP_06852862.1, ZP_06427630.1,
5 ZP_06307332.1, ZP_06252577.1, ZP_06175164.1, ZP_06080808.1, ZP_06052314.1,
ZP_06033748.1, ZP_05945907.1, ZP_05924840.1, ZP_05885109.1, ZP_05882095.1,
ZP_05877865.1, ZP_05855512.1, ZP_05745159.1, ZP_05716384.1, ZP_04866524.1,
ZP_04819572.1, ZP_04797418.1, ZP_04319784.1, ZP_04302850.1, ZP_04298961.1,
ZP_04287684.1, ZP_04277177.1, ZP_04248389.1, ZP_04235899.1, ZP_04230016.1,
10 ZP_04226233.1, ZP_04219330.1, ZP_04216141.1, ZP_04209092.1, ZP_04188247.1,
ZP_04184510.1, ZP_04176651.1, ZP_04172877.1, ZP_04170954.1, ZP_04166021.1,
ZP_04160852.1, ZP_04158983.1, ZP_04154769.1, ZP_04153266.1, ZP_04149717.1,
ZP_04122524.1, ZP_04110635.1, ZP_04109769.1, ZP_04109049.1, ZP_04108444.1,
ZP_04104350.1, ZP_04100460.1, ZP_04075249.1, ZP_04074263.1, ZP_04009917.1,
15 ZP_03916440.1, ZP_03703407.1, ZP_03675960.1, ZP_03588177.1, ZP_03569636.1,
ZP_03497916.1, ZP_03459468.1, ZP_03299979.1, ZP_03127493.1, ZP_03054334.1,
ZP_03015779.1, ZP_02478038.1, ZP_02434435.1, ZP_01891777.1, ZP_01134782.1,
ZP_01084087.1, ZP_00959435.1, ZP_06021901.1, ZP_02908521.1, ZP_02892318.1,
ZP_02883918.1, ZP_02433787.1, ZP_02428013.1, ZP_02424229.1, ZP_02420399.1,
20 ZP_02190089.1, ZP_02184200.1, ZP_02166566.1, ZP_02159718.1, ZP_02152178.1,
ZP_02147727.1, ZP_02144676.1, ZP_02078507.1, ZP_02072824.1, ZP_02067293.1,
ZP_02061844.1, ZP_01996280.1, ZP_01991915.1, ZP_01958087.1, ZP_01908911.1,
ZP_01901606.1, ZP_01895406.1, ZP_01872936.1, ZP_01870578.1, ZP_01863314.1,
ZP_01859623.1, ZP_01852574.1, ZP_01834861.1, ZP_01816459.1, ZP_01770050.1,
25 ZP_01754550.1, ZP_01750331.1, ZP_01746097.1, ZP_01736276.1, ZP_01723571.1,
ZP_01688551.1, ZP_01666824.1, ZP_01627178.1, ZP_01623088.1, ZP_01612926.1,
ZP_01470938.1, ZP_01460341.1, ZP_01452344.1, ZP_01439206.1, ZP_01386817.1,
ZP_01313561.1, ZP_01304248.1, ZP_01264036.1, ZP_01261877.1, ZP_01235013.1,
ZP_01233072.1, ZP_01224625.1, ZP_01223017.1, ZP_01221216.1, ZP_01215557.1,
30 ZP_01202668.1, ZP_01159834.1, ZP_01158968.1, ZP_01157579.1, ZP_01130649.1,
ZP_01126987.1, ZP_01122900.1, ZP_01118752.1, ZP_01090470.1, ZP_01067027.1,
ZP_01058751.1, ZP_01043459.1, ZP_01041526.1, ZP_01036767.1, ZP_01001935.1,

ZP_00995212.1, ZP_00992904.1, ZP_00962062.1, ZP_00952239.1, ZP_00741173.1,
ZP_00740055.1, ZP_00738801.1, ZP_00517716.1, ZP_00231205.1, ZP_00208007.1,
YP_003974610.1, YP_003546595.1, YP_002317127.1, ZP_07313778.1, ZP_07302778.1,
ZP_07298850.1, ZP_07285992.1, ZP_07282306.1, ZP_07279420.1, ZP_07270582.1,
5 ZP_07001670.1, YP_003706150.1, ZP_06916083.1, ZP_06912607.1, ZP_06707160.1,
ZP_06324727.1, ZP_06199155.1, ZP_06197322.1, ZP_05788488.1, ZP_05785587.1,
ZP_05779471.1, ZP_05739072.1, ZP_05649780.1, ZP_05647025.1, ZP_05546023.1,
ZP_05341228.1, ZP_05256588.1, ZP_05127284.1, ZP_05121710.1, ZP_05119732.1,
ZP_05105668.1, ZP_05101668.1, ZP_05095370.1, ZP_05090860.1, ZP_05080646.1,
10 ZP_05076859.1, ZP_05069222.1, ZP_05065142.1, ZP_05056378.1, ZP_05052029.1,
ZP_05046506.1, ZP_05037402.1, ZP_05033610.1, ZP_05026858.1, ZP_05001187.1,
ZP_04959306.1, ZP_04947229.1, ZP_04941878.1, ZP_04896669.1, ZP_04890139.1,
ZP_04852481.1, ZP_04849996.1, ZP_04608704.1, ZP_04581931.1, ZP_04555275.1,
ZP_04553607.1, ZP_04545440.1, ZP_04538537.1, YP_002311919.1, ZP_01052096.1,
15 YP_432286.1, ZP_07039851.1, ZP_07036831.1, ZP_07035634.1, ZP_06826623.1,
ZP_06202690.1, ZP_06091438.1, ZP_06060476.1, YP_002955941.1, YP_002764322.1,
YP_002761274.1, YP_002754767.1, YP_002605829.1, YP_002544281.1, YP_002453687.1,
YP_002444060.1, YP_002369417.1, YP_002365390.1, YP_002297006.1, YP_002233968.1,
YP_001861152.1, YP_001850232.1, YP_001827236.1, YP_001815332.1, YP_001661116.1,
20 YP_001647239.1, YP_001643400.1, YP_001625970.1, YP_001584357.1, YP_001488077.1,
YP_001473862.1, YP_001450010.1, YP_001444991.1, YP_001424576.1, YP_001422460.1,
YP_001376512.1, YP_001373857.1, YP_001217438.1, YP_001155448.1, YP_001117213.1,
YP_001094151.1, YP_950353.1, YP_949946.1, YP_944887.1, YP_854776.1, YP_837848.1,
YP_795217.1, YP_750481.1, YP_746463.1, YP_681383.1, YP_673989.1, YP_632321.1,
25 YP_624008.1, YP_615612.1, YP_611857.1, YP_604242.1, YP_562748.1, YP_536656.1,
YP_517218.1, YP_459264.1, YP_382475.1, YP_340233.1, YP_295387.1, YP_285355.1,
YP_204286.1, YP_174267.1, YP_165491.1, YP_126314.1, YP_111103.1, YP_098760.1,
YP_082111.1, YP_064280.1, YP_064276.1, YP_062161.1, YP_056928.1, YP_008485.1,
YP_005739.1, NP_961822.1, NP_953341.1, NP_926915.1, NP_875991.1, NP_834329.1,
30 NP_830409.1, NP_827683.1, NP_694147.1, NP_693109.1, NP_682897.1, NP_661601.1,
NP_621858.1, NP_486395.1, NP_385730.1, NP_231539.1, ADL65712.1, XP_003087064.1,
YP_003886520.1, YP_003699559.1, YP_003516134.1, ADI98200.1, BAI86717.1,

- 60 -

YP_003794343.1, YP_003790454.1, ADI11356.1, YP_003845821.1, ADK69870.1,
YP_003784546.1, CBW36497.1, CBW26165.1, YP_003709979.1, CAQ50186.1,
ZP_06770463.1, CBK69442.1, YP_003413835.1, YP_003595089.1, ZP_06807811.1,
YP_003582455.1, YP_003464731.1, YP_003496397.1, YP_003421918.1, CBL07274.1,
5 CBK64956.1, YP_003508515.1, AAL87460.1, AAC23579.1, AAC23578.1, AAC23577.1,
ACU78652.1, YP_003471439.1, YP_003452777.1, ZP_06384971.1, ACY25368.1,
ABC26869.1, AAP44334.1, EEZ80018.1, ZP_05110458.1, 1PJB_A, ZP_04717201.1,
ZP_04689103.1, ZP_04658071.1, XP_002364705.1, ACN89388.1, 2VHW_A, 2VHV_A,
XP_001324625.1, ABZ06259.1, ABR57171.1, CAO90307.1, CAM75354.1, CAA44791.1,
10 BAA77513.1, EGR96638.1, EGR94699.1, ZP_08693646.1, YP_004740306.1,
YP_004738947.1, AEE73472.1, YP_002478771.1, YP_002018970.1, YP_001953230.1,
ZP_08683223.1, YP_004073823.1, EGQ99856.1, ZP_08664912.1, EGQ79321.1,
YP_001681700.1, AEJ51356.1, YP_004378292.1, YP_004237802.1, YP_004166920.1,
YP_004043011.1, YP_003997728.1, YP_002975437.1, YP_002514072.1, YP_001433829.1,
15 YP_001185975.1, YP_004676549.1, YP_004016358.1, YP_911347.1, YP_004658403.1,
YP_002015455.1, YP_001996171.1, YP_001998271.1, YP_001960099.1, YP_001942826.1,
YP_001130666.1, YP_004608353.1, YP_508400.1, YP_374553.1, ZP_06298411.1,
ZP_06044299.1, ZP_04390473.1, ZP_04055222.1, ZP_03779980.1, ZP_03729400.1,
ZP_03390832.1, YP_004580682.1, YP_001988281.1, YP_644219.1, YP_665459.1,
20 NP_895289.1, YP_004275231.1, NP_208189.1, BAJ60529.1, BAJ59008.1, BAJ57509.1,
BAJ56032.1, ZP_01254396.1, YP_445036.1, EGL90046.1, YP_004510847.1, ZP_08450330.1,
YP_003387804.1, YP_003058152.1, ZP_03438664.1, ZP_01884341.1, AEG33860.1,
YP_004429375.1, ZP_08459444.1, ZP_07909193.1, ZP_07908670.1, EFT26139.1,
EFT23947.1, EFT12708.1, EFT03750.1, EFS82814.1, EFS74272.1, EFS67128.1,
25 ZP_06844564.1, YP_826658.1, YP_001195249.1, YP_003095978.1, YP_469292.1,
YP_004442054.1, YP_004461174.1, YP_004055616.1, YP_003576656.1, YP_003094537.1,
YP_001295973.1, AEE71143.1, YP_004447480.1, YP_001978005.1, ZP_08413507.1,
ZP_07820264.1, YP_416780.1, EGI86036.1, YP_003109321.1, YP_001275268.1,
YP_380171.1, YP_159073.1, YP_004203456.1, YP_003761844.1, YP_040853.1,
30 ZP_08328557.1, CBL87253.1, CBL87167.1, YP_004316768.1, EFS92548.1, YP_001016505.1,
EGG67688.1, YP_003528837.1, YP_002434942.1, YP_117835.1, YP_004150583.1,
YP_003755105.1, YP_002526442.1, YP_003120958.1, EGE94241.1, YP_004345416.1,

- 61 -

EFS79952.1, ZP_06964253.1, EGE60050.1, CBZ52359.1, ADU40304.1, ADQ77229.1,
YP_003196038.1, YP_144713.1, YP_001304143.1, YP_113082.1, ADO76516.1,
YP_003326349.1, YP_003289755.1, YP_003089327.1, ZP_07911965.1, ZP_05773583.1,
ZP_05765271.1, YP_003154888.1, YP_003142045.1, YP_002280953.1, NP_371963.1,
5 NP_422368.1, EGC98966.1, EGC76398.1, YP_004263661.1, YP_004252039.1, YP_679036.1,
YP_499973.1, ZP_08090745.1, ZP_08108339.1, YP_001531594.1, ZP_01051588.1,
NP_646145.1, NP_224146.1, ZP_08054972.1, ZP_08053009.1, YP_003584878.1,
ZP_07939405.1, ZP_03439290.1, ADU82392.1, ADU83943.1, ADU85424.1, ADU80668.1,
YP_001225733.1, YP_003863039.1, ZP_01061682.1, YP_767568.1, ZP_07865749.1,
10 ZP_06858058.1, YP_628213.1, EFT81350.1, EFT66610.1, EFT51424.1, ZP_04839161.1,
ZP_05633406.1, ZP_05288381.1, AAR37813.1, EFS03282.1, EFS03278.1, YP_004046539.1,
ZP_07749550.1, ZP_07729731.1, ADN80650.1, ZP_07088856.1, ZP_07080219.1,
ZP_06949721.1, ZP_05685436.1, YP_002550450.1, YP_803715.1, ZP_07720023.1,
ZP_07469700.1, ZP_07365619.1, ZP_06924335.1, ZP_06715776.1, ZP_06303722.1,
15 ZP_06303721.1, ZP_06264319.1, ZP_06155528.1, ZP_05745707.1, ZP_04866244.1,
ZP_04199629.1, ZP_04195783.1, ZP_04067276.1, ZP_03968868.1, ZP_03963857.1,
ZP_03933079.1, ZP_03497046.1, ZP_03475134.1, ZP_01890152.1, ZP_01086712.1,
ZP_06021845.1, ZP_02183427.1, ZP_02162695.1, ZP_02032824.1, ZP_01993906.1,
ZP_01993127.1, ZP_01983694.1, ZP_01972527.1, ZP_01819838.1, ZP_01817962.1,
20 ZP_01740947.1, ZP_01734991.1, ZP_01694775.1, ZP_01678972.1, ZP_01468566.1,
ZP_01408749.1, ZP_01386800.1, ZP_01202184.1, ZP_01174108.1, ZP_01174047.1,
ZP_01118729.1, ZP_01081268.1, ZP_00998573.1, ZP_00739793.1, YP_002302140.1,
ZP_07358151.1, ZP_06668925.1, ZP_06668924.1, ZP_06667106.1, ZP_06324464.1,
ZP_06196777.1, ZP_05114159.1, ZP_05083968.1, ZP_05070370.1, ZP_05030022.1,
25 ZP_04673064.1, ZP_04581752.1, ZP_01052079.1, ZP_07661104.1, ZP_06077819.1,
YP_002835579.1, YP_002267069.1, YP_002129114.1, YP_001929236.1, YP_001910999.1,
YP_001854051.1, YP_001094152.1, YP_001044252.1, YP_861818.1, YP_915522.1,
YP_807371.1, YP_353800.1, YP_342402.1, YP_065168.1, YP_015797.1, YP_005051.1,
NP_856449.1, NP_661547.1, NP_358448.1, YP_003929442.1, YP_003927769.1,
30 ADO06185.1, ADO04689.1, ADL23243.1, YP_003789202.1, ADJ79786.1, YP_003516488.1,
ADI97953.1, ADI35485.1, YP_003716800.1, ZP_00241359.1, YP_003718040.1, CAQ49862.1,
YP_003282331.1, AAP97897.1, ACX99978.1, ACX98578.1, YP_003472544.1,

- 62 -

ZP_06382734.1, EEZ79852.1, ZP_05299989.1, ZP_05299895.1, XP_002367632.1,
ZP_03529835.1, ZP_03517011.1, ZP_03505783.1, XP_001310698.1, ABK27691.1,
CAB59281.2,

insbesondere NP_391071.1, BAI86717.1, YP_004205024.1, ZP_06873224.1,

- 5 YP_003974610.1, YP_001422460.1, AEB25326.1, YP_003921585.1, YP_080482.1,
ZP_03054334.1, YP_001488077.1, YP_081348.1, YP_003426902.1, NP_243195.1,
ZP_08004522.1, YP_003565624.1, YP_004095847.1, YP_003600348.1, ZP_08006697.1,
ZP_04248389.1, YP_174267.1, YP_001376512.1, ZP_04226233.1, ZP_04100460.1,
YP_002369417.1, ZP_03229411.1, ZP_04110635.1, ZP_04287684.1, ZP_04172877.1,
- 10 ZP_04158983.1, ZP_04219330.1, NP_830409.1, YP_003790454.1, ZP_04184510.1,
YP_001642542.1, ZP_04074263.1, ZP_04319784.1, NP_847074.1, YP_001373857.1,
ZP_04122524.1, ZP_03230841.1, YP_082111.1, NP_834329.1, YP_002444060.1,
ZP_04170954.1, YP_002453687.1, ZP_04153266.1, ZP_04302850.1, YP_002365390.1,
ZP_04216141.1, ZP_04298961.1, ZP_00740055.1, ZP_04277177.1, ZP_04104350.1,
- 15 ZP_04176651.1, YP_001647239.1, ZP_04188247.1, ZP_04149717.1, YP_003794343.1,
ZP_04230016.1, YP_001643400.1, ZP_04209092.1, ZP_04235899.1, YP_003428808.1,
ZP_08005962.1, YP_003599946.1, YP_003565223.1, ZP_01859623.1, YP_004569425.1,
ZP_04432601.1, ZP_03227314.1, YP_003699559.1, ZP_07709417.1, ZP_01723571.1,
NP_244046.1, ZP_08006365.1, ZP_00738801.1, ZP_04160852.1, ZP_04166021.1,
- 20 ZP_04154769.1, ZP_04109769.1, ZP_04109049.1, ZP_04108444.1, ZP_04075249.1,
ZP_00741173.1, ZP_00739793.1, ZP_01174108.1, ZP_01174047.1, ZP_00241359.1,
ZP_04195783.1, ZP_04199629.1, ZP_04067276.1

und besonders bevorzugt NP_391071.1.

sowie

- 25 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste
gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
- 30 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro

- 63 -

Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, bei dem Pyruvat zu Alanin umgesetzt wird.

5

Fünfte gentechnische Modifikation zur Unterdrückung des Abbaus von Carbonsäuren und Carbonsäurederivaten

- Erfindungsgemäß sind darüber hinaus Mikroorganismen bevorzugt, die eine fünfte
- 10 gentechnische Modifikation aufweisen, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme, ausgewählt aus der Gruppe
- E_a Acyl-CoA-Synthetase, bevorzugt der EC 6.2.1.3, welche die Synthese eines Acyl-Coenzym A-Thioesters katalysiert,
- 15 E_b Acyl-CoA-Dehydrogenase, bevorzugt der EC 1.3.99.-, EC 1.3.99.3, oder EC 1.3.99.13, welche die Oxidation eines Acyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden Enoyl-Coenzym A-Thioester katalysiert,
- E_c Acyl-CoA-Oxidase, bevorzugt der EC 1.3.3.6, welche die Oxidation eines Acyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden Enoyl-Coenzym A-Thioester katalysiert,
- 20 E_d Enoyl-CoA-Hydratase, bevorzugt der EC 4.2.1.17 oder EC 4.2.1.74, welche die Hydratisierung eines Enoyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden 3-Hydroxyacyl-Coenzym A-Thioester katalysiert,
- E_e 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, bevorzugt der EC 1.1.1.35 oder EC 1.1.1.211, welche die Oxidation eines 3-Hydroxyacyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden 3-
- 25 Oxoacyl-Coenzym A-Thioester katalysiert und
- E_f Acetyl-CoA-Acyltransferase, bevorzugt der EC 2.3.1.16, welche den Transfer eines Acetylrestes von einem 3-Oxoacyl-Coenzym A-Thioester auf Coenzym A katalysiert und somit ein um zwei Kohlenstoffatome verkürzten Acyl-Coenzym A-Thioester erzeugt, umfasst.

30

Dies hat den technischen Effekt, dass der Abfluss der durch die erste gentechnische Modifikation, aber auch der durch die zweite, dritte und vierte gentechnische Modifikation vermehrt gebildeten Carbonsäuren und Carbonsäurederivaten unterbunden wird.

- 5 Unter der Formulierung „im Vergleich zu ihrem Wildtyp verminderte Aktivität“ wird vorzugsweise eine um mindestens 50% verminderte, besonders bevorzugt um mindestens 90%, darüber hinaus bevorzugt um mindestens 99.9%, darüber hinaus noch mehr bevorzugt um mindestens 99,99% und am meisten bevorzugt um mindestens 99,999% verminderte Aktivität bezogen auf die Wildtyp-Aktivität verstanden. Die Formulierung „verminderte Aktivität“ beinhaltet auch keine
10 detektierbare Aktivität („Aktivität von null“). Die Verminderung der Aktivität eines bestimmten Enzyms kann beispielsweise durch gezielte Mutation oder durch andere, dem Fachmann bekannte Maßnahmen zur Verminderung der Aktivität eines bestimmten Enzyms erfolgen. Weitere Verfahren zur Verminderung von enzymatischen Aktivitäten in Mikroorganismen sind dem Fachmann bekannt. Insbesondere molekularbiologische Techniken bieten sich hier an.
- 15 Anleitung zur Modifikation und Verminderung von Proteinexpressionen und damit einhergehender Enzymaktivitätsverringerung speziell für *Candida*, insbesondere zum Unterbrechen spezieller Gene findet der Fachmann in der WO91/006660 und WO03/100013. Erfindungsgemäß bevorzugte Mikroorganismen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Verminderung der enzymatischen Aktivität erreicht wird durch Modifikation eines Genes
20 umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für die vorgenannten Enzyme, wobei die Modifikation ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend, bevorzugt bestehend aus, Insertion von Fremd-DNA in das Gen, Deletion mindestens von Teilen des Gens, Punktmutationen in der Gensequenz, RNA-Interferenz (siRNA), *antisense*-RNA oder Modifikation (Insertion, Deletion oder Punktmutationen) von regulatorischen Sequenzen, welche das Gen flankieren. Unter
25 Fremd-DNA ist in diesem Zusammenhang jegliche DNA-Sequenz zu verstehen, die dem Gen (und nicht dem Organismus) „fremd“ ist. In diesem Zusammenhang ist es insbesondere bevorzugt, dass das Gen durch Insertion eines Selektionsmarkergens unterbrochen wird, somit die Fremd-DNA ein Selektionsmarkergen ist, wobei bevorzugt die Insertion durch homologe Rekombination in den Genlocus erfolgte. In diesem Zusammenhang kann es vorteilhaft sein,
30 wenn das Selektionsmarkergen durch weitere Funktionalitäten erweitert wird, die wiederum eine anschließende Entfernung aus dem Gen ermöglichen. Dies kann beispielsweise durch dem Organismus fremde Rekombinationssysteme, wie etwa ein Cre/loxP-System oder FRT

- 65 -

(*Flippase Recognition Target*)-System oder das dem Organismus eigene homologe Rekombinationssystem erreicht werden.

Die Verminderung der Aktivität des erfindungsgemäßen Mikroorganismus im Vergleich zu ihrem Wildtyp wird bestimmt nach oben beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Aktivität unter

5 Einsatz von möglichst gleichen Zellzahlen/-konzentrationen, wobei die Zellen unter gleichen Bedingungen wie beispielsweise Medium, Begasung, Agitation angezogen wurden.

Bestimmte Enzyme E_a

10

In erfindungsgemäß bevorzugten Zellen stellt das Enzym E_a eines dar, welches die Sequenz umfasst NP_416319.1 (SEQ ID NR: 18)

15

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

20

besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro

25

Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_a generell insbesondere die Synthese von Dodecanoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_b

30

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass in den erfindungsgemäßen Zellen das Enzym E_b eines darstellt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:

YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), ZP_08341828.1,
YP_002291517.1, ZP_08393771.1, EFW53921.1, YP_003227327.1, YP_001461409.1,
AEG35025.1, YP_002385739.1, EGJ00024.1, ZP_08352177.1, ZP_03070250.1,
ZP_08367389.1, EGM63466.1, CBI99746.1, ZP_06660773.1, ZP_08372569.1, YP_309282.2,
5 YP_001879017.1, YP_003497883.1, ACI71032.1, YP_002406464.1, EGB79412.1,
EFZ76765.1, ZP_07145000.1, ZP_07151031.1, AAZ87047.1, EFZ56676.1, ZP_06656148.1,
EGB35012.1, EGB71054.1, EFW49392.1, ZP_07183316.1, YP_002396328.1,
YP_002327805.1, ZP_03027602.1, AAG54546.1, YP_001742341.1, ZP_04538240.1,
EFX12717.1, ACI71029.1, NP_285938.2, ZP_03064986.1, ZP_07120505.1, YP_539295.2,
10 ZP_03049609.1, ZP_06652178.1, AAP15817.1, NP_706224.3, ABI99723.1, EGB60663.1,
EFW71911.1, EGH38574.1, YP_668186.1, EGK29152.1, EGC05203.1, ZP_02801146.2,
YP_687886.1, ZP_08346491.1, EGJ94671.1, EGC94003.1, ZP_08362542.1, YP_002381459.1,
AAN78852.1, NP_752308.2, ZP_07173894.1, ZP_08357265.1, ZP_08382276.1,
ZP_02902298.1, ZP_04560694.1, ZP_06354226.1, CBY94356.1, NP_459307.1, EGE28353.1,
15 ZP_04657138.1, YP_002225434.1, YP_002635948.1, YP_151638.1, ZP_02663643.1,
NP_454921.1, YP_004729161.1, YP_215297.1, YP_001454506.1, YP_001571699.1,
YP_003363866.1, EGK30199.1, EGJ91900.1, EGK28208.1, ZP_08497358.1, CBK85993.1,
YP_003611563.1, YP_004592567.1, YP_003441061.1, YP_002240296.1, YP_002917946.1,
ZP_06549304.1, ZP_06017126.1, YP_001333918.1, AAM28523.1, ZP_08305363.1,
20 YP_001439185.1, EGL74026.1, YP_001175495.1, ZP_05968792.1, YP_003209204.1,
YP_003943022.1, YP_004499335.1, ZP_06191708.1, YP_001477183.1, ZP_07951567.1,
YP_003740265.1, NP_668276.1, ZP_04637564.1, ZP_04631714.1, CBY26031.1,
YP_004297237.1, YP_001007400.1, ZP_04625511.1, YP_069424.1, ZP_04616432.1,
ZP_04639135.1, YP_001871363.1, ZP_04620883.1, ZP_06636999.1, ZP_07377275.1,
25 YP_003929932.1, YP_001722031.1, ZP_04614013.1, ZP_04628476.1, YP_003713213.1,
YP_003530236.1, CBX79727.1, YP_004114694.1, YP_001908526.1, ADP11689.1,
YP_002649711.1, YP_003469212.1, YP_003519171.1, YP_051564.1, ZP_03833764.1,
ZP_03827249.1, NP_928504.1, YP_004211704.1, ZP_07681706.1, YP_003018849.1,
YP_003260788.1, YP_003042091.1, ZP_05973896.1, ZP_03317495.1, ZP_02958330.2,
30 EFW60358.1, EGI98786.1, ZP_06127315.2, YP_002150121.1, ZP_03842196.1,
YP_003884303.1, YP_003003248.1, YP_003334792.1, ZP_03379559.1, CBA73629.1,
YP_002986552.1, ZP_06538530.1, ZP_01258771.1, ZP_04921840.1, ZP_06180371.1,

ZP_08308836.1, ZP_06174994.1, YP_001446380.1, ZP_01237449.1, ZP_01161468.1,
ZP_01222040.1, ZP_06038476.1, ZP_05925639.1, ZP_06154677.1, ZP_02195704.1,
ZP_01989646.1, ZP_01868523.1, YP_131060.1, ZP_05722161.1, ZP_05716057.1,
NP_798668.1, EGF45205.1, ZP_05120764.1, EGR07881.1, ZP_08100412.1, ZP_04919383.1,
5 ZP_06054287.1, YP_002156761.1, YP_205315.2, ZP_04961417.1, ZP_06050299.1,
ZP_08103013.1, ZP_01949008.1, NP_231862.1, AEA79156.1, ZP_06081122.1,
ZP_04418155.1, YP_001217747.1, ZP_04413631.1, NP_935312.1, ZP_01977990.1,
NP_760770.1, YP_004188005.1, YP_002810906.1, ZP_05884155.1, ZP_05946273.1,
ZP_01065180.1, ZP_01815735.1, YP_002417909.1, YP_002263750.1, YP_856109.1,
10 ZP_07744057.1, ZP_08520214.1, ZP_06034047.1, YP_004565576.1, ZP_05881167.1,
ZP_00991316.1, YP_734276.1, ADT86286.1, YP_001142550.1, YP_869958.1,
ZP_08566610.1, ZP_05876732.1, YP_001366225.1, YP_001094233.1, ADV54653.1,
YP_963612.1, YP_738268.1, YP_001502248.1, YP_004391846.1, YP_002311644.1,
YP_002358241.1, YP_001050670.1, ZP_07390237.1, YP_001674114.1, YP_001554497.1,
15 NP_718122.1, YP_001760976.1, YP_927745.1, YP_562771.1, YP_003557130.1,
ZP_02159449.1, YP_003913548.1, YP_001473736.1, YP_750554.1, ZP_01897495.1,
YP_268985.1, ZP_01042474.1, ZP_08570996.1, YP_004427315.1, ZP_07010199.1,
YP_156047.1, ZP_07097521.1, YP_004467113.1, ZP_01614110.1, YP_340459.1,
YP_004434754.1, YP_662062.1, YP_004068195.1, ZP_08409704.1, ZP_08622396.1,
20 ZP_01135962.1, ZP_03560927.1, ZP_04716612.1, EGB41427.1, EGP48304.1, EFW84045.1,
ZP_08505249.1, ZP_06688896.1, YP_003980530.1, YP_003168652.1, YP_003146346.1,
YP_001250478.1, YP_095752.1, YP_124009.1, CBW99992.1, YP_284763.1, YP_127029.1,
YP_746940.1, ZP_07663653.1, ZP_03349444.1, YP_002354470.1, YP_004145615.1,
YP_003524477.1, ZP_03698069.1, YP_003376672.1, ZP_06188282.1, EFW81359.1,
25 EGH83675.1, EGH67821.1, EFW83732.1, YP_273865.1, NP_902393.1, ZP_06457469.1,
EGH99235.1, ZP_03397893.1, ZP_07004262.1, ZP_06732661.1, ZP_07263971.1,
EGH75297.1, NP_888341.1, EGH31566.1, EGH45251.1, NP_643363.1, EGH24154.1,
EGH92666.1, EGH73945.1, EGH12424.1, NP_793629.1, ZP_06705890.1, YP_234714.1,
EGH62932.1, EGH52925.1, ZP_01126966.1, NP_841588.1, ZP_05109483.1,
30 YP_003847638.1, YP_004294524.1, ZP_02244088.1, NP_884586.1, ZP_08176463.1,
ZP_04588788.1, YP_450732.1, ZP_08185386.1, YP_001914265.1, YP_003527565.1,
YP_004696148.1, NP_638218.1, ZP_05046817.1, YP_343737.1, ZP_07652844.1,

- 68 -

- YP_004227922.1, YP_364921.1, YP_001632020.1, NP_744048.1, YP_001898007.1,
YP_003145987.1, YP_558241.1, YP_410795.1, YP_001895310.1, YP_002980410.1,
ZP_06841648.1, YP_258889.1, YP_931967.1, YP_003760619.1, YP_002029446.1,
YP_004474743.1, YP_158312.1, YP_004380764.1, YP_001973352.1, CBJ39115.1,
5 YP_349912.1, YP_003753442.1, ZP_05135288.1, YP_004700980.1, YP_927690.1,
YP_001269130.1, YP_742956.1, ADR61321.1, YP_001347709.1, YP_004355482.1,
YP_003907207.1, NP_251505.1, ZP_04929120.1, NP_518658.1, YP_002871500.1,
ZP_01451059.1, EGM21899.1, YP_001187411.1, ZP_08570514.1, ZP_07794119.1,
YP_004391835.1, YP_002256385.1, ZP_07774414.1, YP_855885.1, YP_563120.1,
10 YP_001172167.1, YP_004713921.1, ZP_08138366.1, AEA83572.1, YP_003746704.1,
ZP_08521441.1, ZP_05061205.1, YP_001667709.1, YP_750573.1, YP_607261.1,
ZP_05118288.1, YP_002311716.1, NP_718079.1, YP_003777020.1, ZP_06052248.1,
ZP_00943163.1, ZP_08309312.1, AEG70141.1, YP_001748377.1, YP_001857928.1,
YP_001094176.1, YP_003604813.1, ZP_01947893.1,
15 insbesondere
EFW81359.1, EGH83675.1, EGH67821.1, EFW83732.1, YP_273865.1, ZP_06457469.1,
EGH99235.1, ZP_03397893.1, ZP_07004262.1, ZP_07263971.1, EGH75297.1, EGH31566.1,
EGH45251.1, EGH24154.1, EGH92666.1, EGH73945.1, EGH12424.1, NP_793629.1,
YP_234714.1, EGH62932.1, EGH52925.1, ZP_04588788.1, NP_744048.1, YP_258889.1,
20 YP_004474743.1, YP_004380764.1, YP_349912.1, YP_004700980.1, YP_001269130.1,
ADR61321.1, YP_001347709.1, YP_004355482.1, NP_251505.1, ZP_04929120.1,
YP_002871500.1, EGM21899.1, YP_001187411.1, ZP_07794119.1, ZP_07774414.1,
YP_001172167.1, YP_004713921.1, ZP_08138366.1, AEA83572.1, YP_001667709.1,
YP_607261.1, YP_001748377.1, YP_260045.1, YP_002873091.1, ZP_07775826.1,
25 CAC34855.1, EGH11916.1, ZP_05641615.1, ZP_06480669.1, ZP_06480668.1,
ZP_05641616.1, ZP_06492823.1, ZP_06492821.1, EGH11920.1, EGH25319.1,
ZP_06492824.1, ADX52254.1, YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals
AP_000876.1), ZP_08341828.1, YP_002291517.1, YP_003227327.1, YP_001461409.1,
AEG35025.1, YP_002385739.1, ZP_08352177.1, ZP_03070250.1, ZP_08367389.1,
30 CBI99746.1, ZP_06660773.1, ZP_08372569.1, YP_003497883.1, ACI71032.1,
YP_002406464.1, EGB79412.1, EFZ76765.1, ZP_07145000.1, ZP_07151031.1, EFZ56676.1,
ZP_06656148.1, EGB35012.1, EGB71054.1, ZP_07183316.1, YP_002396328.1,

- 69 -

YP_002327805.1, ZP_03027602.1, AAG54546.1, YP_001742341.1, ABE05764.1, EFX12717.1, ACI71029.1, NP_285938.2, ZP_07120505.1, YP_539295.2, ZP_03049609.1, ZP_06652178.1, ABI99723.1, EGB60663.1, EFW71911.1, EGH38574.1, YP_668186.1, ZP_02801146.2, ZP_08346491.1, ZP_08362542.1, AAN78852.1, NP_752308.2,
 5 ZP_07173894.1, ZP_08357265.1, ZP_08382276.1, AAM28523.1, ZP_07097521.1, EGB41427.1, EGB41426.1, BAA07583.1, ZP_07100038.1, CAX20347.1

und besonders bevorzugt

NP_744048.1, YP_004700980.1, YP_001269130.1, ADR61321.1, YP_001667709.1, YP_001748377.1, YP_258889.1, YP_349912.1, YP_002871500.1, ZP_07774414.1,
 10 YP_260045.1, YP_002873091.1, ZP_07775826.1, CAC34855.1, YP_001172167.1, YP_004713921.1, AEA83572.1, YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), BAA07583.1, ZP_07594808.1,

sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
 15 bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
 20 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
 25 des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_c

30

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass in den erfindungsgemäßen Zellen das Enzym E_c eines darstellt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:

- 70 -

YP_003571780.1, YP_445820.1, YP_634556.1, YP_004665862.1, ZP_01461690.1,
 YP_921666.1, YP_002778910.1, ZP_08550394.1, YP_003384289.1, YP_001195727.1,
 YP_702012.1, ZP_04384437.1, YP_002765110.1, ZP_04996322.1, ZP_08195144.1,
 ZP_04700546.1, YP_954595.1, YP_004736804.1, ADW07059.1, YP_001827916.1,
 5 ZP_04691466.1, YP_001109453.1, ZP_08240125.1, YP_003272226.1, YP_004053469.1,
 ZP_06272176.1, YP_004491616.1, YP_001133991.1, YP_001071715.1, YP_290295.1,
 YP_003193744.1, YP_001704317.1, YP_004008413.1, YP_004655806.1, YP_640598.1,
 ZP_08153802.1, ZP_00995173.1, ZP_05225674.1, YP_888747.1, YP_003114111.1,
 YP_004522832.1, ZP_06848773.1, ZP_08203814.1, YP_001851901.1, EGO40578.1,
 10 YP_003134974.1, ZP_07282448.1, YP_003770185.1, YP_881295.1, YP_004336131.1,
 NP_961035.1, YP_004164861.1, YP_003681133.1, ZP_04749633.1, ZP_07718288.1,
 ZP_01201898.1, YP_004223976.1, YP_118690.1, YP_905275.1, BAE47462.1, YP_831622.1,
 YP_003407476.1, ZP_01129477.1, YP_003645654.1, YP_004454693.1, YP_002487953.1,
 YP_004084231.1, YP_003836912.1, YP_004241154.1, ZP_07706098.1, YP_001855531.1,
 15 ZP_08124588.1, YP_947882.1, BAE47461.1, YP_003327670.1, YP_001363757.1,
 YP_004601796.1, YP_001625220.1, YP_003638017.1, ZP_06501585.1, YP_004404736.1,
 YP_062974.1, YP_002957230.1, YP_003316209.1, YP_003149881.1, YP_001221553.1,
 YP_003162313.1, ZP_03978917.1, YP_001708860.1, ZP_05912043.1, ZP_06806059.1,
 YP_003155732.1, YP_002835700.1, YP_003916799.1, ZP_03936415.1, ZP_07090640.1,
 20 ZP_08516453.1, AAB97825.1, YP_004541029.1, YP_004606508.1, YP_001801238.1,
 ZP_07989876.1, YP_004761186.1, YP_002883572.1, ZP_08023616.1, ZP_05847263.1,
 YP_251740.1, ZP_03394212.1, YP_001107648.1, YP_002872770.1, YP_001821654.1,
 ZP_08233739.1, AAD12170.1, ZP_08215859.1, AAD40800.1, ZP_05005905.1, ADW07311.1,
 YP_348592.1, NP_824883.1, NP_627459.1, YP_001828149.1, ZP_05525554.1,
 25 ZP_08240364.1, ZP_07299658.1, ZP_06582153.1, ZP_06921827.1, ZP_04703961.1,
 BAJ27090.1, ZP_06592678.1, ZP_04691265.1, YP_001751500.1, BAJ31579.1,
 bevorzugt YP_003571780.1, YP_445820.1, YP_634556.1, YP_004665862.1, ZP_01461690.1,
 YP_921666.1, YP_002778910.1, ZP_08550394.1, YP_003384289.1, YP_001195727.1,
 YP_702012.1, ZP_04384437.1, YP_002765110.1, ZP_04996322.1, ZP_08195144.1,
 30 ZP_04700546.1, YP_954595.1, YP_004736804.1, ADW07059.1, YP_001827916.1,
 ZP_04691466.1, YP_001109453.1, ZP_08240125.1, YP_003272226.1, YP_004053469.1,
 ZP_06272176.1, YP_004491616.1, YP_001133991.1, YP_001071715.1, YP_290295.1,

- 71 -

- YP_003193744.1, YP_001704317.1, YP_004008413.1, YP_004655806.1, YP_640598.1, ZP_08153802.1, ZP_00995173.1, ZP_05225674.1, YP_888747.1, YP_003114111.1, YP_004522832.1, ZP_06848773.1, ZP_08203814.1, YP_001851901.1, EGO40578.1, YP_003134974.1, ZP_07282448.1, YP_003770185.1, YP_881295.1, YP_004336131.1,
- 5 NP_961035.1, YP_004164861.1, YP_003681133.1, ZP_04749633.1, ZP_07718288.1, ZP_01201898.1, YP_004223976.1, YP_118690.1, YP_905275.1, BAE47462.1, YP_831622.1, YP_003407476.1, ZP_01129477.1, YP_003645654.1, YP_004454693.1, YP_002487953.1, YP_004084231.1, YP_003836912.1, YP_004241154.1, ZP_07706098.1, YP_001855531.1, ZP_08124588.1, YP_947882.1, BAE47461.1, YP_003327670.1, YP_001363757.1,
- 10 YP_004601796.1, YP_001625220.1, YP_003638017.1, ZP_06501585.1, YP_004404736.1, YP_062974.1, YP_002957230.1, YP_003316209.1, YP_003149881.1, YP_001221553.1, YP_003162313.1, ZP_03978917.1, YP_001708860.1, ZP_05912043.1, ZP_06806059.1, YP_003155732.1, YP_002835700.1, YP_003916799.1, ZP_03936415.1, ZP_07090640.1, ZP_08516453.1, AAB97825.1, YP_004541029.1, YP_004606508.1, YP_001801238.1,
- 15 ZP_07989876.1, YP_004761186.1, YP_002883572.1, ZP_08023616.1, ZP_05847263.1, YP_251740.1,
- und besonders bevorzugt YP_002835700.1, ZP_03936415.1, BAE47461.1, YP_001801238.1, ZP_03978917.1, ZP_03394212.1, ZP_05847263.1, ZP_08516453.1, YP_004606508.1, YP_251740.1, ZP_07090640.1, ZP_07989876.1, YP_004761186.1,
- 20 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
- 25 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
- 30 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_c generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_d und E_e

- 5 Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass in den erfindungsgemäßen Zellen das Enzym E_d oder E_e eines darstellt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:
- ZP_07164313.1, NP_418288.1, YP_003231641.1, EGM59778.1, EFZ53307.1, AAA23750.1, ZP_07192215.1, YP_001460638.1, YP_001727088.1, EGK16564.1, ZP_08380619.1, ZP_07136310.1, CAB40809.1, NP_839030.1, ZP_07690617.1, EGC97039.1, ZP_07103516.1,
- 10 ZP_03027888.1, ZP_07121980.1, YP_002414996.1, EGP22873.1, EGJ82677.1, EGB59499.1, ZP_07118761.1, YP_002409078.1, YP_002295407.1, EGE62412.1, EGB69560.1, ZP_06655948.1, ZP_06664574.1, ZP_03070699.1, ZP_07145404.1, ZP_08376058.1, EGB85466.1, ZP_07189176.1, ZP_02999920.1, ZP_08356523.1, ZP_06659936.1, ZP_07139396.1, YP_001746178.1, YP_002384700.1, ZP_07098889.1, CBG37051.1,
- 15 ZP_04873109.1, CBJ03626.1, ZP_08366395.1, ZP_03066301.1, BAI57243.1, YP_001465330.1, YP_405325.1, NP_312801.1, EGI89589.1, EGC09628.1, EFW73050.1, ZP_07221474.1, EGB39932.1, EFW72281.1, ZP_07154547.1, YP_002331616.1, EGB76756.1, EFZ75005.1, ZP_07449248.1, NP_756652.2, ZP_04006347.1, NP_290476.1, EGH36687.1, YP_671920.1, ZP_08350773.1, EGC05062.1, ZP_07174622.1, CAP78309.1, ZP_08361145.1,
- 20 YP_002400350.1, ZP_08386169.1, EFU60028.1, ZP_02904283.1, YP_859447.1, YP_543379.2, NP_462868.1, ZP_02663494.1, ACY91152.1, ZP_03221347.1, YP_001591071.1, YP_002639596.1, EFY10009.1, ZP_04656823.1, ZP_03213459.1, ZP_02701437.1, ZP_02347126.1, YP_002217909.1, ZP_02658976.1, YP_002245833.1, YP_002228260.1, YP_001451793.1, EGE35935.1, YP_002047992.1, ZP_02834645.1,
- 25 ZP_02669606.1, YP_001572623.1, ZP_03075319.1, YP_002148908.1, YP_004591813.1, ZP_03163685.1, YP_002043211.1, NP_457769.1, YP_003367347.1, YP_004732313.1, ZP_06546517.1, ZP_08495782.1, ZP_04558441.1, YP_002241091.1, ZP_06354348.2, ZP_06552493.1, YP_001337975.1, YP_001178655.1, CBK87780.1, ZP_05970964.1, ZP_06014071.1, YP_002917176.1, YP_152910.1, Q9F0Y7.1, ZP_08302760.1,
- 30 YP_003615422.1, YP_003943709.1, EGI93642.1, YP_001439747.1, YP_003208640.1, YP_001476499.1, ZP_06638309.1, YP_004498688.1, YP_004296470.1, ZP_06192594.1, YP_001004653.1, ZP_04634366.1, CBY29055.1, ZP_04641538.1, ZP_04628383.1,

- 73 -

ZP_04620754.1, ZP_04624649.1, YP_003739635.1, ZP_07953302.1, YP_001399280.1,
NP_667802.1, YP_068813.1, ADV97208.1, ZP_04637125.1, YP_003019595.1, YP_048335.1,
ZP_04612255.1, ZP_03831342.1, ZP_03827989.1, YP_003261565.1, ZP_04616540.1,
EFW54755.1, YP_004214864.1, BAK13441.1, YP_003518496.1, YP_003933023.1,
5 ZP_07380063.1, YP_003042702.1, YP_003713991.1, YP_003466462.1, YP_004114076.1,
YP_001906200.1, NP_931575.1, EGK17810.1, CBX79037.1, YP_003529581.1,
ZP_06937250.1, YP_002647270.1, ADP11112.1, ZP_05974166.1, ZP_03318464.1,
ZP_02958886.1, YP_003331802.1, ZP_06125606.1, YP_003006180.1, YP_003885045.1,
YP_128321.1, ZP_01236908.1, ZP_01161145.1, YP_002989323.1, YP_002154796.1,
10 YP_203408.1, ZP_08310903.1, YP_002264299.1, ZP_01221704.1, ZP_06050960.1,
ZP_03841335.1, ZP_05883431.1, YP_002153226.1, ADT85583.1, ZP_05879947.1,
ZP_04923724.1, ZP_01262258.1, ZP_06179383.1, ZP_05883853.1, EGF42158.1,
ZP_01957954.1, ZP_08101926.1, ZP_06177050.1, NP_759944.1, NP_796409.1,
ZP_04419618.1, ZP_01987794.1, ZP_05121182.1, YP_001443702.1, ZP_01948571.1,
15 ZP_01682057.1, ZP_04405432.1, NP_232384.1, ZP_04409574.1, ZP_01870127.1,
NP_932822.1, ZP_06943917.1, EGR05147.1, ZP_04961951.1, EGR10674.1, ZP_04414292.1,
ZP_05718020.1, ZP_08098153.1, ZP_05719938.1, ZP_03356468.1, ZP_07742015.1,
YP_004564872.1, ZP_01979859.1, ZP_00992843.1, ZP_05927571.1, ZP_01065523.1,
YP_002415749.1, ZP_01815881.1, ZP_02196043.1, YP_001143922.1, ZP_08518445.1,
20 ZP_06156529.1, YP_004394586.1, ZP_01900693.1, YP_854676.1, ZP_05943242.1,
CBA71812.1, ZP_01991723.1, YP_001092151.1, YP_001672251.1, YP_961420.1,
YP_003554801.1, YP_003911300.1, ADV52504.1, YP_001364252.1, YP_001552462.1,
ZP_07394327.1, YP_001048426.1, YP_002355987.1, ZP_02158912.1, ABE53312.1,
YP_561035.2, YP_748714.1, ZP_01135242.1, NP_715663.1, YP_732157.1, YP_867675.1,
25 YP_736079.1, YP_001758417.1, YP_001499882.1, YP_004436299.1, YP_659787.1,
ZP_08620874.1, YP_002309470.1, CBW44433.1, ZP_08568624.1, YP_958423.1,
YP_925914.1, YP_001471764.1, ZP_01165107.1, ZP_04717156.1, ZP_01042072.1,
ZP_08568929.1, YP_004468425.1, ZP_01614054.1, EGH60623.1, NP_744285.1,
ZP_04587907.1, EGH84450.1, YP_609235.1, Q93Q12.1, ZP_07263341.1, YP_004425808.1,
30 EGH10831.1, ZP_08142928.1, YP_435877.1, YP_004701152.1, ADR61111.1, EGH72107.1,
ZP_07255969.1, EGH76237.1, YP_154404.1, EGH66371.1, ZP_07005687.1,
YP_001268914.1, ZP_03397164.1, YP_267151.1, EGH45982.1, NP_793297.1, YP_236360.1,

- 74 -

YP_001667915.1, EGH29726.1, ZP_03561781.1, YP_275370.1, ABP88736.1, ZP_06458302.1,
YP_001748526.1, YP_002871195.1, ZP_06478839.1, EGH95845.1, YP_004067126.1,
EGH21541.1, ZP_05638744.1, Q9AHY3.2, YP_338568.1, ZP_06078672.1, YP_004352961.1,
ZP_01892768.1, ZP_06040413.1, YP_349607.1, YP_259059.1, ZP_08409548.1, ADP97276.1,
5 YP_004713990.1, YP_003626258.1, P28793.1, YP_001172246.1, YP_003810247.1,
YP_004313957.1, EGE21928.1, EGE19309.1, EGE13641.1, ZP_08462037.1, EGE13529.1,
ZP_06034789.1, EGE12165.1, AEA83639.1, YP_002798635.1, ZP_01306165.1,
YP_004474976.1, ZP_01739261.1, NP_251704.1, ACP17923.1, YP_004379416.1,
YP_001280990.1, YP_003145204.1, YP_001347517.1, ZP_06877966.1, YP_001187076.1,
10 ZP_08638729.1, YP_001340441.1, ZP_05128804.1, YP_003896827.1, YP_003073151.1,
ZP_05096745.1, ZP_01103278.1, YP_693372.1, ZP_01366482.1, ZP_05619303.1,
ZP_08328596.1, ZP_05042935.1, YP_574439.1, ZP_01074264.1, YP_004482149.1,
YP_045111.1, YP_265216.1, ZP_05362445.1, YP_001715228.1, YP_001844981.1,
YP_001708314.1, YP_581488.1, ADY83798.1, ZP_06692406.1, YP_003733838.1,
15 ZP_05824704.1, ZP_06058514.1, ZP_08554004.1, ZP_06068411.1, ZP_06067277.1,
ZP_06726497.1, ADX01983.1, ZP_03822268.1, ZP_03347927.1, ZP_01116792.1,
YP_527079.1, ZP_06063435.1, ZP_06534677.1, ZP_01219812.1, ZP_03347768.1,
YP_002798829.1, ZP_07774142.1, YP_003557881.1, ZP_06157092.1, ZP_01223872.1,
ZP_05946076.1, ZP_06499586.1, YP_003451185.1, YP_002361722.1, YP_003266103.1,
20 YP_285556.2, AAZ47086.1, NP_968701.1, ZP_06936670.1, ZP_03805048.1, YP_943922.1,
ZP_01217009.1, ADT87675.1, ZP_05877956.1, ZP_03355309.1, ZP_05885304.1,
EGK17811.1, ZP_05944972.1,
ZP_05119053.1, ZP_06039619.1, ZP_05716842.1, ZP_05721090.1, ZP_06079171.1,
ZP_06033023.1, ZP_08098475.1, ZP_08104504.1, ZP_06048048.1, ZP_01677170.1,
25 ZP_01681193.1, NP_230692.2, ZP_05926205.1, ZP_05881372.1, ZP_01975051.1,
ZP_04412573.1, ZP_01977591.1, ZP_04415061.1, ZP_06048243.1, YP_742943.1,
ZP_04962518.1, ZP_01955504.1, ZP_07741831.1, EGK33112.1, ZP_01980800.1,
CBW26643.1, EGQ99075.1, ZP_03561616.1, ZP_06155835.1, ZP_01613403.1,
YP_003147156.1, ZP_01866421.1, ZP_08569601.1, YP_004068133.1, ZP_01992793.1,
30 YP_003760621.1, NP_760849.1, NP_935233.1, YP_661240.1, CBA76402.1, YP_003527567.1,
ZP_05071916.1, YP_155382.1, ZP_08567109.1, ZP_08410490.1, YP_002357526.1,
YP_001473368.1, ZP_05061211.1, ZP_08309062.1, ZP_00990722.1, ZP_01813160.1,

- 75 -

YP_343735.1, YP_001366977.1, ZP_07393465.1, YP_002312436.1, ZP_03805047.1,
ZP_04716066.1, ZP_01043968.1, YP_562538.1, ZP_01064421.1, YP_928042.1,
YP_002416486.1, YP_962941.1, YP_001051116.1, YP_004467793.1, YP_004434876.1,
YP_001183979.1, ZP_01125518.1, YP_001555281.1, ZP_01900341.1, YP_001459147.1,
5 ADV54930.1, ZP_06054161.1, YP_001674882.1, YP_001381324.1, ZP_02158374.1,
NP_718651.1, YP_737529.1, YP_869101.1, ZP_01258852.1, ZP_05978956.1,
ZP_06179776.1, YP_733543.1, ZP_01989664.1, NP_798587.1, EGF45285.1, ZP_05908370.1,
YP_001502453.1, ZP_06639387.1, YP_003557654.1, ZP_04921889.1, YP_001436988.1,
YP_003468880.1, YP_001761392.1, YP_003267851.1, YP_004730996.1, EGL72460.1,
10 YP_003742516.1, YP_003258850.1, ZP_01132697.1, ZP_01987078.1, YP_004392689.1,
ZP_06191156.1, YP_002381996.1, ZP_06176023.1, EGC06853.1, ZP_07196084.1,
NP_754768.1, ZP_02901855.1, ZP_08620438.1, EGE30558.1, YP_003211325.1,
ZP_03220131.1, YP_217377.1, YP_003940937.1, YP_004669896.1, YP_633521.1,
YP_002041652.1, NP_456929.1, YP_001446296.1, ZP_02699767.1, YP_001586838.1,
15 YP_751355.1, ZP_08384609.1, YP_002216460.1, A8GH86.2, ZP_02667448.1,
YP_004595105.1, YP_002408448.1, YP_001479604.1, YP_149790.1, NP_461330.1,
YP_002227302.1, ZP_07187886.1, ZP_08374604.1, ZP_02343362.1, ZP_02683558.1,
YP_001141958.1, ZP_02662473.1, ZP_07151809.1, YP_004211957.1, YP_003366276.1,
YP_003713364.1, ZP_03035287.1, ZP_08364768.1, YP_002413389.1, ZP_07448710.1,
20 ZP_04656170.1, ZP_02654823.1, ZP_01222785.1, EGB63194.1, ZP_08359459.1,
YP_002636921.1, YP_002329984.1, YP_001744544.1, CAP76837.1, EFZ73229.1,
EFU57443.1, YP_002398712.1, YP_003018387.1, ZP_08520753.1, YP_541623.1,
ZP_02574174.1, ZP_07144040.1, ZP_08349090.1, CBG35413.1, ZP_04562847.1,
ZP_02195785.1, ZP_02773221.1, EGB40918.1, ZP_03050715.1, ZP_07787570.1,
25 ZP_03831301.1, YP_003003682.1, ZP_08354786.1, YP_051168.1, YP_002403607.1,
AEE57458.1, YP_856678.1, YP_001177597.1, ZP_06658276.1, NP_288914.1,
YP_002392166.1, ZP_06654274.1, ZP_07102361.1, EGB72544.1, YP_004501987.1,
ZP_03027319.1, YP_670274.1, YP_003913906.1, ZP_07097669.1, YP_001463687.1,
BAI55757.1, ZP_08553509.1, YP_003500399.1, ZP_07121648.1, ZP_01235780.1,
30 CBK87125.1, YP_002293925.1, ZP_05431367.1, YP_129175.1, ZP_03003629.1,
YP_002387809.1, ZP_03043524.1, YP_001569579.1, ZP_05435840.1, ZP_01464666.1,
YP_001724305.1, ZP_03068335.1, CBJ01980.1, AEJ57562.1, NP_416843.1,

- 76 -

YP_002920590.1, ZP_03828462.1, EGM60943.1, ZP_06351976.1, ZP_05968584.1,
EGK21055.1, YP_003040254.1, NP_708223.1, YP_689824.1, ZP_04625886.1, AEJ99232.1,
ZP_07135079.1, YP_339488.1, ZP_07247352.1, ZP_07590743.1, ZP_08303100.1,
EFU96242.1, EFZ69715.1, YP_001336370.1, YP_001094550.1, ZP_07679578.1,
5 ZP_06547779.1, EGI93593.1, YP_003438264.1, YP_003614165.1, YP_408769.1,
YP_001881164.1, YP_003655512.1, YP_002237269.1, YP_004116642.1, ZP_03065203.1,
ZP_07951118.1, CAQ79951.1, AAZ26206.1, BAK12062.1, YP_269853.2, NP_930429.2,
YP_404102.1, ZP_04620204.1, ZP_08498986.1, YP_001452041.1, ZP_01159981.1,
CAE15574.1, A1JK30.2, ZP_04635573.1, ZP_02904987.1, ZP_02961182.1, YP_001005598.1,
10 ZP_01301762.1, ZP_06016509.1, CBY28037.1, ZP_05060968.1, ZP_04632512.1,
YP_002156637.1, YP_002132807.1, Q5E3U1.2, YP_205193.1, ZP_04613435.1,
ZP_07380136.1, YP_004299028.1, YP_003334344.1, YP_001610684.1, YP_001720255.1,
YP_001400379.1, YP_652007.1, NP_668898.1, ZP_04640314.1, ADV98116.1,
ZP_03840558.1, ZP_07047543.1, ZP_03320348.1, YP_001681761.1, ZP_04615169.1,
15 ZP_08182604.1, YP_003520988.1, YP_002151536.1, NP_641653.1, ZP_08188276.1,
Q668V1.2, YP_463621.1, ZP_05032523.1, YP_363100.1, YP_002490860.1, YP_071146.1,
YP_003527951.1, YP_004615064.1, ZP_06702935.1, YP_003277339.1, ZP_06729873.1,
YP_004552309.1, ZP_08178119.1, YP_558747.1, YP_003059322.1, ZP_04628689.1,
ZP_05043496.1, YP_755774.1, NP_106254.1, NP_774461.1, YP_004145058.1, NP_636640.1,
20 YP_001411745.1, YP_244043.1, YP_003906899.1, ZP_02151779.1, EFW54754.1,
YP_004147062.1, YP_434583.1, ZP_06862658.1, YP_003559491.1, ZP_07474361.1,
ZP_07478578.1, ZP_03787298.1, ZP_06840682.1, ZP_05161835.1, ZP_06794105.1,
ZP_05181908.1, ZP_05174379.1, YP_003883888.1, NP_541475.1, NP_949054.1,
YP_003931777.1, YP_001993209.1, ZP_06124668.1, YP_001594738.1, ZP_06070710.1,
25 ZP_06484372.1, YP_002515449.1, YP_001895558.1, YP_002029364.1, ZP_02891585.1,
ZP_04682672.1, YP_003761433.1, YP_004107983.1, YP_223224.1, YP_003812264.1,
YP_001622574.1, ZP_05452320.1, YP_002734532.1, YP_001257739.1, YP_001372564.1,
ZP_05137372.1, YP_001973266.1, YP_342869.1, NP_699967.1, ZP_05086267.1,
ZP_01736760.1, YP_001914218.1, ZP_05157647.1, YP_485365.1, YP_001926123.1,
30 ZP_05116437.1, ZP_03544469.1, ZP_08330383.1, ZP_06491403.1, ZP_01896167.1,
ADP99705.1, ZP_02883593.1, YP_004228182.1, YP_570677.1, ZP_01225298.1,
YP_200487.1, YP_002988196.1, ZP_08269313.1, NP_767800.1, YP_001094989.1,

- 77 -

- ZP_06065014.1, YP_002981447.1, YP_001260831.1, YP_003817548.1, YP_532099.1,
 ZP_07676723.1, YP_001242863.1, ZP_02244047.1, YP_982073.1, YP_001899020.1,
 NP_519880.1, ZP_02379339.1, NP_946171.1, ZP_01615132.1, YP_456953.1,
 ZP_02168372.1, ZP_08552434.1, CBJ37969.1, YP_004418392.1, ZP_02362492.1,
 5 YP_004107339.1, YP_001203133.1, ZP_01546752.1, YP_002974094.1, ZP_02186892.1,
 YP_001989920.1, YP_002964466.1, ZP_03265887.1, YP_555553.1, CBA26305.1,
 ZP_06728723.1, ZP_07656835.1, ZP_05620865.1, YP_575713.1, YP_001907090.1,
 YP_002911224.1, YP_047520.1, YP_004688052.1,
 insbesondere
- 10 EGH60623.1, NP_744285.1, ZP_04587907.1, EGH84450.1, YP_609235.1, Q93Q12.1,
 ZP_07263341.1, EGH10831.1, ZP_08142928.1, YP_004701152.1, ADR61111.1, EGH72107.1,
 ZP_07255969.1, EGH76237.1, EGH66371.1, ZP_07005687.1, YP_001268914.1,
 ZP_03397164.1, EGH45982.1, NP_793297.1, YP_236360.1, YP_001667915.1, EGH29726.1,
 YP_275370.1, ABP88736.1, ZP_06458302.1, YP_001748526.1, YP_002871195.1,
 15 ZP_06478839.1, EGH95845.1, EGH21541.1, ZP_05638744.1, Q9AHY3.2, YP_004352961.1,
 YP_349607.1, YP_259059.1, YP_004713990.1, P28793.1, YP_001172246.1, AEA83639.1,
 YP_004474976.1, NP_251704.1, ACP17923.1, YP_004379416.1, YP_001347517.1,
 ZP_06877966.1, YP_001187076.1, ZP_01366482.1, ZP_07774142.1, ZP_06499586.1,
 YP_791508.1, ZP_07796310.1, NP_250428.1, YP_002441177.1, YP_001348922.1,
 20 ZP_06879352.1, AEA82038.1, YP_001170648.1, YP_004473370.1, YP_004712521.1,
 YP_004353314.1, ZP_07164313.1, NP_418288.1, YP_003231641.1, AAA23750.1,
 ZP_07192215.1, YP_001460638.1, YP_001727088.1, ZP_08380619.1, ZP_07136310.1,
 CAB40809.1, ZP_07690617.1, ZP_07103516.1, ZP_03027888.1, ZP_07121980.1,
 YP_002414996.1, EGP22873.1, EGB59499.1, ZP_07118761.1, YP_002409078.1,
 25 YP_002295407.1, EGE62412.1, EGB69560.1, ZP_06655948.1, ZP_06664574.1,
 ZP_03070699.1, ZP_07145404.1, ZP_08376058.1, EGB85466.1, ZP_07189176.1,
 ZP_02999920.1, ZP_08356523.1, ZP_06659936.1, ZP_07139396.1, YP_001746178.1,
 ZP_07098889.1, CBG37051.1, CBJ03626.1, ZP_08366395.1, BAI57243.1, YP_001465330.1,
 NP_312801.1, EGC09628.1, EFW73050.1, ZP_07221474.1, EGB39932.1, EFW72281.1,
 30 ZP_07154547.1, YP_002331616.1, EGB76756.1, EFZ75005.1, ZP_07449248.1, NP_756652.2,
 ZP_04006347.1, NP_290476.1, EGH36687.1, YP_671920.1, ZP_08350773.1, ZP_07174622.1,
 CAP78309.1, ZP_08361145.1, YP_002400350.1, ZP_08386169.1, EFU60028.1, YP_859447.1,

- 78 -

- YP_543379.2, ZP_06937250.1, ZP_06936670.1, YP_001459147.1, ZP_07196084.1, NP_754768.1, ZP_08384609.1, YP_002408448.1, ZP_07187886.1, ZP_08374604.1, ZP_07151809.1, ZP_03035287.1, ZP_08364768.1, YP_002413389.1, ZP_07448710.1, EGB63194.1, ZP_08359459.1, YP_002329984.1, YP_001744544.1, CAP76837.1,
- 5 EFZ73229.1, EFU57443.1, YP_002398712.1, YP_541623.1, ZP_07144040.1, ZP_08349090.1, CBG35413.1, ZP_02773221.1, EGB40918.1, ZP_03050715.1, ZP_07787570.1, ZP_08354786.1, YP_002403607.1, AEE57458.1, ZP_06658276.1, NP_288914.1, YP_002392166.1, ZP_06654274.1, ZP_07102361.1, EGB72544.1, ZP_03027319.1, YP_670274.1, ZP_07097669.1, YP_001463687.1, BAI55757.1, YP_003500399.1,
- 10 ZP_07121648.1, YP_002293925.1, ZP_03003629.1, YP_002387809.1, ZP_03043524.1, YP_001724305.1, ZP_03068335.1, CBJ01980.1, AEJ57562.1, NP_416843.1, ZP_07135079.1, ZP_07247352.1, ZP_07590743.1, EFU96242.1, EFZ69715.1, und besonders bevorzugt NP_744285.1, YP_004701152.1, ADR61111.1, YP_001268914.1, YP_001667915.1,
- 15 ABP88736.1, YP_001748526.1, Q9AHY3.2, YP_004713990.1, YP_001172246.1, AEA83639.1, AEA82038.1, YP_001170648.1, YP_004712521.1, YP_002871195.1, YP_349607.1, YP_259059.1, ZP_07774142.1, NP_418288.1, NP_416843.1, ZP_07593201.1, ZP_07590743.1, sowie
- 20 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
- 25 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
- 30 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_d und E_e generell insbesondere die Umsetzung von 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester zu 3-Oxo-Dodecanoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_f

- 5 Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass in den erfindungsgemäßen Zellen das Enzym E_f eines darstellt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus:
- YP_026272.1, YP_002389323.1, EGB30581.1, YP_001460637.1, YP_001727089.1, CAB40810.1, EGK16565.1, NP_709649.1, YP_001882545.1, ZP_08356522.1, ZP_06664573.1, AAA67642.1, ADA76222.1, EGK17812.1, YP_405326.1, YP_003236969.1,
- 10 ZP_06659935.1, YP_410143.1, NP_290475.1, ZP_03027945.1, EFZ59092.1, YP_002295406.1, CBG37050.1, EGP22872.1, EGE62411.1, EGC97040.1, ZP_05435276.1, YP_002400349.1, EGB59498.1, EFW54756.1, ZP_08361144.1, YP_001465329.1, YP_002384701.1, YP_002409079.1, ZP_06655947.1, YP_002414995.1, EGB69559.1, YP_859446.1, EGC05061.1, ZP_02904263.1, ZP_08386168.1, YP_543378.1, ZP_08366394.1,
- 15 ZP_03066325.1, YP_001746177.1, ZP_07154548.1, ZP_03070708.1, NP_756651.1, YP_312775.1, YP_671919.1, YP_002331615.1, YP_003367348.1, ZP_07449249.1, ZP_04558440.1, ZP_06354347.1, YP_001451792.1, YP_004732312.1, ZP_06938722.1, NP_457770.1, ZP_02834646.1, ZP_02658975.1, ZP_03221210.1, EFY10008.1, YP_001591070.1, YP_218866.1, YP_003943710.1, ZP_03086141.1, ZP_03163187.1,
- 20 ZP_08495783.1, EGE35936.1, YP_003615423.1, YP_002228261.1, YP_002148907.1, ZP_05970963.1, YP_002241092.1, YP_004591812.1, YP_001178656.1, ZP_08302761.1, YP_002917175.1, YP_001337974.1, Q9F0Y6.1, ZP_06014072.1, YP_001439748.1, YP_003208639.1, 3GOA_A, YP_003739634.1, ZP_06192593.1, YP_001906199.1, YP_001476498.1, YP_003019596.1, YP_003261566.1, ZP_03831341.1, ZP_07380062.1,
- 25 YP_048334.1, YP_003933022.1, ZP_07953301.1, YP_004114075.1, YP_002647269.1, ADP11111.1, ZP_03827988.1, ZP_06638308.1, YP_004214865.1, YP_003518495.1, ZP_04616541.1, BAK13440.1, CBX79036.1, YP_003529580.1, ZP_04628384.1, ZP_04634365.1, ZP_04641537.1, ZP_04612254.1, ZP_04637126.1, YP_003331801.1, YP_001004652.1, YP_004296469.1, YP_003006181.1, ZP_04620755.1, YP_003885046.1,
- 30 ZP_04624648.1, NP_667801.1, EGI89588.1, YP_128320.1, ZP_01221705.1, YP_002989324.1, ZP_01236909.1, ZP_01161146.1, ZP_08310904.1, YP_003713992.1, YP_003466461.1, NP_931576.1, YP_003042703.1, ZP_06050959.1, EGF42157.1,

- 80 -

ZP_00992844.1, YP_002415748.1, ZP_01065522.1, ZP_05883432.1, ZP_05879948.1,
ZP_06156528.1, ZP_05927570.1, ZP_07189177.1, YP_004564871.1, ZP_01870126.1,
ZP_02196042.1, YP_003911299.1, ZP_01815882.1, NP_796408.1, YP_004394587.1,
ZP_08518444.1, YP_854675.1, ZP_07742014.1, ZP_01135243.1, YP_002154795.1,
5 NP_759945.1, YP_001143923.1, NP_932821.1, Q5E8X7.2, ZP_08568928.1, ZP_06078671.1,
ZP_05718021.1, ZP_01948567.1, YP_203407.3, ZP_04923725.1, ZP_05719937.1,
YP_002309469.1, ZP_06179384.1, ZP_06048881.1, ZP_01979851.1, ZP_01262259.1,
ZP_01957951.1, ZP_04405431.1, ZP_08098152.1, ZP_06034494.1, YP_001758416.1,
ZP_04414293.1, ZP_06040414.1, ZP_01682043.1, NP_232385.1, ZP_05883854.1,
10 YP_002264298.1, ZP_01987792.1, YP_338567.1, ZP_01900694.1, YP_001672250.1,
YP_925913.1, YP_001499881.1, ZP_02158913.1, YP_001471763.1, NP_715662.1,
YP_748713.1, YP_736078.1, ZP_08568623.1, ZP_02958885.2, YP_004067125.1,
ZP_08409549.1, YP_001181547.1, ADV52503.1, YP_732156.1, YP_001092150.1,
YP_003554800.1, YP_001048425.1, YP_961419.1, YP_561034.1, ZP_06125607.2,
15 YP_867674.1, YP_001443701.1, ZP_05943241.1, ZP_05121169.1, ZP_05974167.1,
ZP_03318463.1, ZP_08620875.1, ZP_01042073.1, YP_154403.1, ZP_04717155.1,
ZP_03805050.1, YP_004468426.1, ZP_03841336.1, YP_002153225.1, YP_004425807.1,
ZP_03351120.1, YP_659788.1, YP_004436298.1, YP_267150.1, ZP_06034790.1,
YP_003145205.1, ZP_03561780.1, YP_003810248.1, ZP_05043383.1, YP_693373.1,
20 ZP_01306166.1, YP_004313956.1, YP_790159.1, ZP_06877967.1, NP_251703.1,
YP_004482148.1, EGH66370.1, EGH10832.1, YP_349606.1, YP_236359.1, ZP_07263340.1,
EGH95844.1, ZP_03368595.1, NP_793296.1, ZP_01165108.1, 1WDK_C, P28790.2,
YP_259060.1, ZP_01074263.1, ZP_04587908.1, EGH45981.1, ZP_07774144.1, EGH84449.1,
YP_958424.1, YP_275369.1, ZP_07005686.1, YP_001172247.1, YP_004352962.1,
25 ACP17922.1, YP_002871196.1, YP_435876.1, ZP_01739262.1, YP_003557880.1,
ZP_01892767.1, ZP_08142929.1, ZP_08462036.1, YP_004701153.1, YP_001667916.1,
YP_001280989.1, YP_001268913.1, Q93Q11.1, ZP_05619304.1, AEA79634.1, Q9R9W0.1,
NP_744286.1, YP_001187077.1, YP_609234.1, ADP97277.1, YP_045110.1, YP_004379417.1,
YP_003626259.1, ZP_06692405.1, ZP_06063436.1, YP_003733839.1, EGE12166.1,
30 ZP_05824703.1, EGE26385.1, EGE13530.1, YP_004474975.1, YP_001708315.1,
EGE16076.1, ZP_06726496.1, ZP_06067276.1, ZP_06058513.1, ZP_06068412.1,
ZP_06157093.1, ZP_03822267.1, A3M1H9.2, YP_001340442.1, ZP_05362446.1, ABP88737.1,

- 81 -

ZP_01219813.1, ZP_08638730.1, YP_265215.1, YP_581487.1, YP_003896828.1,
YP_002798636.1, ZP_01678475.1, ZP_05946075.1, YP_527080.1, ZP_08554005.1,
ZP_03360083.1, YP_574438.1, YP_003073152.1, YP_001083375.1, ZP_08648989.1,
YP_001982171.1, ZP_05096741.1, ZP_03336985.1, ZP_01103277.1, ZP_07136312.1,
5 ZP_08328590.1, ZP_05128805.1, EGH76239.1, ZP_03377529.1, CBA71811.1, EFZ47010.1,
ZP_03377530.1, ZP_07136311.1, EFZ47009.1, EGH29725.1, YP_003022611.1,
YP_002138248.1, ZP_01462439.1, ZP_06499584.1, YP_004669687.1, YP_633289.1,
ZP_01907074.1, YP_001611010.1, ADI22030.1, ZP_03026937.1, YP_580525.1,
YP_003265025.1, YP_001525888.1, YP_002298157.1, YP_002945338.1, YP_003271056.1,
10 YP_004198848.1, ZP_01895445.1, ZP_08636846.1, ADP95813.1, ZP_03357270.1,
YP_002535575.1, YP_160280.1, YP_385012.1, YP_004154467.1, YP_742957.1,
YP_984918.1, ZP_07949467.1, YP_002552054.1, YP_003439807.1, YP_002919224.1,
YP_001475439.1, ZP_07652842.1, YP_001335140.1, YP_972400.1, ZP_08308052.1,
YP_001749490.1, YP_004594280.1, ZP_05360584.1, YP_002490812.1, ZP_03336986.1,
15 YP_004236457.1, ZP_08387650.1, YP_046370.1, ZP_03823670.1, AEJ97944.1,
ZP_06188204.1, ABF82237.1, ZP_06016043.1, YP_046135.1, YP_942111.1, ZP_01614052.1,
YP_001341942.1, YP_004713534.1, ZP_01460231.1, YP_001630800.1, YP_001264278.1,
CAD76924.1, ZP_07200324.1, YP_550745.1, YP_001413963.1, YP_002132758.1,
ZP_05972210.1, ZP_06065848.1, ZP_08209169.1, ZP_06061642.1, ZP_05109438.1,
20 YP_001419321.1, YP_463572.1, YP_608369.1, YP_001683323.1, AEA83130.1,
YP_001230361.1, YP_001832875.1, YP_002237684.1, AAN39378.1, YP_001019613.1,
YP_426398.1, ZP_03543802.1, YP_001171793.1, YP_002138936.1, YP_001562369.1,
ZP_01786296.1, YP_001528043.1, NP_881363.1, ZP_04625099.1, ZP_02187462.1,
YP_002355162.1, YP_248479.1, ZP_07043392.1, YP_002028041.1, YP_001900023.1,
25 ZP_01792340.1, ZP_03541158.1, NP_438930.1, ZP_04464778.1, YP_003278968.1,
YP_004490499.1, ZP_07662038.1, AAM48101.1, YP_422117.1, YP_524752.1, YP_918568.1,
YP_001264814.1, YP_003807823.1, YP_001260276.1, ZP_07046088.1, ZP_01784141.1,
ZP_05135853.1, YP_002982015.1, EEZ80724.1, YP_001292714.1, YP_001971860.1,
YP_788379.1, ZP_05783989.1, YP_004415862.1, CAE45106.1, YP_004618019.1,
30 ZP_01126529.1, ZP_06062289.1, YP_004538662.1, NP_248919.1, YP_001098905.1,
YP_003847633.1, YP_002432816.1, YP_003280245.1, A64092, ZP_08404839.1,
YP_003466069.1, YP_001348923.1, YP_158582.1, YP_004229600.1, ZP_07797976.1,

YP_001416028.1, YP_001747677.1, YP_002362051.1, YP_931973.1, ZP_08505255.1,
EGP53986.1, NP_250427.1, YP_366806.1, ZP_04638299.1, ZP_08485306.1,
YP_001675166.1, AAA23322.1, NP_927515.1, AAR83740.1, YP_433439.1, YP_001668851.1,
YP_001713606.1, YP_002354475.1, ZP_06548530.1, ZP_04764695.1, ZP_01910282.1,
5 YP_004146469.1, YP_095382.1, ZP_06495825.1, YP_003777379.1, ZP_01914912.1,
ZP_06895226.1, YP_004379898.1, YP_003365234.1, YP_001784146.1, YP_003021900.1,
YP_004555586.1, YP_001101071.1, CBW99592.1, YP_003254723.1, AAG30258.1,
YP_004536011.1, NP_884797.1, NP_635761.1, YP_002429235.1, YP_001901798.1,
ZP_06485970.1, YP_123631.1, YP_001352245.1, ZP_03697428.1, ZP_05824476.1,
10 ZP_01014491.1, EGH60624.1, YP_004028852.1, ZP_04633718.1, YP_001846659.1,
ZP_04933402.1, YP_003731942.1, YP_001345710.1, YP_003979747.1, ZP_00053266.1,
YP_126656.1, YP_003442067.1, YP_585810.1, ZP_01614053.1, ZP_06690229.1,
YP_001858908.1, ZP_01128624.1, NP_888558.1, ZP_05827098.1, Q8VPF1.1,
YP_004473788.1, EGH77345.1, P45363.1, EGH44350.1, YP_001676522.1, ZP_05824514.1,
15 ZP_06487592.1, ZP_02887415.1, ZP_04761513.1, YP_003377502.1, YP_001188713.1,
ZP_01167911.1, ZP_06690267.1, YP_004680403.1, YP_003731982.1, YP_002800937.1,
YP_001758618.1, YP_004380648.1, YP_001188079.1, YP_001707349.1, YP_004687867.1,
CAZ89607.1, ZP_05827058.1, ZP_08142248.1, YP_195739.1, YP_004703691.1,
YP_001354779.1, ZP_08627639.1, ZP_04936650.1, NP_642338.1, ZP_03451105.1,
20 YP_001713567.1, EFV87627.1, YP_728366.1, YP_002912837.1, YP_001707333.1,
YP_363794.1, YP_003524466.1, YP_959751.1, YP_606872.1, YP_102034.1,
YP_002942733.1, YP_002238110.1, ZP_05032457.1, YP_001846620.1, YP_004153168.1,
ZP_02462362.1, YP_003777513.1, YP_199120.1, ZP_08179077.1, ZP_08188845.1,
YP_107279.1, ADP98459.1, YP_004157409.1, YP_610092.1, EGP55478.1, CBJ37328.1,
25 ZP_08181461.1, ZP_06842278.1, ZP_06703672.1, ADR61907.1, ZP_06688595.1,
ZP_04934614.1, ZP_07262554.1, YP_786611.1, YP_003439146.1, YP_003592852.1,
YP_001747891.1, YP_004386570.1, Q51956.1, YP_004593695.1, YP_560516.1,
ZP_06731844.1, YP_001897101.1, ZP_08388430.1, YP_001166210.1, YP_557015.1,
ZP_06843809.1, EGP42659.1, YP_002005592.1, YP_002871766.1, YP_555845.1,
30 ZP_05921114.1, NP_746745.1, NP_637343.1, ZP_02243308.1, YP_001267798.1,
ZP_02354510.1, NP_841567.1, ZP_08177693.1, YP_004703877.1, YP_001166143.1,
EGH73771.1, ZP_06489206.1, ZP_01892079.1, YP_934562.1, ADY81955.1, EGB73439.1,

- 83 -

NP_520373.1, YP_003905682.1, EGH61062.1, YP_001894311.1, ZP_02245330.1,
YP_918778.1, YP_001120651.1, YP_003612896.1, YP_004125334.1, ZP_07952596.1,
YP_001479268.1, ZP_07043083.1, YP_003644271.1, NP_421210.1, ZP_02882590.1,
EGP25245.1, YP_233920.1, EGD00226.1, YP_004418315.1, ADY81914.1, ZP_04944762.1,
5 YP_003603999.1, YP_001060552.1, ZP_03026966.1, YP_441123.1, YP_201177.1,
ZP_05117283.1, YP_004232360.1, YP_002802211.1, YP_106085.1, YP_258448.1,
YP_001989549.1, NP_945866.1, ZP_03573123.1, YP_283604.1, YP_004702122.1,
ZP_03398400.1, YP_105310.1, YP_001479310.1, CAC41637.1, ZP_02372747.1,
YP_001578772.1, ZP_08181762.1, ZP_00439074.2, ADX92638.1, ZP_03790444.1,
10 YP_110295.1, YP_002439726.1, YP_004361986.1, ZP_04946665.1, YP_003751825.1,
YP_001061488.1, ZP_03545148.1, ZP_01767462.1, ZP_01769818.1, YP_990241.1,
YP_002382777.1, YP_002898389.1, YP_003452421.1, EGH66881.1, CBW26817.1,
YP_004352451.1, EGC07165.1, YP_003982691.1, ZP_02906520.1, YP_410799.1,
YP_001189077.1, YP_004226900.1, ADP96997.1, YP_237079.1, YP_002946310.1,
15 YP_004029037.1, NP_745423.1, ZP_08139209.1, YP_004294989.1, NP_251630.1,
EGH73592.1, ZP_04934925.1, ZP_03583227.1, ZP_03584241.1, YP_004684330.1,
YP_004501533.1, YP_001186637.1, YP_003980170.1, AEJ98540.1, YP_004688333.1,
YP_003276725.1, EGH11975.1, YP_276147.1, YP_790233.1, ZP_01736635.1,
YP_002440908.1, YP_002230040.1, YP_724980.1, YP_004231717.1, ZP_01226775.1,
20 ZP_03454556.1, ZP_05586076.1, ZP_02890239.1, YP_001172996.1, ZP_02377875.1,
ZP_07202399.1, YP_774661.1, YP_440314.2, YP_443408.1, ZP_06878044.1,
ZP_08274339.1, YP_001618203.1, ZP_08631485.1, ZP_01545529.1, ZP_03267843.1,
ZP_07797009.1, YP_003376084.1, EGH21143.1, YP_003753513.1, YP_004282234.1,
YP_726356.1, ZP_06014951.1, YP_109637.1, ZP_06461447.1, YP_001795795.1,
25 YP_621981.1, ZP_07794257.1, ZP_05060451.1, YP_002919830.1, YP_001796645.1,
NP_794063.1, ZP_01365347.1, YP_003610065.1, YP_001462757.1, YP_001807185.1,
ZP_04928407.1, YP_002229986.1, ZP_02883901.1, YP_370284.1, ZP_05053491.1,
AAC24332.1, ZP_04929241.1, ZP_00943679.1, YP_001766064.1, YP_001670661.1,
YP_003296167.1, YP_003773673.1, NP_250691.1, ZP_05823066.1, YP_004381309.1,
30 YP_004714773.1, YP_746962.1, YP_002513585.1, YP_294674.1, YP_004593822.1,
YP_622032.1, YP_001897940.1, YP_001335713.1, YP_001856626.1, YP_791238.1,
YP_004140309.1, YP_001269802.1, ZP_06879064.1, ZP_01736318.1, ZP_02886139.1,

- 84 -

- ZP_04941413.1, YP_001670851.1, YP_371023.1, YP_002980343.1, YP_002795605.1,
 ZP_06069679.1, ZP_02463309.1, ZP_05785212.1, YP_001793049.1, YP_003965283.1,
 YP_001233153.1, YP_299776.1, ZP_06498740.1, AEJ99148.1, YP_004685690.1,
 YP_003746771.1, YP_004381943.1, YP_004378973.1, YP_004314684.1, EGH79619.1,
 5 ZP_04882546.1, YP_347001.1, YP_347471.1, YP_001757758.1, YP_002911324.1,
 NP_518596.1, ZP_00948908.1, YP_442777.1, YP_002874183.1, YP_002230989.1,
 YP_004360850.1, ABC36127.1, YP_004696127.1, YP_002799527.1, YP_001631275.1,
 YP_626125.1, ZP_05090649.1, ZP_07774002.1, ZP_04940525.1, AEK60371.1, ADR60119.1,
 YP_102981.1, YP_003451423.1, NP_743536.1, CAA45255.1,
 10 insbesondere
 YP_790159.1, ZP_06877967.1, NP_251703.1, EGH66370.1, EGH10832.1, YP_349606.1,
 YP_236359.1, ZP_07263340.1, EGH95844.1, NP_793296.1, 1WDK_C, P28790.2,
 YP_259060.1, ZP_04587908.1, EGH45981.1, ZP_07774144.1, EGH84449.1, YP_275369.1,
 ZP_07005686.1, YP_001172247.1, YP_004352962.1, ACP17922.1, YP_002871196.1,
 15 ZP_08142929.1, YP_004701153.1, YP_001667916.1, YP_001268913.1, Q93Q11.1,
 Q9R9W0.1, NP_744286.1, YP_001187077.1, YP_609234.1, YP_004379417.1,
 YP_004474975.1, ABP88737.1, EGH76239.1, EGH29725.1, ZP_06499584.1,
 YP_001749490.1, ABF82237.1, YP_004713534.1, CAD76924.1, YP_608369.1, AEA83130.1,
 YP_001171793.1, YP_788379.1, CAE45106.1, NP_248919.1, YP_001348923.1,
 20 ZP_07797976.1, YP_001747677.1, NP_250427.1, AAR83740.1, YP_001668851.1,
 ZP_06495825.1, YP_004379898.1, EGH60624.1, ZP_04933402.1, YP_001345710.1,
 Q8VPF1.1, YP_004473788.1, EGH77345.1, EGH44350.1, YP_001188713.1, YP_004380648.1,
 YP_001188079.1, ZP_08142248.1, YP_004703691.1, ZP_04936650.1, YP_606872.1,
 YP_610092.1, ADR61907.1, ZP_04934614.1, ZP_07262554.1, YP_001747891.1, Q51956.1,
 25 YP_002871766.1, NP_746745.1, YP_001267798.1, YP_004703877.1, EGH73771.1,
 EGH61062.1, YP_233920.1, YP_258448.1, YP_004702122.1, ZP_03398400.1,
 YP_002439726.1, EGH66881.1, YP_004352451.1, YP_001189077.1, YP_237079.1,
 NP_745423.1, ZP_08139209.1, NP_251630.1, EGH73592.1, ZP_04934925.1,
 YP_001186637.1, EGH11975.1, YP_276147.1, YP_790233.1, YP_002440908.1,
 30 YP_001172996.1, ZP_06878044.1, ZP_07797009.1, EGH21143.1, ZP_06461447.1,
 ZP_07794257.1, NP_794063.1, ZP_01365347.1, ZP_04928407.1, AAC24332.1,
 ZP_04929241.1, YP_001670661.1, NP_250691.1, YP_004381309.1, YP_004714773.1,

- 85 -

- YP_791238.1, YP_001269802.1, ZP_06879064.1, YP_001670851.1, ZP_06498740.1,
YP_004381943.1, YP_004378973.1, EGH79619.1, YP_347001.1, YP_347471.1,
YP_002874183.1, ZP_07774002.1, ADR60119.1, NP_743536.1, YP_001269653.1,
ZP_06482365.1, ADI95330.1, ZP_07003619.1, BAB96553.1, ZP_07777009.1, ABA10831.1,
5 YP_273131.1, YP_259428.1, EFW86233.1, EGH85840.1, ZP_07774597.1, EGH54613.1,
YP_004353129.1, YP_002871014.1, YP_001171232.1, EGH67454.1, EFW82139.1,
ZP_04590526.1, EGH58132.1, EGH06629.1, EGH99157.1, ZP_05638078.1, NP_790796.1,
AEE59172.1, YP_026272.1, YP_002389323.1, EGB30581.1, YP_001460637.1,
YP_001727089.1, CAB40810.1, ZP_03049054.1, ZP_08356522.1, ZP_06664573.1,
10 AAA67642.1, YP_003236969.1, ZP_06659935.1, NP_290475.1, ZP_03027945.1, EFZ59092.1,
YP_002295406.1, CBG37050.1, EGP22872.1, EGE62411.1, YP_002400349.1, EGB59498.1,
ZP_08361144.1, YP_001465329.1, YP_002409079.1, ZP_06655947.1, YP_002414995.1,
EGB69559.1, YP_859446.1, ZP_08386168.1, YP_543378.1, ZP_08366394.1,
YP_001746177.1, ZP_07154548.1, ZP_03070708.1, NP_756651.1, YP_671919.1,
15 YP_002331615.1, ZP_07449249.1, ZP_06938722.1, ZP_03086141.1, ZP_07189177.1,
ZP_07136312.1, EFZ47010.1, ZP_07136311.1, EFZ47009.1, ZP_03026937.1, EGB73439.1,
EGP25245.1, ZP_03026966.1, YP_001462757.1, CAP76727.1, YP_670163.1,
und besonders bevorzugt
YP_026272.1, AAA67642.1, ZP_07593202.1, YP_004701153.1, YP_001667916.1,
20 YP_001268913.1, Q9R9W0.1, NP_744286.1, ABP88737.1, YP_001749490.1,
YP_001747677.1, YP_001668851.1, YP_004703691.1, ADR61907.1, YP_001747891.1,
Q51956.1, NP_746745.1, YP_001267798.1, YP_004703877.1, YP_004702122.1,
NP_745423.1, AAC24332.1, YP_001670661.1, YP_001269802.1, YP_001670851.1,
ADR60119.1, NP_743536.1, YP_001269653.1, ADI95330.1, BAB96553.1, YP_001172247.1,
25 YP_004713534.1, AEA83130.1, YP_001171793.1, YP_001172996.1, YP_004714773.1,
YP_001171232.1, YP_349606.1, YP_259060.1, ZP_07774144.1, YP_002871196.1,
ABF82237.1, YP_002871766.1, YP_258448.1, YP_347001.1, YP_347471.1, YP_002874183.1,
ZP_07774002.1, ZP_07777009.1, YP_259428.1, ZP_07774597.1, YP_002871014.1,
30 AAC72881.1, ABB71579.1, CAC19934.1, AAC49180.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 10),
AAC49783.1, AAC49179.1, CAB60830.1, ABB71581.1, AAC49269.1, CAC19933.1,
CAA54060.1, AAC72882.1, Q39513.1, AAC49784.1, ABO38558.1, ABO38555.1, ABO38556.1,

- 86 -

ABO38554.1, ADB79568.1, ADB79569.1, ACQ57188.1, ACQ57189.1, ABK96561.1,
ACQ63293.1, ACQ57190.1, Q9SQI3.1, ABU96744.1, ABC47311.1, XP_002324962.1,
AAD01982.1, AAB51525.1, ACV40757.1, XP_002309244.1, CBI28125.3, ABD91726.1,
XP_002284850.1, XP_002309243.1, XP_002515564.1, ACR56792.1, ACR56793.1,
5 XP_002892461.1, ABI18986.1, NP_172327.1, CAA85387.1, CAA85388.1, ADA79524.1,
ACR56795.1, ACR56794.1, CAN81819.1, ACF17654.1, AAB71729.1, ABH11710.1,
ACQ57187.1, AAX51637.1, AAB88824.1, AAQ08202.1, AAB71731.1, AAX51636.1,
CAC80370.1, CAC80371.1, AAG43858.1, ABD83939.1, AAD42220.2, AAG43860.1,
AAG43861.1, AAG43857.1, AAL15645.1, AAB71730.1, NP_001068400.1, EAY86877.1,
10 NP_001056776.1, XP_002436457.1, NP_001149963.1, ACN27901.1, EAY99617.1,
ABL85052.1, XP_002437226.1, NP_001151366.1, ACF88154.1, NP_001147887.1,
XP_002453522.1, BAJ99650.1, EAZ37535.1, EAZ01545.1, AAN17328.1, EAY86884.1,
EEE57469.1, Q41635.1, AAM09524.1, Q39473.1, NP_001057985.1, AAC49001.1,
XP_001752161.1, XP_001770108.1, XP_001784994.1, XP_002318751.1, NP_001047567.1,
15 XP_002322277.1, XP_002299627.1, XP_002511148.1, CBI15695.3, XP_002299629.1,
XP_002280321.1, CAN60643.1, XP_002459731.1, XP_002975500.1, XP_002962077.1,
XP_001773771.1, NP_001151014.1, XP_002317894.1, XP_002971008.1, XP_001774723.1,
XP_002280147.1, XP_002526311.1, XP_002517525.1, XP_001764527.1, ABI20759.1,
BAD73184.1, XP_002987091.1, XP_002985480.1, CBI26947.3, ABI20760.1, XP_002303055.1,
20 XP_002885681.1, ADH03021.1, XP_002532744.1, EAY74210.1, EEC84846.1, EEE54649.1,
AAG35064.1, AAC49002.1, CAD32683.1, ACF78226.1, BAJ96402.1, XP_002462626.1,
NP_001130099.1, XP_002462625.1, ABX82799.3, Q42712.1, NP_193041.1, AAB51524.1,
NP_189147.1, ABR18461.1, XP_002863277.1, AAC72883.1, AAA33019.1, CBI40881.3,
XP_002262721.1, AAB51523.1, NP_001063601.1, ADB79567.1, AAL77443.1, AAL77445.1,
25 AAQ08223.1, AAL79361.1, CAA52070.1, AAA33020.1, CAA52069.1, XP_001785304.1,
CAC39106.1, XP_002992591.1, XP_002968049.1, XP_001770737.1, XP_001752563.1,
AAG43859.1, XP_002978911.1, XP_002977790.1, ACB29661.1, XP_002314829.1,
XP_002991471.1, EAZ45287.1, XP_002986974.1, EEC73687.1, XP_002312421.1,
ACJ84621.1, NP_001150707.1, AAD28187.1, XP_001759159.1, XP_001757193.1,
30 XP_002322077.1, ABE01139.1, XP_002447294.1, AAX54515.1, AAD33870.1, AAX54514.1,
CBI15694.3, XP_002270653.1, AAZ83073.1, CAC14164.1, XP_001753224.1, CBI35766.3,

- 87 -

ACU22895.1, BAC43222.1, XP_002965875.1, AAX54516.1, XP_002983123.1,
XP_002447046.1, ACL52706.1, CAA06001.1, XP_001772711.1,
sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
5 bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste
gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
10 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
15 des Enzyms E_f generell insbesondere die Reaktion von 3-Oxo-Dodecanoyl-CoA-Thioester und
CoA zu Decanoyl-CoA-Thioester und Acetyl-CoA verstanden wird.

Sechste gentechnische Modifikation zur Verstärkung der Acyl-ACP-Thioester-Synthese

20 Erfindungsgemäß weisen die Mikroorganismen eine sechste gentechnische Modifikation auf, so
dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Acyl-ACP-Thioester aus mindestens einer einfachen
Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Ein Überblick über entsprechend wünschenswerte
gentechnische Modifikationen ist der Abb. 1 der WO2008119082, Abschnitt 1 (Fatty Acid
25 Production Increase / Product Production Increase) zu entnehmen.
Dies hat den technischen Effekt, dass die durch die erste gentechnische Modifikation verstärkte
Bildung von Carbonsäuren und Carbonsäurederivaten, aber auch von durch die zweite, dritte,
vierte oder fünfte gentechnische Modifikation vermehrt gebildeten Carbonsäuren und
Carbonsäurederivaten, noch weiter verstärkt wird.

30

Bevorzugte Mikroorganismen zur Herstellung von Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen, Alkanen, Olefinen, Alken-1-alen, Alken-1-olen und Alken-1-aminen

Sollen die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in einem Verfahren zur Herstellung von Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen, Alkanen, Alken-1-alen, Alken-1-olen und Alken-1-aminen und terminalen Olefinen, welche gegebenenfalls weitere Doppelbindungen enthalten verwendet werden, kann es vorteilhaft sein, wenn die erfindungsgemäßen Mikroorganismen eine siebte gentechnische Veränderung umfassend eine verglichen zu ihrem Wildtyp verminderte Aktivität mindestens eines Enzyms E₁ aufweisen, ausgewählt aus der Gruppe:

- 10 E_{1a} P450 Alkanhydroxylasen, welche bevorzugt die folgenden Reaktionen katalysieren:
 reduziertes Häm + Alkansäure(ester) = oxidiertes Häm + ω-Hydroxy-Alkansäure(ester) + H₂O,
 2 reduziertes Häm + Alkansäure(ester) = 2 oxidiertes Häm + ω-Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H₂O
 oder
 3 reduziertes Häm + Alkansäure(ester) = Alkanmonooxygenase + 3 oxidiertes Häm + ω-Carboxy-
 15 Alkansäure(ester) + 3 H₂O und bevorzugt
 Bestandteil eines Reaktionssystems bestehend aus den zwei Enzym-Komponenten „Cytochrom
 P450 Alkanhydroxylase und NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase der EC 1.6.2.4“ oder
 Bestandteil eines Reaktionssystems bestehend aus den drei Enzym-Komponenten „Cytochrom
 P450 Alkanhydroxylase vom CYP153-Typ, Ferredoxin-NAD(P)⁺-Reduktasen der EC 1.18.1.2
 20 oder EC 1.18.1.3 und Ferredoxin“ darstellen, und
 E_{1b} AlkB Alkanhydroxylasen der EC 1.14.15.3, welche bevorzugt die folgenden Reaktionen
 katalysieren: reduziertes Rubredoxin + Alkansäure(ester) = oxidiertes Rubredoxin + ω-Hydroxy-
 Alkansäure(ester) + H₂O,
 2 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = 2 oxidierte Rubredoxine + ω-Oxo-
 25 Alkansäure(ester) + 2 H₂O oder
 3 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanmonooxygenase + 3 oxidierte Rubredoxine
 + ω-Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H₂O und bevorzugt
 Bestandteil eines Reaktionssystems bestehend aus den drei Enzym-Komponenten „AlkB
 Alkanhydroxylase der EC 1.14.15.3, AlkT Rubredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase der EC 1.18.1.1 oder
 30 der EC 1.18.1.4 und Rubredoxin AlkG“ darstellen,
 E_{1c} Fettalkoholoxidasen der EC 1.1.3.20, welche bevorzugt mindestens eine der folgenden
 irreversiblen Reaktionen katalysieren:

Alkan-1-ol + O₂ = Alkan-1-al + H₂O₂ oder

Alkan-1-al + O₂ = Alkansäure + H₂O₂,

E_{1d} AlkJ Alkoholdehydrogenasen der EC 1.1.99.-, welche bevorzugt mindestens eine der folgenden reversiblen Reaktionen katalysieren:

5 Alkan-1-ol + oxidiertes Akzeptor = Alkan-1-al + reduziertes Akzeptor oder

Alkan-1-al + oxidiertes Akzeptor = Alkansäure + reduziertes Akzeptor,

E_{1e} Alkoholdehydrogenasen der EC 1.1.1.1 oder EC 1.1.1.2, welche bevorzugt mindestens eine der folgenden reversiblen Reaktionen katalysieren:

Alkan-1-ol + NAD(P)⁺ = Alkan-1-al + NAD(P)H + H⁺ oder

10 Alkan-1-al + NAD(P)⁺ = Alkansäure + NAD(P)H + H⁺ und

E_{1f} Aldehyddehydrogenasen der EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 oder EC 1.2.1.5, welche bevorzugt die folgende reversible Reaktion katalysieren:

Alkan-1-al + NAD(P)⁺ = Alkansäure + NAD(P)H + H⁺

15 Insbesondere für die Herstellung von Alkan-1-olen kann es vorteilhaft sein, wenn die erfindungsgemäßen Mikroorganismen eine verglichen zu ihrem Wildtyp erhöhte Aktivität mindestens eines Enzyms E_{1e} und E_{1f} aufweisen.

Die WO2010062480 A2 beschreibt insbesondere in den Ausführungsbeispielen 3, 4, 6 und 7 Mikroorganismen, die verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Fettsäuren und Fettsäurederivate,

20 insbesondere Fettalkohole, aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen. Die Schrift beschreibt auch erfindungsgemäß bevorzugte Enzyme E_{1e} und deren Sequenzen insbesondere in der Abbildung 10 sowie den Ausführungsbeispielen 2 bis 7.

Sollten die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in einem Verfahren zur Herstellung von

25 Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen und Alkanen verwendet werden, ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, wenn die Aktivität solcher Enzyme E_{1a} bis E_{1f} vermindert wird, welche die oben beschriebenen Reaktionen von einem Alkan-1-al zur korrespondierenden Alkansäure katalysieren.

30 Sollten die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in einem Verfahren zur Herstellung von Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen, Alkanen und 1-Alkenen verwendet werden, ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, wenn die Aktivität solcher Enzyme E_{1a} bis E_{1e}

- 90 -

vermindert wird, welche die oben beschriebene Umwandlung von einem Alkan-1-al zum korrespondierenden Alkan-1-ol katalysieren.

5 Sollten die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in einem Verfahren zur Herstellung von Alkan-1-olen verwendet werden, ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, wenn die Aktivität solcher Enzyme E_{1a} bis E_{1e} vermindert wird, welche die oben beschriebene Umwandlung von einem Alkan-1-ol zum korrespondierenden Alkan-1-al katalysieren.

10 *Bestimmte Enzyme E_{1a}*

In diesem Zusammenhang bevorzugte P450 Alkanhydroxylasen E_{1a} sind ausgewählt aus der Liste

AAO73954.1, AAO73953.1, XP_002546279.1, AAA34353.2, P30607.1, XP_002421627.1,
 15 XP_718670.1, CAA39366.1, XP_001527524.1, AAO73955.1, AAO73956.1, XP_002546278.1, EEQ43157.1, XP_718669.1, AAA34354.1, P10615.3, XP_002421628.1, 226487, P16141.3, CAA39367.1, Q9Y757.2, XP_001485567.1, AAO73958.1, XP_001383506.2, XP_460111.2, AAO73959.1, Q12586.1, XP_460112.2, AAO73960.1, Q12589.1, AAO73961.1, XP_460110.2, EEQ43763.1, XP_710174.1, EDK41572.2, XP_001482650.1, CAA75058.1, XP_002548818.1,
 20 Q12588.1, XP_002422222.1, XP_001383636.2, XP_001525381.1, XP_002548823.1, P30610.1, AAO73952.1, XP_002548428.1, CAA36197.1, XP_002421126.1, AAA34320.1, P16496.3, P30608.1, P24458.1, XP_717999.1, XP_001383817.1, Q9Y758.1, XP_001482092.1, XP_001383710.2, P30609.1, AAB24479.1, XP_457792.1, XP_001524144.1, XP_457727.2, XP_001525578.1, XP_002616743.1, XP_002614836.1, XP_001525577.1, AAO73957.1,
 25 Q12585.1, XP_001386440.2, XP_002616857.1, XP_001483276.1, XP_500402.1, EDK39907.2, XP_500560.1, XP_001211376.1, XP_002560027.1, XP_504857.1, XP_500855.1, XP_504406.1, BAA31433.1, XP_500856.1, XP_501148.1, XP_746567.1, XP_001262425.1, XP_001274843.1, XP_002840588.1, XP_002377641.1, XP_001825995.1, XP_001400739.1, XP_718066.1, CAA35593.1, XP_664735.1, XP_002150795.1, XP_500097.1, XP_002483325.1,
 30 XP_504311.1, XP_500273.1, XP_002548817.1, EDP54484.1, XP_755288.1, XP_001260447.1, EFY97851.1, ACD75398.1, ADK36660.1, XP_001213081.1, XP_002377989.1, XP_001826299.1, XP_001554811.1, XP_501667.1, XP_002148942.1, ADK36662.1,

- 91 -

XP_002565827.1, P30611.1, XP_001267871.1, XP_002372373.1, EFY84686.1, P43083.1,
XP_001263094.1, XP_002148355.1, XP_002568429.1, XP_001817314.1, Q12587.1,
XP_001396435.1, XP_001938589.1, XP_001388497.2, XP_663661.1, XP_003295335.1,
XP_002152088.1, XP_001212071.1, Q12573.1, XP_002379858.1, XP_001821592.1,
5 XP_002844341.1, XP_001394678.1, ACD75400.1, BAK03594.1, XP_003170343.1,
XP_001265480.1, XP_002550661.1, EDP55514.1, XP_001528842.1, XP_749919.1,
XP_001593058.1, P30612.1, EGC48494.1, EEH04429.1, XP_001585586.1, XP_003236182.1,
XP_001400199.1, EEQ46951.1, XP_721410.1, EGP87864.1, XP_002380808.1,
XP_001792771.1, XP_001208515.1, XP_001216161.1, XP_003071804.1, EFW16963.1,
10 XP_002542118.1, XP_001936677.1, EGD95268.1, XP_003015678.1, XP_501748.1,
XP_003169562.1, EFY96492.1, XP_682653.1, XP_002421356.1, CAK43439.1, EFY93677.1,
XP_747767.1, XP_001244958.1, XP_003019635.1, XP_002847463.1, EGP83273.1,
EGR52487.1, XP_002622526.1, XP_002563618.1, CBX99718.1, XP_001552081.1,
XP_003066638.1, XP_003176049.1, ACD75402.1, BAA05145.1, XP_002482834.1,
15 XP_001257501.1, XP_001934574.1, XP_001269972.1, XP_001587438.1, XP_001215856.1,
XP_002149824.1, XP_001550556.1, XP_003011982.1, XP_001827121.1, XP_003233566.1,
XP_003022481.1, EGR47044.1, EFQ34695.1, XP_003170005.1, BAG09241.1,
XP_002796370.1, XP_003019300.1, XP_002563873.1, CAK40654.1, EEH19741.1,
XP_003012518.1, EGD95716.1, XP_003239409.1, BAJ04363.1, XP_001537012.1,
20 BAE66393.1, EGP85214.1, XP_002487227.1, AAV66104.1, EGE07669.1, XP_362943.2,
XP_003016806.1, EFQ27388.1, XP_002384360.1, XP_002836323.1, XP_001274959.1,
EFZ03093.1, XP_661521.1, XP_002849803.1, XP_001589398.1, AAR99474.1,
XP_003189427.1, XP_001823699.1, XP_364111.1, XP_001262753.1, EFY86805.1,
XP_001390153.2, XP_002384738.1, XP_001941811.1, XP_001220831.1, XP_003296981.1,
25 XP_002480829.1, BAD83681.1, XP_001827526.2, XP_369556.1, CAK38224.1, EFQ26532.1,
XP_002562328.1, XP_001904540.1, EGO52476.1, XP_002382002.1, XP_001225874.1,
XP_958030.2, XP_002540883.1, XP_001908957.1, XP_001559255.1, XP_364102.1,
EDP48064.1, XP_365075.1, XP_381460.1, CBX95930.1, XP_003054099.1, XP_361347.2,
XP_002846867.1, XP_001214985.1, EFQ35175.1, XP_002479062.1, XP_001908613.1,
30 XP_003345380.1, EGR50567.1, XP_002479350.1, XP_001394417.2, XP_001394159.2,
XP_002146776.1, EGP86783.1, EFX02953.1, CAK45889.1, XP_003006887.1,
XP_002541427.1, XP_750735.1, XP_001257962.1, EGO51720.1, XP_003005336.1,

- 92 -

EGP83197.1, XP_002149832.1, XP_003052680.1, XP_365851.1, XP_001799910.1,
XP_003347175.1, XP_002565258.1, EGR48918.1, EGR52524.1, XP_964653.2,
XP_002147083.1, XP_002843935.1, EEH19393.1, CAC10088.1, EEH47609.1, EEQ92528.1,
XP_001246560.1, XP_002626168.1, XP_003024880.1, XP_003169255.1, XP_003013780.1,
5 XP_003235691.1, XP_746816.1, EGD98483.1, XP_001389925.2, XP_002842817.1,
XP_002797278.1, ADK36666.1, XP_003305469.1, XP_001548471.1, XP_001806478.1,
EFQ34989.1, XP_001552987.1, CAC24473.1, XP_002541530.1, EEQ89262.1,
XP_001247332.1, XP_003066043.1, EDP47672.1, XP_002628451.1, XP_001910644.1,
EGR44510.1, EFQ36733.1, XP_003052472.1, XP_001393445.2, XP_001522438.1,
10 EGO04179.1, XP_001397944.2, CAK49049.1, EFQ30109.1, XP_001585052.1, EGO30123.1,
XP_388496.1, XP_003173913.1, CBF76609.1, XP_003028593.1, EGO04180.1, CAK46976.1,
XP_370476.1, XP_002145942.1, XP_003004457.1, ADK36663.1, XP_003040708.1,
XP_003351473.1, EFY84692.1, XP_748328.2, XP_003190325.1, XP_002378813.1,
EGR46513.1, XP_003033448.1, XP_002145326.1, XP_662462.1, XP_747469.1,
15 XP_001935085.1, EGR45892.1, EGO01601.1, EGP89995.1, XP_001222615.1,
XP_001224356.1, EGN93507.1, XP_001934479.1, BAK09464.1, EGO30124.1,
XP_001267956.1, ADK36661.1, EFY97845.1, XP_001834501.1, EGO03790.1,
XP_001884320.1, XP_003028899.1, AAP79879.1, EFY84206.1, BAK09467.1,
XP_003030469.1, XP_001412594.1, XP_001834508.1, XP_001839436.2, XP_002583529.1,
20 XP_001886288.1, XP_002843371.1, XP_001587730.1, BAK09418.1, BAK09442.1,
EGO28830.1, EGE03365.1, EFZ01428.1, EGO03065.1, XP_001558890.1, XP_002487181.1,
EGO29652.1, AAX49400.1, EFY92529.1, XP_002380252.1, XP_001884460.1, BAK09387.1,
XP_001839366.2, XP_003031835.1, EFY99978.1, AAL67906.1, BAG09240.1,
XP_002381768.1, XP_001800031.1, XP_001825073.2, BAE63940.1, XP_003028894.1,
25 AAL67905.1, XP_002910303.1, EGO22856.1, XP_003028896.1, XP_681680.1,
XP_002486603.1, XP_001838945.2, EGR50064.1, XP_001884349.1, XP_001883816.1,
CAK37996.1, CAO91865.1, XP_003031227.1, XP_001258702.1, XP_001586739.1,
XP_001560806.1, CBF69707.1, ADN43682.1, XP_001593179.1, XP_001886909.1,
XP_001934479.1, XP_001587730.1, XP_001886909.1, XP_001831709.2, XP_001392650.1,
30 XP_366716.2, CAL69594.1, XP_001269140.1, XP_002566307.1, XP_001555473.1,
XP_663925.1, XP_001598033.1, XP_001835239.2, EGN97256.1, XP_001554305.1,
NP_182075.1, XP_001560475.1, EFQ32286.1, XP_001216788.1, XP_002483975.1,

- 93 -

AAC31835.1, NP_850427.1, XP_002143660.1, XP_003327130.1, BAJ78287.1,
XP_002880182.1, ACB59278.1, EFQ36688.1, BAJ78285.1, BAJ78286.1, XP_001798699.1,
EEH44101.1, BAJ78288.1, BAJ78284.1, EGG02425.1, EGG03011.1, AAA34334.1,
NP_001189747.1, EGG02601.1, XP_002978645.1, EGG11203.1, XP_762610.1, XP_762620.1,
5 XP_001545581.1, CAB44684.1, CAN80536.1, AAN05337.1, NP_001049423.1,
XP_001791898.1, NP_001031814.1, XP_002279531.1, ABK94777.1, AAZ39646.1,
XP_002880183.1, ABC68403.1, XP_002839066.1, EGG03014.1, XP_002320074.1,
NP_001182854.1, CBI38795.3, XP_002310605.1, NP_196442.2, XP_002270594.1,
ABZ80830.1, XP_002275905.1, CBI38796.3, XP_002476978.1, CAB93726.1, EGG03624.1,
10 EGG06527.1, NP_197710.1, XP_001768338.1, XP_002270673.1, BAJ86572.1,
XP_002275806.1, CBI38797.3, XP_002320072.1, CAN60189.1, XP_002986290.1,
XP_002465888.1, CAN80040.1, XP_002336104.1, XP_002988354.1, XP_002264277.1,
EGD72898.1, XP_002866853.1, EAY95236.1, XP_002979701.1, XP_002988762.1,
XP_002304502.1, XP_002873349.1, XP_003192947.1, CAN63571.1, NP_001053615.1,
15 NP_176558.1, EGC49561.1, EGG09027.1, XP_002314581.1, XP_002446966.1,
XP_002320802.1, ABC59095.1, XP_003323121.1, XP_002974639.1, XP_002395587.1,
XP_002866852.1, XP_002319770.1, NP_001146262.1, NP_001169224.1, AAM65207.1,
XP_002529058.1, XP_002886391.1, XP_002320071.1, XP_002446967.1, XP_757870.1,
EAY95147.1, XP_002899664.1, EEH05830.1, XP_002874114.1, ADO24345.1, BAJ88802.1,
20 BAA05146.1, XP_002963351.1, EAY88475.1, NP_195658.3, XP_002976944.1, ABC59093.1,
XP_002275114.1, XP_003328407.1, CAN75428.1, BAJ86471.1, XP_002981144.1,
XP_002277006.1, EAZ26110.1, ACN41008.1, XP_002899542.1, XP_001781614.1,
EAY76187.1, BAK06758.1, XP_002511745.1, XP_002982626.1, XP_002963763.1,
NP_001065111.1, ABF93892.1, XP_002314117.1, BAK06287.1, XP_001745327.1,
25 NP_001047674.1, XP_002878665.1, XP_002974847.1, NP_179899.1, CAN80156.1,
NP_001053543.1, ABC59094.1, XP_002328165.1, XP_002270628.1, XP_002275115.1,
XP_002980688.1, XP_002465039.1, AAL91155.1, NP_195910.1, XP_002509820.1,
NP_200694.1, CAA62082.1, AAL75903.1, XP_002468241.1, XP_002883546.1,
XP_002862636.1, XP_002312905.1, EAY79269.1, AAM12494.1, XP_002875027.1,
30 XP_758010.1, XP_002509524.1, AAP54707.2, XP_002869292.1, NP_001143079.1,
ACF82946.1, XP_002270497.1, XP_002979685.1, XP_002465041.1, XP_002533544.1,
AAG17470.1, XP_002985393.1, NP_191946.1, XP_002525608.1, AAZ39642.1,

- 94 -

XP_002270428.1, XP_002529227.1, CBI24485.3, XP_001763206.1, EGG02922.1,
XP_002974848.1, NP_001141467.1, CBI27149.3, NP_001130907.1, XP_002982474.1,
NP_001048917.1, XP_002465889.1, ABZ80831.1, XP_002464461.1, EAY88476.1,
BAJ90714.1, XP_002893825.1, ACN28568.1, XP_002452782.1, XP_002280004.1,
5 XP_001764611.1, NP_001183394.1, BAJ89570.1, CBI24484.3, BAJ88840.1, ACG38359.1,
CAN77648.1, BAJ91452.1, NP_001141345.1, XP_002282185.1, XP_002980994.1,
XP_002299820.1, BAJ87982.1, BAJ91842.1, XP_003325270.1, XP_001760399.1, CBI34058.3,
ADG34845.1, XP_002523775.1, EEH21852.1, Q50EK3.1, BAK06748.1, XP_002963764.1,
ACN34158.1, XP_001764503.1, XP_002311750.1, XP_001782495.1, XP_002988642.1,
10 XP_002465625.1, XP_002892051.1, XP_002279649.1, NP_171666.1, ABK28430.1,
BAC42067.1, AED99869.1, NP_174713.1, XP_001781706.1, ABG66204.1, XP_002964775.1,
NP_001064901.2, XP_002961706.1, XP_002519477.1, XP_001559854.1, CBH32594.1,
BAB92258.1, XP_002264897.1, AAL59025.1, XP_002862576.1, ACL53124.1,
XP_002521476.1, NP_200045.1, BAJ89814.1, CBI38794.3, XP_776769.1, NP_001141372.1,
15 EEC74485.1, EAY76557.1, XP_002318861.1, NP_001172660.1, XP_002880978.1,
AAO00706.1, BAK07606.1, XP_002979336.1, BAC42841.1, BAF46296.1, XP_002306380.1,
XP_002865907.1, ACG34921.1, XP_002876375.1, NP_001056685.1, XP_002264292.1,
XP_002893443.1, NP_001066096.1, EEE53477.1, CBH32607.1, EAY94753.1,
NP_001130939.1, NP_182121.1, XP_002437749.1, NP_191222.1, XP_002865881.1,
20 XP_569708.1, XP_002279670.1, BAJ94774.1, ABF93894.1, BAD94304.1, ACG33785.1,
NP_194944.1, NP_180337.1, AAB63277.1, BAJ85246.1, XP_002456654.1, ACN27732.1,
XP_002445325.1, EER40289.1, XP_001838184.2, BAJ85532.1, XP_002866555.1,
EAY88477.1, ACG47870.1, XP_002310074.1, XP_002457224.1, EAZ25521.1, BAJ87689.1,
NP_001044838.1, XP_002521004.1, XP_002882043.1, XP_002527038.1, XP_002318721.1,
25 XP_002979339.1, NP_176086.1, XP_001560028.1, ABC59092.1, ABF93891.1, ACR38435.1,
EAY78983.1, NP_179782.1, CCA21696.1, XP_002334340.1, EFX88387.1, NP_001044554.1,
XP_002321857.1, NP_173862.1, NP_195660.1, XP_001554079.1, EAZ13864.1, EEC67630.1,
EAY76183.1, AAP54710.2, NP_001065112.2, ACD10924.1, XP_001559275.1, EEC67338.1,
XP_002273811.1, ADJ68242.1, NP_001065698.1, CAN66874.1, CAB41474.1,
30 XP_002868908.1, XP_002904660.1, CAR47816.1, NP_189243.1, EAY98229.1,
XP_002448320.1, O81117.2, XP_002458797.1, XP_002277129.1, BAJ88829.1, CAN67559.1,
BAK08034.1, XP_002894062.1, XP_002894891.1, XP_002279981.1, ABR16451.1,

NP_201150.1, AAM60854.1, XP_002521002.1, XP_002521474.1, XP_002875311.1,
NP_195661.1, AAP79889.1, NP_175193.1, P98188.1, BAK08270.1, CBI21357.3,
XP_002870817.1, XP_002904451.1, ABA95812.1, XP_002998647.1, NP_001066166.2,
XP_002894690.1, EFY92064.1, XP_002278009.1, XP_002336002.1, CCA16508.1,
5 XP_002868909.1, EAZ31703.1, C96517, EAY86526.1, XP_002307954.1, XP_002904638.1,
XP_002266883.1, XP_002439880.1, XP_002892730.1, ADI52567.1, EGI61791.1,
XP_002511196.1, EGG04372.1, XP_002511875.1, ACE75189.1, NP_001055681.1,
XP_001589816.1, NP_001170655.1, XP_002300789.1, XP_001934479.1, XP_001587730.1,
XP_001554079.1, XP_001559275.1, XP_002868908.1, XP_002998647.1, EFY92064.1,
10 XP_002605799.1, BAC43393.1, ABK28457.1, AAL54887.1, BAC43161.1, XP_002333384.1,
ZP_03631129.1, AAL84318.1, BAJ99856.1, XP_002593704.1, YP_001965159.1,
XP_002454121.1, EFX88390.1, ABR16969.1, NP_177109.3, XP_002441724.1,
NP_001166017.1, BAB92256.1, ACE75340.1, AAZ39645.1, XP_002312417.1,
XP_002887239.1, NP_001172609.1, NP_001065766.1, XP_002515053.1, AAL54885.1,
15 ABR16897.1, XP_002878579.1, NP_001140775.1, XP_003275955.1, ZP_08045694.1,
BAJ94069.1, XP_001654558.1, XP_002436562.1, EAY88702.1, BAK03685.1,
XP_003327629.1, XP_002322606.1, EEH42702.1, XP_002037976.1, NP_172774.1,
XP_002282477.1, EFX88388.1, XP_002522465.1, EFZ21470.1, AAO41955.1, AAL54886.1,
XP_002450277.1, XP_002862559.1, XP_002335046.1, XP_003328408.1, ACE75187.1,
20 XP_001849294.1, XP_002444132.1, XP_002894061.1, EFN77015.1, EGI69992.1, CBI17962.3,
AAL54884.1, XP_002998650.1, XP_002105150.1, XP_002877615.1, EFZ22412.1,
XP_002439815.1, XP_002300790.1, CBI40391.3, AEI59774.1, XP_002801151.1,
XP_003325267.1, XP_001554577.1, EAY79865.1, XP_002465796.1, XP_002931035.1,
ABA91371.1, ACE75338.1, XP_001592850.1, XP_001362981.1, XP_002271246.1,
25 EGB11905.1, NP_176713.1, CBJ27248.1, NP_566155.1, EFX87732.1, EEC71661.1,
ACG29046.1, NP_001130576.1, XP_001843663.1, ABK25134.1, EGI65081.1,
XP_002722841.1, AAL67908.2, AAO15579.1, YP_122047.1, EFA04617.1, YP_001522424.1,
ACB87383.1, NP_001027517.1, EEE52725.1, XP_002078257.1, XP_002722842.1,
ZP_05128707.1, XP_003208874.1, AAK31592.1, ABA95747.2, NP_001181472.1,
30 NP_001075572.1, XP_001108915.1, XP_001520882.1, XP_002063219.1, EFZ22408.1,
AAL57721.1, EFW47740.1, AAQ20834.1, CAN74644.1, XP_002722849.1, BAC30028.1,
CAN75729.1, XP_002115603.1, AAN72309.1, EEC68823.1, CAM18519.1, EAZ13863.1,

XP_002906159.1, NP_001003947.1, ZP_01858832.1, XP_002882162.1, XP_002089195.1,
XP_002892729.1, CAN68037.1, NP_001130648.1, NP_001166016.1, NP_172773.4,
ADJ68241.1, EGI62551.1, EFN63658.1, XP_002300103.1, XP_001658673.1,
XP_001367719.1, NP_775146.1, XP_001375048.1, AAH21377.1, NP_727589.1,
5 XP_002271847.1, XP_001809620.1, XP_002897528.1, NP_190421.1, XP_002282468.1,
XP_536868.2, EEE58297.1, XP_001992105.1, EAY82190.1, ADD20161.1, XP_001363065.1,
EAU77129.3, EAY72807.1, EGG03077.1, NP_001181489.1, NP_001177869.1,
XP_001966135.1, BAA99522.1, BAK07250.1, XP_002133118.1, NP_001042228.1,
AAL57720.1, XP_002897529.1, AAA35712.1, YP_002275016.1, NP_000770.2,
10 XP_002721578.1, XP_321208.4, AAM09532.1, EFN61085.1, BAK06179.1, EFX88389.1,
YP_001602608.1, XP_513140.3, NP_001182438.1, AAD31068.1, NP_001093242.1,
XP_001367758.2, EFZ18984.1, YP_691921.1, CAH59968.1, AAS80270.1, CAH59967.1,
ACQ99381.2, YP_003810988.1, YP_957888.1, CBW44755.1, ZP_05042596.1,
ZP_01913735.1, ZP_05043097.1, ADQ00145.1, YP_004494060.1, ZP_08206912.1,
15 BAE78452.1, NP_114222.1, ACZ56357.1, YP_640381.1, ZP_04384919.1, ZP_08025219.1,
ZP_07715822.1, ZP_06847816.1, YP_001702784.1, AEK27137.1, ZP_07716433.1,
ZP_08199554.1, YP_004495520.1, YP_345718.1, ZP_08022914.1, YP_001851443.1,
BAG50428.1, YP_001135848.1, BAF95905.1, YP_345695.1, ACP39691.1, ACP39664.1,
ACP39635.1, ACP39633.1, ACP39710.1, ACP39698.1, ACP39711.1, BAE47475.1,
20 BAE47474.1, ABW76858.1, ACO50699.1, ACP39643.1, ACP39639.1, ACP39708.1,
ACM68663.1, ACP39642.1, ACP39684.1, ACP39636.1, ZP_05095005.1, ACP39652.1,
BAE47473.1, ACM68664.1, ACP39646.1, ACP39680.1, ACP39692.1, ACP39675.1,
ACP39632.1, ZP_05129284.1, ACP39706.1, ACP39695.1, ACM68665.1, ACP39654.1,
ACP39665.1, ACP39649.1, BAE47472.1, ACM68668.1, ACP39676.1, ACP39648.1,
25 ACP39647.1, ZP_01102434.1, ACM68666.1, ACP39641.1, ACM68669.1, ZP_01625037.1,
ACP39690.1, ACP39696.1, ACP39697.1, ACP39707.1, ACP39682.1, ACP39650.1,
ACP39638.1, ZP_05126641.1, CAH04396.1, ACP39658.1, ZP_01102687.1, ACJ06772.1,
YP_001413041.1, YP_552058.1, ADE05601.1, ADI19685.1, BAE47479.1, ZP_01626700.1,
ZP_01618279.1, CAH61448.1, YP_001411305.1, YP_003591161.1, ZP_01615522.1,
30 ACM68667.1, ACP39651.1, ZP_05095535.1, ZP_01618489.1, NP_418882.1, ADI19983.1,
ACP39677.1, BAE47476.1, ACP39655.1, ACP39656.1, ADI19696.1, BAE47477.1,
YP_001413399.1, YP_459878.1, BAE47480.1, BAE47481.1, ACP39653.1, BAE47478.1,

- 97 -

- YP_001681656.1, ZP_01618281.1, ZP_01627262.1, YP_001413057.1, YP_760740.1,
 YP_001242466.1, YP_001203574.1, CAH61454.1, YP_002129656.1, YP_001672075.1,
 ACP39709.1, YP_001990805.1, NP_946959.1, YP_001203575.1, YP_783213.1,
 YP_003059227.1, YP_004110202.1, ACP39645.1, YP_487538.1, CAH61451.1, YP_570816.1,
 5 YP_534107.1, YP_001413223.1, YP_001242465.1, YP_557448.1, ZP_08631162.1,
 NP_773883.1, ZP_00997728.1, ACP39683.1, NP_768493.1, NP_773882.1, ZP_08271781.1,
 CAH61449.1, YP_003883668.1, YP_003332953.1, YP_004535688.1, YP_495502.1,
 YP_459378.1, ZP_08700267.1, ZP_01863452.1, ZP_06860085.1, BAE47487.1, YP_617903.1,
 ZP_08207422.1, BAE47486.1, ZP_01041003.1, BAE47484.1, ACR78197.1, CAH61456.1,
 10 ZP_01858113.1, ACP39681.1, BAE47485.1, ACP39673.1, BAE47483.1, ACP39669.1,
 BAE47482.1, ACP39674.1, ACP39704.1, ACP39703.1, YP_497095.1, ACP39672.1,
 ACP39702.1, ACP39670.1, ACP39666.1, YP_458852.1, ACP39687.1, ACP39688.1,
 ACP39634.1, ACP39686.1, ACP39660.1, ACP39700.1, YP_001411309.1, ZP_01465241.1,
 ACP39701.1, ACP39679.1, ACP39657.1, ACP39694.1, ACP39659.1, ACP39671.1,
 15 ACP39693.1 und YP_003342921.1,
 insbesondere
 AAO73954.1, AAO73953.1, XP_002546279.1, AAA34353.2, P30607.1, XP_002421627.1,
 XP_718670.1, CAA39366.1, XP_001527524.1, AAO73955.1, AAO73956.1, XP_002546278.1,
 EEQ43157.1, XP_718669.1, AAA34354.1, P10615.3, XP_002421628.1, 226487, P16141.3,
 20 CAA39367.1, Q9Y757.2, XP_001485567.1, AAO73958.1, XP_001383506.2, XP_460111.2,
 AAO73959.1, Q12586.1, XP_460112.2, AAO73960.1, Q12589.1, AAO73961.1, XP_460110.2,
 EEQ43763.1, XP_710174.1, EDK41572.2, XP_001482650.1, CAA75058.1, XP_002548818.1,
 Q12588.1, XP_002422222.1, XP_001383636.2, XP_001525381.1, XP_002548823.1,
 P30610.1, AAO73952.1, XP_002548428.1, CAA36197.1, XP_002421126.1, AAA34320.1,
 25 P16496.3, P30608.1, P24458.1, XP_717999.1, XP_001383817.1, Q9Y758.1, XP_001482092.1,
 XP_001383710.2, P30609.1, AAB24479.1, XP_457792.1, XP_001524144.1, XP_457727.2,
 XP_001525578.1, XP_002616743.1, XP_002614836.1, XP_001525577.1, AAO73957.1,
 Q12585.1, XP_001386440.2, XP_002616857.1, XP_001483276.1, XP_500402.1, EDK39907.2,
 XP_500560.1, XP_001211376.1, XP_002560027.1, XP_504857.1, XP_500855.1,
 30 XP_504406.1, BAA31433.1, XP_500856.1, XP_501148.1, XP_746567.1, XP_001262425.1,
 XP_001274843.1, XP_002840588.1, XP_002377641.1, XP_001825995.1, XP_001400739.1,
 XP_718066.1, CAA35593.1, XP_664735.1, XP_002150795.1, XP_500097.1, XP_002483325.1,

- 98 -

XP_504311.1, XP_500273.1, XP_002548817.1, EDP54484.1, XP_755288.1, XP_001260447.1,
EFY97851.1, ACD75398.1, ADK36660.1, XP_001213081.1, XP_002377989.1,
XP_001826299.1, XP_001554811.1, XP_501667.1, XP_002148942.1, ADK36662.1,
XP_002565827.1, P30611.1, XP_001267871.1, XP_002372373.1, EFY84686.1, P43083.1,
5 XP_001263094.1, XP_002148355.1, XP_002568429.1, XP_001817314.1, Q12587.1,
XP_001396435.1, XP_001938589.1, XP_001388497.2, XP_663661.1, XP_003295335.1,
XP_002152088.1, XP_001212071.1, Q12573.1, XP_002379858.1, XP_001821592.1,
XP_002844341.1, XP_001394678.1, ACD75400.1, XP_003170343.1, XP_001265480.1,
XP_002550661.1, EDP55514.1, XP_001528842.1, XP_749919.1, XP_001593058.1, P30612.1,
10 EGC48494.1, EEH04429.1, XP_001585586.1, XP_003236182.1, XP_001400199.1,
EEQ46951.1, XP_721410.1, EGP87864.1, XP_002380808.1, XP_001792771.1,
XP_001208515.1, XP_001216161.1, XP_003071804.1, EFW16963.1, XP_002542118.1,
XP_001936677.1, EGD95268.1, XP_003015678.1, XP_501748.1, XP_003169562.1,
EFY96492.1, XP_682653.1, XP_002421356.1, CAK43439.1, EFY93677.1, XP_747767.1,
15 XP_001244958.1, XP_003019635.1, XP_002847463.1, EGP83273.1, EGR52487.1,
XP_002622526.1, XP_002563618.1, CBX99718.1, XP_001552081.1, XP_003066638.1,
XP_003176049.1, ACD75402.1, BAA05145.1, XP_002482834.1, XP_001257501.1,
XP_001934574.1, XP_001269972.1, XP_001587438.1, XP_001215856.1, XP_002149824.1,
XP_001550556.1, XP_003011982.1, XP_001827121.1, XP_003233566.1, XP_003022481.1,
20 EGR47044.1, EFQ34695.1, XP_003170005.1, BAG09241.1, XP_002796370.1,
XP_003019300.1, XP_002563873.1, CAK40654.1, EEH19741.1, XP_003012518.1,
EGD95716.1, XP_003239409.1, BAJ04363.1, XP_001537012.1, BAE66393.1, EGP85214.1,
XP_002487227.1, AAV66104.1, EGE07669.1, XP_362943.2, XP_003016806.1, EFQ27388.1,
XP_002384360.1, XP_002836323.1, XP_001274959.1, EFZ03093.1, XP_661521.1,
25 XP_002849803.1, XP_001589398.1, AAR99474.1, XP_003189427.1, XP_001823699.1,
XP_364111.1, XP_001262753.1, EFY86805.1, XP_001390153.2, XP_002384738.1,
XP_001941811.1, XP_001220831.1, XP_003296981.1, XP_002480829.1, BAD83681.1,
XP_001827526.2, XP_369556.1, CAK38224.1, EFQ26532.1, XP_002562328.1,
XP_001904540.1, EGO52476.1, XP_002382002.1, XP_001225874.1, XP_958030.2,
30 XP_002540883.1, XP_001908957.1, XP_001559255.1, XP_364102.1, EDP48064.1,
XP_365075.1, XP_381460.1, CBX95930.1, XP_003054099.1, XP_361347.2, XP_002846867.1,
XP_001214985.1, EFQ35175.1, XP_002479062.1, XP_001908613.1, XP_003345380.1,

- 99 -

EGR50567.1, XP_002479350.1, XP_001394417.2, XP_001394159.2, XP_002146776.1,
EGP86783.1, EFX02953.1, CAK45889.1, XP_003006887.1, XP_002541427.1, XP_750735.1,
XP_001257962.1, EGO51720.1, XP_003005336.1, EGP83197.1, XP_002149832.1,
XP_003052680.1, XP_365851.1, XP_001799910.1, XP_003347175.1, XP_002565258.1,
5 EGR48918.1, EGR52524.1, XP_964653.2, XP_002147083.1, XP_002843935.1, EEH19393.1,
CAC10088.1, EEH47609.1, EEQ92528.1, XP_001246560.1, XP_002626168.1,
XP_003024880.1, XP_003169255.1, XP_003013780.1, XP_003235691.1, XP_746816.1,
EGD98483.1, XP_001389925.2, XP_002842817.1, XP_002797278.1, ADK36666.1,
XP_003305469.1, XP_001548471.1, XP_001806478.1, EFQ34989.1, XP_001552987.1,
10 CAC24473.1, XP_002541530.1, EEQ89262.1, XP_001247332.1, XP_003066043.1,
EDP47672.1, XP_002628451.1, XP_001910644.1, EGR44510.1, EFQ36733.1,
XP_003052472.1, XP_001393445.2, XP_001522438.1, XP_001397944.2, CAK49049.1,
EFQ30109.1, XP_001585052.1, XP_388496.1, XP_003173913.1, CBF76609.1, CAK46976.1,
XP_370476.1, XP_002145942.1, XP_003004457.1, ADK36663.1, XP_003040708.1,
15 XP_003351473.1, EFY84692.1, XP_748328.2, XP_003190325.1, XP_002378813.1,
EGR46513.1, XP_002145326.1, XP_662462.1, XP_747469.1, XP_001935085.1, EGR45892.1,
EGP89995.1, XP_001222615.1, XP_001224356.1, XP_001934479.1, XP_001267956.1,
ADK36661.1, EFY97845.1, EFY84206.1, XP_001412594.1, XP_002583529.1,
XP_002843371.1, XP_001587730.1, EGE03365.1, EFZ01428.1, XP_001558890.1,
20 XP_002487181.1, EFY92529.1, XP_002380252.1, EFY99978.1, BAG09240.1,
XP_002381768.1, XP_001800031.1, XP_001825073.2, BAE63940.1, XP_681680.1,
XP_002486603.1, EGR50064.1, CAK37996.1, CAO91865.1, XP_001258702.1,
XP_001586739.1, XP_001560806.1, CBF69707.1, ADN43682.1, XP_001593179.1,
XP_001392650.1, XP_366716.2, CAL69594.1, XP_001269140.1, XP_002566307.1,
25 XP_001555473.1, XP_663925.1, XP_001598033.1, XP_001554305.1, XP_001560475.1,
EFQ32286.1, XP_001216788.1, XP_002483975.1, XP_002143660.1, EFQ36688.1,
XP_001798699.1, EEH44101.1, AAA34334.1, XP_001545581.1, XP_001791898.1,
XP_002839066.1, EGC49561.1, EEH05830.1, BAA05146.1, EEH21852.1, XP_001559854.1,
EER40289.1, XP_001560028.1, XP_001554079.1, XP_001559275.1, EFY92064.1,
30 XP_001589816.1, EEH42702.1, XP_001554577.1, XP_001592850.1, YP_691921.1,
CAH59968.1, AAS80270.1, CAH59967.1, ACQ99381.2, YP_003810988.1, YP_957888.1,
CBW44755.1, ZP_05042596.1, ZP_01913735.1, ZP_05043097.1, ADQ00145.1,

- 100 -

YP_004494060.1, ZP_08206912.1, BAE78452.1, NP_114222.1, ACZ56357.1, YP_640381.1,
 ZP_04384919.1, ZP_08025219.1, ZP_07715822.1, ZP_06847816.1, YP_001702784.1,
 AEK27137.1, ZP_07716433.1, ZP_08199554.1, YP_004495520.1, YP_345718.1,
 ZP_08022914.1, YP_001851443.1, BAG50428.1, YP_001135848.1, BAF95905.1,
 5 YP_345695.1, ACP39691.1, ACP39664.1, ACP39635.1, ACP39633.1, ACP39710.1,
 ACP39698.1, ACP39711.1, BAE47475.1, BAE47474.1, ABW76858.1, ACO50699.1,
 ACP39643.1, ACP39639.1, ACP39708.1, ACM68663.1, ACP39642.1, ACP39684.1,
 ACP39636.1, ZP_05095005.1, ACP39652.1, BAE47473.1, ACM68664.1, ACP39646.1,
 ACP39680.1, ACP39692.1, ACP39675.1, ACP39632.1, ZP_05129284.1, ACP39706.1,
 10 ACP39695.1, ACM68665.1, ACP39654.1, ACP39665.1, ACP39649.1, BAE47472.1,
 ACM68668.1, ACP39676.1, ACP39648.1, ACP39647.1, ZP_01102434.1, ACM68666.1,
 ACP39641.1, ACM68669.1, ZP_01625037.1, ACP39690.1, ACP39696.1, ACP39697.1,
 ACP39707.1, ACP39682.1, ACP39650.1, ACP39638.1, ZP_05126641.1, CAH04396.1,
 ACP39658.1, ZP_01102687.1, ACJ06772.1, YP_001413041.1, YP_552058.1, ADE05601.1,
 15 ADI19685.1, BAE47479.1, ZP_01626700.1, ZP_01618279.1, CAH61448.1, YP_001411305.1,
 YP_003591161.1, ZP_01615522.1, ACM68667.1, ACP39651.1, ZP_05095535.1,
 ZP_01618489.1, NP_418882.1, ADI19983.1, ACP39677.1, BAE47476.1, ACP39655.1,
 ACP39656.1, ADI19696.1, BAE47477.1, YP_001413399.1, YP_459878.1, BAE47480.1,
 BAE47481.1, ACP39653.1, BAE47478.1, YP_001681656.1, ZP_01618281.1, ZP_01627262.1,
 20 YP_001413057.1, YP_760740.1, YP_001242466.1, YP_001203574.1, CAH61454.1,
 YP_002129656.1, YP_001672075.1, ACP39709.1, YP_001990805.1, NP_946959.1,
 YP_001203575.1, YP_783213.1, YP_003059227.1, YP_004110202.1, ACP39645.1,
 YP_487538.1, CAH61451.1, YP_570816.1, YP_534107.1, YP_001413223.1, YP_001242465.1,
 YP_557448.1, ZP_08631162.1, NP_773883.1, ZP_00997728.1

25

und besonders bevorzugt

AAO73954.1, AAO73953.1, XP_002546279.1, AAA34353.2, P30607.1, XP_002421627.1,
 XP_718670.1, CAA39366.1, AAO73955.1, AAO73956.1, XP_002546278.1, EEQ43157.1,
 XP_718669.1, AAA34354.1, P10615.3, XP_002421628.1, 226487, P16141.3, CAA39367.1,
 30 AAO73958.1, AAO73959.1, Q12586.1, AAO73960.1, Q12589.1, AAO73961.1, EEQ43763.1,
 XP_710174.1, CAA75058.1, XP_002548818.1, Q12588.1, XP_002422222.1, XP_002548823.1,
 P30610.1, AAO73952.1, XP_002548428.1, CAA36197.1, XP_002421126.1, AAA34320.1,

P16496.3, P30608.1, P24458.1, XP_717999.1, P30609.1, AAB24479.1, AAO73957.1, Q12585.1, XP_718066.1, CAA35593.1, XP_002548817.1, P30611.1, P43083.1, Q12587.1, Q12573.1, XP_002550661.1, P30612.1, EEQ46951.1, XP_721410.1, XP_002421356.1, BAA05145.1, BAG09241.1, CAC24473.1, BAG09240.1, AAA34334.1, BAA05146.1, 5 XP_500402.1, XP_500560.1, XP_504857.1, XP_500855.1, XP_504406.1, BAA31433.1, XP_500856.1, XP_501148.1, XP_500097.1, XP_504311.1, XP_500273.1, XP_501667.1, XP_501748.1, YP_691921.1, CAH59968.1, AAS80270.1, CAH59967.1, ACQ99381.2, YP_003810988.1, YP_957888.1, CBW44755.1, ZP_05042596.1, ZP_01913735.1, ZP_05043097.1, ADQ00145.1, YP_004494060.1, ZP_08206912.1, BAE78452.1, 10 NP_114222.1, ACZ56357.1, YP_640381.1, ZP_04384919.1, ZP_08025219.1, ZP_07715822.1, ZP_06847816.1, YP_001702784.1, AEK27137.1, ZP_07716433.1, ZP_08199554.1, YP_004495520.1, YP_345718.1, ZP_08022914.1, YP_001851443.1, BAG50428.1, YP_001135848.1, BAF95905.1, YP_345695.1, ACP39691.1, ACP39664.1, ACP39635.1, ACP39633.1, ACP39710.1, ACP39698.1, ACP39711.1, BAE47475.1, BAE47474.1, 15 ABW76858.1, ACO50699.1, ACP39643.1, ACP39639.1, ACP39708.1, ACM68663.1, ACP39642.1, ACP39684.1, ACP39636.1, ZP_05095005.1, ACP39652.1, BAE47473.1, ACM68664.1, ACP39646.1, ACP39680.1, ACP39692.1, ACP39675.1, ACP39632.1, ZP_05129284.1, ACP39706.1, ACP39695.1, ACM68665.1, ACP39654.1, ACP39665.1, ACP39649.1, BAE47472.1, ACM68668.1, ACP39676.1, ACP39648.1, ACP39647.1, 20 ZP_01102434.1, ACM68666.1, ACP39641.1, ACM68669.1, ZP_01625037.1, ACP39690.1, ACP39696.1, ACP39697.1, ACP39707.1, ACP39682.1, ACP39650.1 und ACP39638.1 sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste 25 gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die 30 pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der

Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{1a} generell insbesondere die Umsetzung von Laurinsäure und/oder Laurinsäuremethylester zu ω -Hydroxy-Laurinsäure und/oder ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester verstanden wird.

5

Bestimmte Enzyme E_{1b}

Erfindungsgemäß bevorzugte AlkB Alkanhydroxylasen E_{1b} sind ausgewählt aus der Liste

- 10 YP_001185946.1, Q9WWW6.1, YP_957898.1, YP_957728.1, YP_694427.1, BAC98365.1, ZP_00957064.1, CAC86944.1, YP_001672212.1, CAB59525.1, ACH99213.1, ACH99215.1, ACH99216.1, AAK56792.1, ACH99229.1, ACS91348.1, AAP41820.1, ZP_05128075.1, CAM58121.1, CAM58085.1, ACQ44675.1, ACZ62808.1, ZP_01738706.1, ZP_01916228.1, ZP_01225325.1, YP_001023605.1, ACJ22747.1, ACT91140.1, AAT91722.2, CBA27418.1,
- 15 YP_001889129.1, EGC97932.1, ACT91201.1, ZP_05083049.1, YP_554098.1, ZP_01900149.1, ADG26619.1, ADG26657.1, ADG26640.1, ZP_06838771.1, ADG26649.1, ADG26651.1, ZP_02374120.1, YP_368326.1, ZP_02380481.1, ADG26643.1, ADG26628.1, YP_442346.1, ADG26620.1, ADG26647.1, ZP_07673680.1, ADG26638.1, YP_002232139.1, YP_001118743.1, ZP_01764629.1, YP_108945.1, YP_334185.1, ZP_04897834.1,
- 20 ZP_02889567.1, YP_620386.1, YP_002897546.1, ZP_02166109.1, ZP_02904755.1, ADG26639.1, YP_001892637.1, ADG26642.1, ZP_04939380.1, ZP_02464124.1, YP_102417.1, CAC36356.1, ACJ22727.1, YP_001764240.1, YP_002765609.1, YP_001945311.1, ZP_03586616.1, ACJ22665.1, ZP_03574223.1, CAC37038.1, ZP_02456517.1, YP_001807560.1, YP_002779449.1, AAK97454.1, YP_002912304.1,
- 25 ACR55689.1, YP_003397515.1, YP_004361423.1, YP_772734.1, ACJ65014.1, ACT31523.1, ACJ22750.1, ZP_07375042.1, YP_002776786.1, ACB11552.1, ZP_02363472.1, ADG26653.1, ZP_04383196.1, ZP_02356342.1, ACJ22751.1, YP_952571.1, ACU43494.1, YP_001135977.1, YP_002764193.1, YP_003855036.1, YP_004078475.1, AAK97448.1, ZP_04388098.1, ACX30747.1, ADG26632.1, ACJ22719.1, ADO21492.1, ZP_05061580.1, ADR72654.1,
- 30 ACZ65961.1, ACX30755.1, YP_001849604.1, AAV64895.1, YP_004495037.1, YP_702497.1, YP_001069662.1, ZP_06850622.1, BAF34299.1, CAB51024.2, YP_004008018.1, YP_003768535.1, ACJ65013.1, ZP_07282765.1, YP_886209.1, ACJ22725.1, ZP_08155372.1,

- 103 -

YP_004493362.1, ZP_05228000.1, ZP_07717360.1, BAD67020.1, YP_004524245.1,
ZP_07715778.1, NP_217769.1, ACS91349.1, YP_960105.1, ZP_07014137.1,
YP_004746682.1, ZP_08022271.1, ACN62569.1, ADQ37951.1, YP_003647687.1,
YP_003837040.1, ADG26600.1, YP_002768905.1, ZP_08553310.1, ADG26597.1,
5 ACJ22749.1, ADG26598.1, YP_001704327.1, ZP_04385381.1, ZP_04751264.1, ADG26609.1,
ADG26610.1, ZP_06417258.1, ADG26607.1, ADP98338.1, YP_003275257.1,
YP_004084103.1, ADG26630.1, ADG26625.1, ADG26605.1, ADG26599.1, ZP_05218167.1,
ADQ37950.1, YP_921354.1, ADG26645.1, ADG26612.1, YP_004493370.1, YP_638501.1,
YP_003809668.1, NP_962298.1, ZP_04750514.1, ADG26608.1, ADT82701.1, ACJ06773.1,
10 YP_120833.1, ADG26618.1, ADG26602.1, ADG26623.1, ZP_04383566.1, ZP_08122407.1,
YP_004077166.1, ZP_05041651.1, ZP_04608296.1, ABU93351.2, YP_003658078.1,
ADQ37949.1, ADG26652.1, YP_002765850.1, AAK97447.1, CAD24434.1, CAC40954.1,
ACT91203.1, YP_120829.1, ZP_07282558.1, YP_003298195.1, YP_001851790.1,
ZP_05827357.1, ADG26633.1, CAB51020.1, YP_953908.1, ZP_07990416.1, YP_119532.1,
15 ZP_08442348.1, ZP_08276444.1, ZP_04661203.1, ABO12068.2, YP_001846325.1,
ADQ37952.1, ZP_08198697.1, ZP_00996652.1, YP_001707231.1, ZP_08433663.1,
ZP_08205256.1, YP_003732372.1, YP_906529.1, ACT91204.1, YP_001506534.1,
YP_001713880.1, YP_883357.1, YP_004525252.1, ADG26604.1, YP_001134633.1,
ZP_08195602.1, ZP_06690500.1, ZP_05826167.1, ADY81595.1, ZP_06056754.1,
20 AAK31348.1, YP_251715.1, ZP_08461977.1, ZP_05847237.1, YP_712218.1,
YP_001084670.1, ZP_04387164.1, YP_260041.1, YP_002873097.1, ADG26614.1,
AAK97446.1, YP_001280943.1, ZP_04386125.1, AAC36353.2, CCA29159.1, CAD10804.1,
CCA29151.1, CAC40953.1, CCA29161.1, ABA55770.1, AAS93604.4, CCA29173.1,
CCA29155.1, CCA29156.1, ABA55772.1, CCA29154.1, ABA55793.1, CCA29162.1,
25 CCA29170.1, ZP_03824539.1, CCA29166.1, CCA29136.1, ZP_06065934.1, ABB54493.1,
CCA29169.1, YP_003112137.1, CCA29127.1, CCA29148.1, CCA29160.1, ZP_06057458.1,
ABA55773.1, YP_004016090.1, CCA29139.1, YP_480358.1, ABA55787.1, CCA29150.1,
CCA29130.1, ZP_07775830.1, ABA55779.1, CCA29132.1, YP_003732938.1, BAB33284.1,
CCA29149.1, CCA29145.1, ABA55783.1, CCA29137.1, CCA29129.1, CCA29158.1,
30 CCA29176.1, CCA29142.1, CCA29144.1, BAB33287.1, CCA29133.1, CCA29140.1,
CCA29135.1, ZP_06066074.1, ZP_03823182.1, CCA29171.1, CCA29152.1, CCA29131.1,
ABA55780.1, CCA29163.1, CCA29143.1, CCA29153.1, YP_001580600.1, CCA29134.1,

CCA29138.1, YP_046098.1, ZP_06072466.1, ZP_05361594.1, ACU43504.1, CCA29147.1,
CCA29146.1, ZP_06061712.1, ACT91185.1, ACT91147.1, ACT91178.1, ACT91167.1,
ACT91181.1, ACT91188.1, ZP_06069784.1, ACT91205.1, ZP_06725872.1, ACT91171.1,
CCA29128.1, ABY56787.1, ADE05602.1, ACU43474.1, ACJ22718.1, ABB90688.1,
5 ACU43519.1, ABB96093.1, ACU43485.1, ACU43493.1, ABW76857.1, ACT91163.1,
ACJ22673.1, ZP_06188150.1, ACT91242.1, ACT91225.1, ACT91211.1, ACU43479.1,
ACU43491.1, ACU43522.1, ACU43486.1, ACT91221.1, ACJ22662.1, ACU43506.1,
ACU43487.1, ACT91259.1, AAA97866.1, ACU43502.1, YP_001252544.1, ABB96084.1,
ACU43520.1, ACJ22668.1, ACU43503.1, ACT91230.1, ABA55777.1, ACT91231.1,
10 ZP_01748311.1, ACJ22724.1, ACU43475.1, ACU43511.1, ACU43490.1, ZP_08330953.1,
ACU43484.1, CBX01596.1, ACT91168.1, YP_096989.1, ACT91215.1, YP_125370.1,
ACT91233.1, ACU43478.1, ADE05603.1, ACJ22715.1, ACU43512.1, ACT91196.1,
ACJ22692.1, ACU43510.1, ACU43521.1, ACT91174.1, ACT91213.1, ACT91142.1,
ACT91206.1, ACT91216.1, ACT91182.1, ACT91255.1, ACT91246.1, ACT91217.1,
15 ACT91155.1, ACT91240.1, ACT91207.1, ACU43495.1, YP_128249.1, ACT91160.1,
YP_004052990.1, ACT91226.1, ACU43507.1, ABO61855.1, ACT91214.1, ACT91220.1,
YP_001188237.1, ACJ22689.1, ZP_01689499.1, YP_004379711.1, ACJ22748.1, ABB90683.1,
ACT91223.1, ACT91235.1, ABO61786.1, ACU43508.1, ACU43492.1, ACT91219.1,
ACT91244.1, ABO61856.1, ACT91239.1, ACU43473.1, ABO61850.1, ACT91262.1,
20 ACT91261.1, ACT91224.1, ACU43499.1, ACU43488.1, ADO21767.1, YP_004654946.1,
ADO21777.1, ABB96089.1, ABO61852.1, ABO61847.1, ACT91222.1, ADO21764.1,
ACU43477.1, ADO21773.1, ABO61787.1, ABB96080.1, ABO61857.1, ACT91228.1,
ABB96070.1, ADO21744.1, ACT91245.1, CAG17608.1, ADO21747.1, YP_001349162.1,
ABK63807.1, ZP_06879583.1, NP_250216.1, ACT91234.1, ZP_01364874.1, ABO61789.1,
25 ADO21772.1, ACU43516.1, ACU43505.1, ACU43501.1, ACT91236.1, ZP_07792758.1,
ACZ64723.1, ADO21743.1, ADO21759.1, ACZ64752.1, ADO21755.1, ACD75517.1,
YP_790621.1, ACB11551.1, ADO21748.1, NP_251264.1, ZP_01365940.1, ADO21762.1,
ADO21739.1, ACU43496.1, ABO61854.1, ZP_06878434.1, ACU43489.1, ACU43483.1,
ADO21746.1, ACT91237.1, ZP_01895378.1, ACT91164.1, ADO21736.1, ACJ22711.1,
30 ACZ64754.1, ZP_05042146.1, ADO21688.1, ADO21648.1, YP_001348003.1, ADP98656.1,
ADO21737.1, ADO21760.1, ADO21754.1, ADO21740.1, ACZ64758.1, ACU43497.1,
ZP_01912185.1, ABB96111.1, ACU43482.1, ACB11549.1, ADO21775.1, CCA29157.1,

ADO21681.1, ADO21668.1, ADO21656.1, ACU43517.1, ACT91165.1, ACJ22695.1,
ACJ22688.1, ABB96071.1, ADO21763.1, ACT91241.1, ADO21735.1, ACB11550.1,
ADO21778.1, ACT91172.1, ADO21765.1, ABB96087.1, CBJ30233.1, ACJ22752.1,
ABB96105.1, ACB15251.1, ACJ22694.1, ACZ64741.1, ACZ64706.1, ABB96108.1,
5 ACT91191.1, ABB96101.1, ABB90691.1, ACZ64745.1, YP_691842.1, ABB96075.1,
ABB90682.1, ABB90690.1, ADO21676.1, ADO21679.1, ABO61768.1, YP_435857.1,
ACJ22722.1, ACT91238.1, ACZ64725.1, CAC14062.1, ADO21682.1, ACZ64771.1,
ACZ64718.1, ACZ64724.1, ADO21670.1, ADO21667.1, CAC37048.1, ACZ64708.1,
ABB96092.1, ACJ22687.1, ACZ64703.1, ADO21690.1, ABB92364.1, ACB11547.1,
10 ACZ64720.1, ADO21655.1, ACZ64717.1, ADO21680.1, ACZ64757.1, ACZ64733.1,
ACT91144.1, ACU43481.1, ACT91179.1, ZP_02181409.1, ACZ64704.1, ABB96073.1,
ACJ22675.1, ACZ64721.1, ABB96090.1, ACJ22729.1, ACU43515.1, ZP_01307000.1,
ABB90685.1, YP_003862088.1, ACZ64715.1, ACZ64710.1, ACJ22735.1, ABB90687.1,
ADO21661.1, ADO21674.1, ACT91177.1, ABB54492.1, ABB96076.1, ABB92365.1,
15 ACT91194.1, ADO21689.1, ACJ22691.1, ABB90681.1, ADO21649.1, ADO21671.1,
ACZ64728.1, ABB96095.1, CAC40945.1, ADO21652.1, ADO21665.1, ADE08461.1,
ADO21678.1, ACZ64705.1, ACJ22690.1, ADO21675.1, ADO21685.1, ABB96072.1,
ACJ22736.1, ACB11540.1, ABB96091.1, ACI04540.1, ACT91251.1, ACT91146.1,
ACT91166.1, ACT91156.1, ADO21752.1, ADO21673.1, ADO21725.1, ABB96104.1,
20 ABB90694.1, ABB90696.1, ACT91173.1, ADO21647.1, ZP_03700804.1, ACT91232.1,
ADO21694.1, CAC40949.1, ABB92361.1, ACT91195.1, ACI04538.1, ADO21691.1,
ACJ22685.1, ADO21653.1, ABS12461.1, ACZ64736.1, ACZ64772.1, ABB90680.1,
ADO21659.1, ACZ64774.1, ADO21684.1, ADO21729.1, ADO21650.1, ADO21733.1,
ACZ64755.1, ACZ64751.1, ABA55775.1, ADO21738.1, CCA29174.1, ADO21669.1,
25 ACZ64744.1, ADO21654.1, ADO21768.1, ABB96106.1, CCA29168.1, ACT91176.1,
ACB11555.1, ABB90695.1, ADO21660.1, ACJ22666.1, ACZ64778.1, ADO21766.1,
ADO21677.1, ZP_02161687.1, CCA29165.1, ADO21745.1, ACB11548.1, ABB90689.1,
ABB96107.1, AAT46052.1, ADO21718.1, ADO21722.1, ABB96088.1, EFW40271.1,
ADO21686.1, ABB96103.1, ACU43500.1, ACB11536.1, ABB92360.1, CCA29167.1,
30 ACT91199.1, ACZ64770.1, ACJ22716.1, ABA55786.1, ACZ64737.1, ABB96083.1,
ACJ22676.1, ACZ64735.1, ACT91212.1, ACJ22765.1, CAJ01371.1, CAC17734.1,
ABD36389.1, ACB11537.1, CAC08515.1, ACZ64714.1, ACU43513.1, ABB96082.1,

- 106 -

ADN21387.1, ADO21711.1, ABD36392.1, ABR10770.1, CAC37049.1, ABB96098.1,
ABB90692.1, ACB11535.1, ACZ64768.1, ACJ22756.1, ABB96094.1, ABA55791.1,
ABB96078.1, ACT91141.1, ACZ64779.1, ACZ64750.1, CAJ01370.1, ACZ64753.1,
ACU43480.1, ABA55794.1, ABB96085.1, ABB96110.1, YP_004448035.1, ACZ64709.1,
5 ABB96102.1, ACZ64773.1, CCA29175.1, ACZ64749.1, ACZ64756.1, ACZ64781.1,
ABO61777.1, ACZ64759.1, ACZ64764.1, ACZ64740.1, ACT91249.1, ZP_03702922.1,
ACB11545.1, ACZ64775.1, ACZ64769.1, ACT91145.1, ACZ64742.1, ACT91254.1,
ACZ64762.1, ACZ64716.1, ACZ64777.1, ADM26559.1, ABB96096.1, ACZ64780.1,
ZP_01201250.1, CAH55829.1, ZP_01052921.1, ABB96077.1, ADO21658.1, ACT91161.1,
10 ABB90684.1, ACR56750.1, ABB90697.1, ACZ64746.1, ABB92367.1, ACT91139.1,
ACZ64763.1, ACT91200.1, ABO61773.1, ABB96081.1, ACZ64748.1, ACZ64782.1,
ACU43498.1, ADO21651.1, ABB90679.1, BAG06233.1, ACZ64747.1, ABB96086.1,
ACZ64761.1, ABB92370.1, ABO61774.1, ACT91175.1, ABB90686.1, ACB11546.1,
ZP_01740604.1, ABO61785.1, YP_001531377.1, XP_001434539.1, ABA55767.1,
15 ABO21865.1, ABF55636.1, ABA55751.1, ABB90698.1, ADD12311.1, ACZ64765.1,
ABB92366.1, ABB92368.1, ACI04539.1, XP_001023288.1, ACZ64783.1, ADO21692.1,
ZP_01753800.1, ACZ64760.1, ACZ64700.1, ZP_01055480.1, ACZ64767.1, ACZ64701.1,
ABA55745.1, ABA55752.1, ACZ64766.1, YP_614640.1, ABA55759.1, ADO21723.1,
BAG06232.1, ZP_01002389.1, ABB90693.1, ACT91264.1, ABB92358.1, BAF99026.1,
20 ABR10769.1, ZP_00959618.1, AEA08580.1, ADD22986.1, CAB51023.1, CAC40958.1,
ADO21709.1, CAB51025.1, ACI15226.1, ACJ22680.1, ZP_05741459.1, ACT91248.1,
ABU48567.1, ABO61792.1, ACJ22754.1, EFN53276.1, AAL87644.1, ACT91209.1,
ZP_02147281.1, ACU43518.1, ACZ64776.1, ACB11543.1, ACT91151.1, ACJ22764.1,
ACT91159.1, ABA18186.1, AEA08579.1, ADO21770.1, ABF55634.1, CAA27179.1,
25 ABA55741.1, ADO21705.1, ZP_01754375.1, ACB11541.1, ACR56751.1, ACT91250.1,
ADO21769.1, ADO21753.1, ABB96097.1, ACT91208.1, ABO21867.1, ADO21757.1,
ACB11554.1, ABA55749.1, CAC40951.1, ADO21719.1, ABB96074.1, ZP_00954267.1,
ZP_05786269.1, AEH76912.1, ABA55742.1, ABA55748.1, BAG06236.1, ADO21732.1,
ABA55750.1, ABA55768.1, ACT31522.1, ZP_05090796.1, ACZ64739.1, YP_915886.1,
30 ADO21731.1, CAC40948.1, XP_001032273.1, AEH76911.1, ABA55743.1, ABO61769.1,
ABA55755.1, ZP_05122263.1, ADO21756.1, ABA55744.1, ABA55746.1, ZP_01901011.1,
ZP_02150761.1, ADO21742.1, ACR56752.1, ABA55747.1, ABF55637.1, ABA55740.1,

ABA55760.1, ZP_00948812.1, ABA55804.1, ADO21771.1, ZP_05342453.1, ABF55638.1,
YP_508336.1, ABB92357.1, ZP_01049702.1, ABU48546.1, ABU48555.1, ABA55764.1,
ABO21866.1, ZP_05079274.1, ZP_01880441.1, ACZ64738.1, ZP_05842058.1, ACT91218.1,
ABA55769.1, ABA55739.1, ABA55803.1, ACT91247.1, ABA55782.1, ACZ17539.1,
5 ABB92359.1, ACH69966.1, ZP_01035050.1, ACZ17537.1, ABA55774.1, ACZ64729.1,
ACZ17538.1, ZP_01751972.1, ACZ64731.1, ACZ64702.1, AAR13803.1, AEJ28400.1,
ZP_05099213.1, CAB51021.1, ACZ17531.1, AEH76914.1, ZP_05051648.1, ACZ64726.1,
ACZ17540.1, ACZ64727.1, ZP_02152773.1, ACT91253.1, ACZ17536.1, XP_001423873.1,
ACZ17534.1, YP_168645.1, ACZ17520.1, ABY56786.1, ACB11539.1, ZP_01157350.1,
10 AEH76910.1, ABY56784.1, AAY85982.1, ACT91257.1, ACB11544.1, ACZ17532.1,
ZP_01746661.1, ABA55771.1, BAG06235.1, EGR32049.1, YP_001166282.1, ABO61799.1,
ABA55757.1, AEH76915.1, ACO59264.1, ABO26125.1, AEA08577.1, ACT91265.1,
ABY56785.1, ACZ17528.1, ABO61798.1, ADO21749.1, ACT91263.1, ACT91252.1,
ACZ64722.1, ABO61771.1, ACZ17526.1, ABO26123.1, ADO21714.1, ZP_01000906.1,
15 ABO61796.1, ADC29534.1, ACB15250.1, ACD47155.1, ACZ17525.1, ACB11553.1,
ABD36391.1, AEH76913.1, ACZ17523.1, ABO61781.1, ACZ17524.1, ZP_01914093.1,
ACB11538.1, ZP_01015838.1, ACJ22693.1, ACB15252.1, CAC86945.1, ACO59265.1,
ABO61791.1, ACZ17521.1, ABO26124.1, ACZ64732.1, ACU43514.1, ACT91256.1,
ACM63043.1, ACS75820.1, ZP_08666479.1, CAH03133.1, BAG06234.1, AEH76916.1,
20 ABO61790.1, ABE72965.1, ACZ64711.1, ACB11542.1, AAY26148.1, ABA55776.1,
ACZ17522.1, ACZ64734.1, AEA08578.1, ACZ17530.1, ZP_04062748.1, ACJ22755.1,
NP_969039.1, AAY26149.1, ACJ22761.1, ABU48543.1, ZP_08414255.1, AAT91720.1,
ZP_01444283.1, ABA55796.1, ABU48542.1, YP_001042010.1, YP_001234392.1,
YP_351510.1, ACZ64730.1, ZP_08634611.1, ACZ17529.1, ACJ22667.1, AAT91719.1,
25 YP_004283531.1, ABO61801.1, ACZ17519.1, ABO15266.1, CAB51040.1, ACZ64707.1,
ACJ22766.1, ABO26121.1, ZP_01878984.1, CAB51039.1, ABA55795.1, ABO15269.1,
ABO15247.1, ACJ22763.1, ABO15251.1, ACZ17527.1, ABO15270.1, ACJ22769.1,
ADE06670.1, ZP_05780387.1, ABO61770.1, ACT91258.1, ABO15258.1, ABO15257.1,
ABU48545.1, CAC86946.1, ABO15267.1, ZP_01741446.1, ABU48544.1, YP_002296646.1,
30 AEH76917.1, ADC29550.1, YP_002527219.1, ABK88246.1, ADN21388.1, ACT91210.1,
ZP_05064795.1, ABJ16487.1, XP_002675644.1, ABJ16489.1, ADA71089.1, ADA71088.1,
AAT46053.1, ZP_01744806.1, ZP_01037964.1, ZP_00955262.1, ABJ16493.1,

YP_001840157.1, ZP_00964204.1, ABB40596.1, ACB15249.1, ADD82963.1,
YP_004499590.1, ZP_01011524.1, ACJ22758.1, ZP_01748906.1, ACV30052.1,
ZP_06191942.1, YP_001188029.1, ACD63080.1, YP_166583.1, AAV41375.1, ZP_00998265.1,
ACJ22757.1, ABB13506.2, ABI13999.1, ABI14004.1, ABB13509.1, YP_371980.1,
5 ZP_01755711.1, ZP_05065835.1, ZP_00959368.1, XP_001020063.1, ABJ16481.1,
ABI14006.1, ZP_05101918.1, ZP_01913733.1, ABI14001.1, ABM92270.1, ABI14003.1,
CAH03132.1, YP_973211.1, ABA55797.1, YP_003578527.1, ABJ16483.1, ABJ16482.1,
CBY78068.1, ACT91260.1, YP_509155.1, ABB13508.1, ABJ16485.1, ABO61779.1,
ABI14005.1, ACM63042.1, ADC29543.1, ZP_02153440.1, YP_709335.1, ABI13998.1,
10 ABI14002.1, AAB70825.1, ACX30751.1, ABI14000.1, YP_003617173.1, ZP_01155421.1,
ACX30752.1, NP_542887.1, ADC29546.1, AAC38359.1, ADC29541.1, XP_001020064.1,
ZP_01442436.1, ZP_05103090.1, ADC29544.1, ABO61809.1, AAY89939.1, ACH99235.1,
CAH55830.1, ABO26095.1, YP_004011670.1, ABO26084.1, ADA71083.1, ABO26087.1,
ABO61806.1, ADC29531.1, ABO26109.1, ACJ22753.1, ABO26089.1, ABO26093.1,
15 ABO26092.1, ABO61827.1, ABO26105.1, ABO26112.1, AAT91721.1, ABO26120.1,
ABO26090.1, ABO26088.1, ABO61811.1, ABO61783.1, CAH55827.1, ACH99232.1,
ABO61828.1, ADC29530.1, ACH99234.1, AAQ88276.1, CAH55823.1, ABO26103.1,
ACH99233.1, ABO61836.1, ABO26094.1, ABO61840.1, YP_004534277.1, ZP_05845010.1,
ABO61821.1, ACH99231.1, AAV68403.1, ABO61839.1, CAH56098.1, ABO26085.1,
20 ABO61826.1, ABO61822.1, ABO26110.1, ABO61810.1, ABO61844.1, ABO61825.1,
ABO26099.1, ACJ22767.1, ABO26102.1, YP_004535707.1, ACJ22762.1, ABO26097.1,
BAC65444.1, ABO61829.1, YP_114083.1, CAH55828.1, ABO26106.1, YP_552229.1,
NP_049190.1, ABO26116.1, CAH56107.1, CAM32407.1, ABO26101.1, ABO61841.1,
ABM79805.1, ZP_05075249.1, AAC27438.2, YP_003754872.1, ADC29532.1, ADA71139.1,
25 ADA71107.1, ADA71095.1, YP_001268217.1, ADA71126.1, ADA71094.1, CAH56108.1,
ADC29533.1, ADA71085.1, ZP_05054453.1, ADA71097.1, ADA71086.1, ADA71114.1,
ADC29548.1, ADA71101.1, ADC29547.1, ADA71138.1, ADC29542.1, ADA71098.1,
ADA71128.1, ADA71105.1, ADA71093.1, ADA71135.1, ADA71100.1, YP_557479.1,
ADA71113.1, ADA71091.1, ADC29537.1, ADA71084.1, ADA71090.1, CAH56094.1,
30 XP_002945767.1, ADA71137.1, ADA71103.1, ADA71118.1, ADA71133.1, ADA71102.1,
ADC29536.1, CAH56100.1, CAH56101.1, ACI15225.1, ACI15225.1, ABO26091.1,
CAH55826.1, CAH55824.1, ZP_08484419.1, ADA71111.1, ACJ22759.1, CAH55825.1,

CAH56106.1, CAH56099.1, CAC40957.1, ZP_05075037.1, CAH56102.1, ZP_06846296.1, ABJ16491.1, ZP_05067177.1, XP_001698107.1, BAH10789.1, BAH10791.1, BAH10793.1, BAH10788.1, ABJ16490.1, BAH10800.1, BAH10790.1, BAH10792.1, ZP_05075214.1, BAH10799.1, BAH10795.1, BAH10787.1, BAH10798.1, BAH10794.1, BAH10801.1, 5 BAH10796.1, BAH10797.1, BAH10802.1, CAH56095.1, CAH56096.1, ADC29538.1, ABX76425.1, ZP_06727686.1, ZP_07774883.1, YP_001615042.1, insbesondere YP_001185946.1, Q9WWW6.1, YP_957898.1, YP_957728.1, YP_694427.1, BAC98365.1, ZP_00957064.1, CAC86944.1, YP_001672212.1, CAB59525.1, ACH99213.1, ACH99215.1, ACH99216.1, AAK56792.1, ACH99229.1, ACS91348.1, AAP41820.1

10 und besonders bevorzugt YP_001185946.1, sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder 15 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro 20 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{1b} generell insbesondere die Umsetzung von Laurinsäure und/oder Laurinsäuremethylester zu ω -Hydroxy-Laurinsäure und/oder ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester 25 verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_{1c}

30 In diesem Zusammenhang bevorzugte eukaryotische Fettalkoholoxidasen E_{1c} sind ausgewählt aus der Liste

- 110 -

AAS46878.1, ACX81419.1, AAS46879.1, CAB75353.1, AAS46880.1, XP_712350.1,
XP_002422236.1, XP_712386.1, EEQ43775.1, XP_001525361.1, XP_001386087.1,
XP_459506.2, CAB75351.1, CAB75352.1, XP_001385255.2, EDK39369.2, XP_001484086.1,
XP_002618046.1, XP_002548766.1, XP_002548765.1, XP_003041566.1, XP_003328562.1,
5 XP_001214264.1, XP_001904377.1, XP_658227.1, XP_001591990.1, XP_753079.1,
XP_002569337.1, XP_001268562.1, XP_003348911.1, EGP90120.1, XP_001389382.1,
EER37923.1, XP_001264046.1, EGO58212.1, XP_001554225.1, XP_003298648.1,
XP_959005.1, XP_002841296.1, XP_001940486.1, EGR52262.1, EEQ89581.1, EGD99881.1,
EFQ33355.1, XP_001821106.1, XP_002622231.1, EGG03784.1, EGC44059.1,
10 XP_003018036.1, XP_003011696.1, EFY90752.1, XP_001227812.1, XP_758170.1,
XP_001243546.1, XP_002479333.1, XP_003344707.1, EFW14100.1, XP_003071927.1,
XP_003171263.1, XP_003051757.1, XP_002147053.1, EEH19591.1, EEH50473.1,
XP_001792978.1, XP_387094.1, EFY98644.1, XP_002788971.1, XP_002842592.1,
EFX04185.1, XP_003231449.1, XP_001729067.1, CBX94189.1, XP_001413535.1,
15 ACF22878.1, B5WWZ9.1, XP_002994642.1, XP_002269629.1, XP_002519938.1,
XP_002982582.1, NP_001047464.1, EEC73620.1, XP_002981110.1, XP_002960521.1,
NP_566729.1, XP_001541970.1, XP_002967201.1, BAK00483.1, XP_002182547.1,
BAK02336.1, XP_002454190.1, XP_002328753.1, XP_002867943.1, XP_002285334.1,
CAC87643.1, CAN71289.1, XP_002454188.1, AAL31049.1, XP_002464494.1, AAL31021.1,
20 YP_117187.1, XP_002543430.1, CAA18625.1, XP_002883430.1, NP_193673.2,
XP_002529832.1, XP_001753124.1, NP_001142399.1, ACN27562.1, XP_002464495.1,
ACR36691.1, BAJ86655.1, B5WWZ8.1, NP_001148058.1, ABR17814.1, EAY78905.1,
NP_194586.1, AAM63097.1, AAK64154.1, NP_001064839.2, XP_002869492.1,
XP_002314488.1, AAL31024.1, ZP_06967355.1, AAP54248.2, XP_002311685.1, ACF87929.1,
25 YP_907078.1, EGE07035.1, YP_001849908.1, XP_002464496.1, EEC67160.1, AAL31027.1,
XP_001761391.1, XP_002961172.1, XP_002528823.1, XP_002966834.1, NP_001176205.1,
XP_001763007.1, XP_002272123.1, XP_002889487.1, XP_003003157.1, NP_285451.1,
EGG23219.1, NP_171895.2, YP_003395677.1, Q9ZWB9.1, ACF88407.1, ZP_06413771.1,
EEE51131.1, YP_003835264.1, YP_003397164.1, YP_004081922.1, XP_003294587.1,
30 EEE51130.1, YP_003647529.1, YP_003647985.1, CBI29206.3, XP_629786.1,
ZP_07964664.1, EEE57396.1, EEH09589.1, YP_003265796.1, YP_001840752.1,
ZP_08620775.1, ACR36076.1, ZP_05043749.1, YP_980677.1, ZP_05043728.1, YP_692894.1,

- 111 -

NP_710223.1, EEC67159.1, AAP03110.1, EFA85697.1, YP_691805.1, YP_551012.1,
YP_001174466.1, YP_002796294.1, YP_004716331.1, YP_001019547.1, YP_585737.1,
AEA86007.1, YP_960830.1, YP_004743970.1, ZP_03431349.1, ZP_06448642.1,
ZP_07430351.1, NP_215006.2, ZP_03535393.1, ZP_06801690.1, YP_001849132.1,
5 NP_854165.1, ZP_03427234.1, CBJ27378.1, NP_334920.1, ZP_08571383.1, YP_728161.1,
ZP_01896040.1, ZP_03530923.1, YP_551306.1, YP_003167456.1, YP_606070.1,
ZP_06850167.1, ADP99095.1, YP_907986.1, ZP_04924166.1, ZP_08139923.1,
YP_001270300.1, YP_521830.1, YP_003147410.1, YP_002007173.1, ADR62464.1,
YP_004382294.1, NP_747223.1, YP_004687462.1, NP_902159.1, ZP_04936784.1,
10 YP_003914667.1, ZP_01306356.1, ZP_04750553.1, YP_002875279.1, YP_004704374.1,
YP_001671392.1, NP_249055.1, ZP_06876360.1, YP_001345853.1, YP_002437969.1,
YP_004356853.1, YP_351075.1, CBI23676.3, YP_001189668.1, YP_001528881.1,
YP_001613612.1, YP_001747218.1, YP_003393002.1, YP_001365074.1, ZP_07778129.1,
ZP_07392715.1, YP_001553329.1, YP_262925.1, YP_751961.1, YP_564183.1,
15 YP_003811876.1, YP_002356821.1, YP_001051828.1, YP_001837525.1, NP_716513.1,
ZP_01915079.1, ZP_02156621.1, YP_001184631.1, YP_001475595.1, ZP_05042393.1,
YP_962228.1, YP_001612275.1, ADV55625.1, YP_001675797.1, YP_003555260.1,
ZP_01075039.1, YP_003812822.1, YP_001503351.1, EFN52938.1, YP_001759063.1,
ZP_06503577.1, YP_871025.1, ZP_08564919.1, YP_002310162.1, YP_732875.1,
20 YP_001092722.1, YP_739324.1, XP_002333995.1, NP_085596.1, YP_928870.1,
EGD05748.1, NP_443993.1, ZP_08138057.1, ZP_05041587.1, ZP_07011380.1,
YP_001612684.1, ZP_07669342.1, ZP_06508361.1, ZP_03423639.1, YP_923293.1,
ZP_05061865.1, ZP_08181496.1, YP_559605.1, ZP_06841320.1, ZP_01620712.1,
YP_001896340.1, ZP_03276650.1, YP_004303194.1, ZP_08180715.1, ZP_06382740.1,
25 ZP_01034555.1, YP_004604560.1, YP_001020142.1, YP_935375.1, ZP_01546137.1,
ZP_07661079.1, YP_001860640.1, ZP_06052841.1, ZP_01881170.1, ZP_05781455.1,
YP_932732.1, ZP_08119300.1, YP_004715268.1, ZP_03697402.1, YP_004126957.1,
ZP_06703136.1, NP_642445.1, ZP_08273900.1, YP_004524313.1, ZP_01902993.1,
YP_001900094.1, AEA84888.1, YP_004690289.1, NP_714358.1, YP_682471.1, YP_003239.1,
30 YP_997465.1, YP_003452130.1, ZP_01739153.1, YP_004219483.1, YP_001761298.1,
ZP_01438251.1, CBI37146.3, ZP_04748383.1, YP_004362245.1, ZP_05912795.1,
YP_003390234.1, YP_003122799.1, CCB77579.1, EGB06416.1, ZP_08389346.1,

- 112 -

YP_191496.1, ZP_05224727.1, ZP_01125614.1, YP_466287.1, YP_001368620.1,
YP_001380256.1, YP_002361951.1, YP_002756103.1, YP_001801399.1, ZP_06847140.1,
YP_003200069.1, YP_001940247.1, YP_001584322.1, ZP_04679227.1, YP_002493674.1,
YP_002135530.1, YP_004290424.1, YP_001772011.1, ZP_08189046.1, ZP_03423640.1,
5 YP_001834251.1, ZP_01041752.1, YP_001533410.1, YP_269751.1, YP_002432994.1,
YP_003694653.1, CAD47896.1, NP_769359.1, YP_004239460.1, YP_004605221.1,
YP_001961214.1, YP_001837513.1, YP_004335962.1, YP_004358600.1, ZP_05050026.1,
YP_003202983.1, BAD03777.1, ZP_02165013.1, NP_774131.1, YP_432169.1,
ZP_05000547.1, YP_001261233.1, XP_002593969.1, XP_002603265.1, YP_003342435.1,
10 ZP_01253183.1, EGO36831.1, YP_001866737.1, YP_001523879.1, YP_133594.1,
YP_003768990.1, YP_001237820.1, YP_003133224.1, ZP_01896771.1, ZP_01865125.1,
NP_960319.1, YP_826958.1, YP_003326608.1, YP_002219515.1, NP_217926.1,
ZP_07441899.2, YP_001208178.1, ADM42038.1, YP_002433510.1, ZP_08274313.1,
EGO38668.1, ZP_03393221.1, NP_356358.1, ZP_06055780.1, YP_001684562.1,
15 ZP_08528157.1, BAD03162.1, YP_001800712.1, ACL37106.1, YP_883489.1, ZP_01075202.1,
NP_969446.1, ZP_01129577.1, YP_001530285.1, ZP_04746501.1, YP_001341980.1,
YP_905003.1, ZP_05218299.1, ZP_08665577.1,
bevorzugt
AAS46878.1, ACX81419.1, AAS46879.1, CAB75353.1, AAS46880.1, XP_712350.1,
20 XP_002422236.1, XP_712386.1, EEQ43775.1, XP_001525361.1, XP_001386087.1,
XP_459506.2, CAB75351.1, CAB75352.1, XP_001385255.2, EDK39369.2, XP_001484086.1,
XP_002618046.1, XP_002548766.1, XP_002548765.1, XP_003041566.1, XP_001214264.1,
XP_001904377.1, XP_658227.1, XP_001591990.1, XP_753079.1, XP_002569337.1,
XP_001268562.1, XP_003348911.1, EGP90120.1, XP_001389382.1, EER37923.1,
25 XP_001264046.1, EGO58212.1, XP_001554225.1, XP_003298648.1, XP_959005.1,
XP_002841296.1, XP_001940486.1, EGR52262.1, EEQ89581.1, EGD99881.1, EFQ33355.1,
XP_001821106.1, XP_002622231.1, EGC44059.1, XP_003018036.1, XP_003011696.1,
EFY90752.1, XP_001227812.1, XP_001243546.1, XP_002479333.1, XP_003344707.1,
EFW14100.1, XP_003071927.1, XP_003171263.1, XP_003051757.1, XP_002147053.1,
30 EEH19591.1, EEH50473.1, XP_001792978.1, XP_387094.1, EFY98644.1, XP_002788971.1,
XP_002842592.1, EFX04185.1, XP_003231449.1, CBX94189.1, XP_001413535.1,
XP_001541970.1, XP_002543430.1, EGE07035.1, XP_003003157.1

und besonders bevorzugt

AAS46878.1, ACX81419.1, AAS46879.1, CAB75353.1, AAS46880.1, XP_712350.1, XP_002422236.1, XP_712386.1, EEQ43775.1, CAB75351.1, CAB75352.1, XP_002548766.1, XP_002548765.1,

5 sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

10 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
15 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{1c} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-ol zu Dodekan-1-al bzw. Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

20

Bestimmte Enzyme E_{1d}

Solche bevorzugten AlkJ Alkoholdehydrogenasen sind ausgewählt aus

Q00593.1, Q9WWW2.1, ZP_00957061.1, YP_957894.1, CAC38030.1, YP_694430.1,
25 YP_957725.1, YP_001672216.1, YP_552061.1, YP_130410.1, ZP_06155535.1,
ZP_01222730.1, YP_691907.1, YP_002297804.1, YP_004283522.1, YP_001234383.1,
YP_004435031.1, ZP_05110316.1, ZP_05042898.1, YP_004466324.1, ZP_08553549.1,
YP_004125220.1, ADI22536.1, ADI18461.1, YP_003810975.1, YP_662346.1,
YP_004427557.1, YP_692606.1, ZP_05043291.1, YP_440752.1, ZP_02386160.1,
30 ZP_04763547.1, ZP_02361232.1, YP_003376674.1, ZP_02354055.1, ZP_05085930.1,
ADQ00130.1, YP_003643016.1, ZP_05040520.1, YP_691922.1, AAX23098.1, BAD07371.1,
NP_104379.1, YP_002551960.1, YP_003908558.1, YP_987903.1, ZP_05785860.1,

YP_004145612.1, YP_004140926.1, CAZ88300.1, ZP_05041901.1, YP_533645.1,
ZP_01754259.1, CBA31223.1, YP_587542.1, YP_106852.1, ZP_08402506.1, ZP_05055020.1,
ZP_02400829.1, YP_104747.1, ZP_02409412.1, YP_001057269.1, YP_004229837.1,
YP_294429.1, YP_001028112.1, ZP_02479747.1, YP_002874799.1, ZP_03541051.1,
5 YP_003606536.1, ZP_02887167.1, YP_001795572.1, YP_487451.1, ACZ62814.1,
YP_560809.1, ZP_02167462.1, YP_004482869.1, YP_001581248.1, ZP_07374066.1,
YP_001203981.1, ZP_06840259.1, ZP_01915145.1, NP_774525.1, ZP_03561080.1,
YP_001208258.1, YP_001897374.1, YP_001413909.1, YP_366469.1, YP_521854.1,
YP_004490642.1, YP_003280349.1, ZP_03588744.1, YP_001562229.1, YP_001120981.1,
10 ZP_03574970.1, YP_004234225.1, ZP_02377531.1, ZP_02149954.1, YP_001237360.1,
ZP_03266156.1, YP_782821.1, YP_004754039.1, BAB61732.1, ZP_07046388.1,
ZP_02145452.1, BAF45123.1, YP_002129953.1, YP_003812439.1, ZP_01055291.1,
BAF45124.1, EGH71399.1, ZP_05060389.1, ZP_05090872.1, BAF45126.1, BAB07804.1,
ZP_06053464.1, YP_001238278.1, ZP_04944469.1, YP_001171160.1, YP_002984373.1,
15 YP_002237649.1, ZP_08276443.1, BAF98451.1, ZP_05124197.1, YP_568640.1,
ZP_05785341.1, NP_769037.1, YP_370657.1, YP_775005.1, ZP_02911119.1, YP_165460.1,
ZP_02891796.1, YP_622328.1, ZP_07675057.1, YP_001901188.1, YP_003592183.1,
ZP_02361040.1, NP_518244.1, YP_001809673.1, NP_947032.1, YP_001766369.1,
YP_002255997.1, ZP_04940241.1, YP_004012032.1, YP_841049.1, YP_002983249.1,
20 YP_003643276.1, YP_003855487.1, YP_003778137.1, ZP_02361104.1, CBA30511.1,
ZP_05781295.1, YP_756865.1, ZP_02461782.1, YP_002007988.1, YP_004110133.1,
YP_002229680.1, ZP_02386040.1, YP_004684069.1, YP_373268.1, YP_440614.1,
NP_421441.1, YP_264896.1, YP_004362617.1, ZP_06053847.1, YP_366538.1,
YP_003812285.1, YP_004154520.1, ZP_01901081.1, ZP_02372179.1, ZP_02453559.1,
25 ADP98564.1, YP_003747084.1, ZP_02487888.1, ZP_01768075.1, ZP_02400664.1,
YP_106680.1, YP_724753.1, YP_002907583.1, YP_004482470.1, YP_167582.1,
YP_270109.1, YP_004362333.1, ZP_02504034.1, YP_003189363.1, YP_973212.1,
ZP_00952746.1, YP_459665.1, YP_777218.1, YP_581107.1, ZP_01878091.1,
ZP_01057973.1, YP_002913124.1, ZP_01035570.1, YP_001777560.1, YP_552627.1,
30 ZP_02890876.1, YP_587146.1, YP_004141814.1, YP_001685369.1, ZP_05343380.1,
NP_886000.1, ZP_04942359.1, ZP_01913732.1, ZP_08244266.1, YP_002233254.1,
ZP_01816670.1, YP_837233.1, ZP_07478008.1, ZP_01985205.1, ZP_07473972.1,

ZP_01067090.1, ZP_01867788.1, ZP_01754024.1, EGM19144.1, ZP_07741283.1,
ZP_06876839.1, YP_002395287.1, ZP_07795498.1, NP_102692.1, NP_252789.1,
YP_004451100.1, ZP_01305514.1, YP_002438481.1, ZP_04930310.1, YP_001810189.1,
YP_104187.1, ZP_01367534.1, YP_001346382.1, ZP_01878466.1, YP_789017.1,
5 YP_001115422.1, ZP_05067451.1, ZP_05842072.1, YP_001682976.1, YP_761348.1,
YP_004611600.1, YP_004188241.1, NP_419761.1, EFV85163.1, YP_684227.1,
ZP_06177455.1, NP_935088.1, YP_004614491.1, ZP_08697916.1, YP_004689366.1,
ZP_05052326.1, YP_267420.1, YP_728575.1, YP_001759584.1, YP_557446.1,
ZP_06844897.1, ZP_06079799.1, YP_003771143.1, ZP_05094472.1, YP_511622.1,
10 ACF98205.1, YP_582314.1, ZP_07660450.1, YP_004065269.1, YP_003979606.1,
YP_002520401.1, YP_003579281.1, ZP_01749397.1, ZP_03265018.1, ZP_07283393.1,
YP_001532150.1, YP_298941.1, ZP_06688181.1, ZP_01611660.1, ZP_02367747.1,
EGP42870.1, ZP_00993245.1, ABY65992.1, YP_354800.1, ZP_01747277.1, YP_561728.1,
ZP_02190947.1, YP_605824.1, YP_001991873.1, ZP_00955792.1, YP_003594401.1,
15 YP_004156101.1, YP_001472858.1, YP_001746950.1, ZP_08410042.1, ZP_01116604.1,
ADP99912.1, ZP_01692203.1, YP_001328534.1, YP_999236.1, YP_002278452.1,
ZP_01306234.1, YP_002871776.1, ZP_02369920.1, ZP_01896942.1, YP_002289724.1,
AEG07584.1, YP_999005.1, YP_003552461.1, YP_270668.1, ZP_06862917.1,
YP_001811327.1, YP_001166036.1, ABW06653.1, ZP_01548976.1, ZP_07774606.1,
20 ZP_05888080.1, YP_003301477.1, YP_341748.1, ZP_05100248.1, YP_918038.1,
YP_001500869.1, YP_004305296.1, YP_003342584.1, NP_947961.1, ZP_05124765.1,
ZP_01904700.1, YP_003696207.1, YP_004156699.1, YP_001241858.1, NP_104253.1,
YP_676241.1, ZP_01736903.1, ZP_00960121.1, NP_436019.1, YP_002945716.1,
YP_259594.1, EFV86615.1, AAY87334.1, NP_900970.1, AEG07409.1, YP_349087.1,
25 YP_004141055.1, YP_001169476.1, YP_001566960.1, YP_260472.1, ZP_07028078.1,
YP_004610468.1, YP_003066461.1, YP_961096.1, ZP_08666573.1, ZP_02187363.1,
YP_001631518.1, ZP_08141293.1, YP_001666324.1, NP_387083.1, YP_001526184.1,
YP_165213.1, YP_003694923.1, YP_004433897.1, YP_001265431.1, ZP_05068964.1,
YP_002313077.1, ZP_02372305.1, YP_004486039.1, YP_341901.1, YP_001862312.1,
30 YP_004681983.1, YP_617373.1, EFV86570.1, YP_001673285.1, BAK39604.1,
YP_001669327.1, YP_004353150.1, YP_001888124.1, ZP_08645365.1, YP_003410784.1,
YP_841363.1, EGP44033.1, YP_001633470.1, EGP42855.1, ZP_01115125.1, ADR57794.1,

YP_784649.1, YP_373898.1, Q47944.1, YP_001117950.1, ZP_02380339.1, ZP_03697092.1,
YP_003187112.1, YP_004065439.1, NP_742226.1, YP_002429878.1, YP_003556403.1,
AEH81535.1, YP_001887935.1, YP_554605.1, ZP_07333059.1, YP_001991668.1,
YP_003694210.1, YP_222680.1, YP_002232672.1, YP_001763402.1, YP_001806802.1,
5 YP_662156.1, ZP_05153429.1, ZP_01893457.1, ZP_04595387.1, ADP99389.1,
ZP_02890074.1, YP_001313582.1, NP_387401.1, ZP_01863693.1, YP_750630.1,
ZP_04939997.1, YP_268077.1, ZP_05169265.1, NP_888994.1, ZP_08408421.1,
YP_001155137.1, NP_699017.1, YP_002008190.1, YP_004493716.1, YP_266277.1,
YP_004654190.1, YP_943422.1, ZP_05162503.1, ZP_02905080.1, ZP_02905080.1,
10 ZP_03784461.1, YP_001601784.1, YP_002233786.1, YP_622842.1, YP_002822679.1,
ZP_04944312.1, ZP_05179897.1, YP_004483124.1, YP_003390414.1, YP_771968.1,
YP_001628465.1, YP_004311599.1, ZP_01037150.1, ZP_01611812.1, ZP_03575238.1,
YP_002278603.1, YP_001593845.1, EGD01613.1, YP_297574.1, YP_367509.1, YP_998315.1,
ZP_08664883.1, ZP_05114787.1, ZP_05450190.1, YP_298028.1, ZP_01034678.1,
15 YP_002827796.1, YP_372762.1, YP_004466723.1, ZP_01012072.1, YP_320380.1,
ZP_01075202.1, YP_001312358.1, YP_681895.1, ZP_07718189.1, EGP55868.1,
YP_003750799.1, YP_002984725.1, YP_002543360.1, ZP_01040714.1, ZP_04717111.1,
YP_002422932.1, YP_003506115.1, ZP_01444019.1, ZP_03587285.1, YP_771439.1,
YP_001947593.1, YP_001049712.1, YP_003979888.1, YP_001553786.1, YP_003980878.1,
20 YP_001578274.1, YP_472442.1, YP_778292.1, EGE56670.1, YP_002779312.1, YP_432169.1,
YP_560963.1, YP_001265285.1, YP_002822699.1, YP_002278091.1, ZP_08632361.1,
YP_002229178.1, ZP_06840392.1, ZP_05069105.1, ZP_00998644.1, YP_004487901.1,
YP_680905.1, YP_728088.1, YP_001985833.1, YP_002007099.1, ZP_05066777.1,
ZP_01551182.1, YP_002973332.1, ZP_04681414.1, ZP_07675148.1, AEH83964.1,
25 YP_004692042.1, CBJ36337.1, EGP48473.1, ZP_03585612.1, YP_001369428.1,
YP_001897527.1, AEG08472.1, YP_001166065.1, NP_437018.1, NP_294689.1,
YP_002541437.1, YP_004692953.1, NP_107484.1, YP_995681.1, YP_765267.1,
YP_166223.1, ZP_01740635.1, YP_001234127.1, ZP_02186681.1, YP_004140839.1,
YP_001584499.1, ADI17244.1, ZP_08698744.1, YP_001022991.1, EFV84582.1,
30 ZP_01743515.1, YP_001816113.1, YP_004688050.1, YP_001342912.1, ZP_01125614.1,
EGD05029.1, ZP_03569823.1, ZP_05089337.1, YP_001901091.1, NP_886663.1,
ZP_07718907.1, YP_004687387.1, NP_521464.1, ZP_06688394.1, ZP_08099738.1,

- 117 -

ZP_02885452.1, YP_003744085.1, YP_001328823.1, ZP_02488044.1, ZP_01015005.1,
YP_002983153.1, ZP_06898725.1, ZP_05886707.1, ZP_08101209.1, ZP_03319462.1,
YP_003134969.1, YP_001188857.1, YP_004557767.1, YP_004675666.1, YP_004358728.1,
YP_002252541.1, YP_684009.1, ZP_05085667.1, ZP_02144674.1, YP_004127560.1,
5 ZP_01901604.1, YP_004280074.1, AEG67402.1, YP_001416516.1, ZP_01054720.1,
ZP_08197897.1, NP_107235.1, YP_002909966.1, ZP_01545876.1, ZP_02147729.1,
ZP_00946537.1, ZP_01903844.1, ZP_05085589.1, ACV84069.1, YP_367172.1,
ZP_02165272.1, YP_701696.1, ZP_04935724.1, ZP_02191362.1, ZP_01740154.1,
ZP_07662819.1, NP_103908.1, YP_003159313.1, YP_003197010.1, ZP_02152342.1,
10 YP_001907189.1, YP_004387414.1, YP_001413869.1, ZP_01916549.1, ZP_03264661.1,
AAY82840.1, YP_003277969.1, YP_767433.1, ZP_01226234.1, EGE55950.1, NP_882474.1,
ZP_04680938.1, YP_004417965.1, ZP_01367142.1, EGM13684.1, YP_001262083.1,
ZP_01881606.1, ZP_01002680.1, YP_003606679.1, YP_001868359.1, ZP_01446736.1,
YP_004141411.1, YP_002438878.1, YP_002500414.1, EGP55675.1, ZP_08405873.1,
15 YP_002975318.1, YP_002823637.1, ZP_02188786.1, YP_004617386.1, ABL61001.1,
YP_004190679.1, YP_004418710.1, YP_001264994.1, NP_252399.1, ACA21517.1,
YP_002541208.1, YP_001369943.1, YP_789454.1, YP_004688060.1, YP_611623.1,
ZP_07795086.1, ZP_04929943.1, YP_004444316.1, ZP_01866687.1, ZP_05973466.1,
YP_004353327.1, ZP_05780591.1, ZP_05784784.1, NP_936564.1, ZP_05739211.1,
20 ZP_05113045.1, ZP_06689273.1, ZP_06972168.1, ZP_01616404.1, ZP_07659253.1,
ZP_05117914.1, YP_585662.1, YP_004230016.1, NP_763554.1, NP_744101.1,
ZP_02465308.1, ACN56476.1, YP_004689565.1, YP_001600608.1, ZP_06792595.1,
YP_001258553.1, ZP_05165722.1, ZP_03785098.1, YP_002276744.1, YP_002524856.1,
ADP98420.1, YP_001669248.1, ZP_04764988.1, ZP_08528163.1, ZP_08529409.1,
25 ZP_05944625.1, YP_676267.1, CBA26630.1, YP_001592413.1, YP_003486465.1,
ZP_02187562.1, ZP_03702891.1, YP_760283.1, ZP_05450850.1, YP_004533595.1,
ZP_02153313.1, YP_001859265.1, YP_001524099.1, ZP_06126913.1, ZP_07374926.1,
ZP_05050787.1, ZP_01035411.1, Q8YFY2.2, YP_002280903.1, EGM21512.1,
YP_004603010.1, ZP_05088581.1, YP_004302488.1, YP_004141219.1, NP_697569.1,
30 YP_003908705.1, YP_915505.1, YP_001789228.1, YP_001042739.1, YP_133405.1,
ZP_05180516.1, ZP_05174702.1, ZP_01438051.1, ZP_04590345.1, ZP_08411937.1,
NP_356519.2, ZP_00964019.1, ZP_00998343.1, ZP_05181994.1, YP_004107969.1,

- 118 -

ZP_02168070.1, ZP_01750865.1, YP_574504.1, YP_004579902.1, YP_104440.1,
ZP_05452167.1, ZP_05342702.1, YP_001862883.1, YP_004538242.1, ZP_07471513.1,
ZP_05169558.1, ZP_00956995.1, ZP_05096699.1, YP_004610916.1, ZP_01218118.1,
AAU95210.1, ZP_02405087.1, ZP_04890639.1, YP_352237.1, ZP_02413594.1,
5 ZP_07474023.1, NP_541317.1, YP_001993222.1, ZP_08199001.1, YP_471839.1,
ZP_02492080.1, ZP_04901176.1, ZP_06915396.1, ZP_07474845.1, ZP_07477743.1,
YP_004152647.1, YP_004755056.1, ZP_05086419.1, YP_004577547.1, ACD99850.1,
YP_980426.1, ZP_05457072.1, ZP_05936041.1, NP_700124.1, ADT85599.1, YP_110012.1,
ZP_05076113.1, YP_001068288.1, ZP_02457871.1, ZP_01014169.1, EGE60620.1,
10 YP_001346810.1, YP_003408795.1, YP_003769675.1, YP_001257876.1, EGH93583.1,
ZP_01442222.1, YP_331617.1, ZP_05636703.1, YP_001594896.1, YP_002822967.1,
YP_118823.1, ZP_01878717.1, ZP_07375284.1, YP_001371250.1, ZP_07658682.1,
YP_002898825.1, ZP_01547199.1, YP_223070.1, ZP_05161482.1, ZP_04679742.1,
YP_002778618.1, ZP_01626756.1, ZP_05101564.1, YP_002947374.1, NP_385053.1,
15 YP_001328117.1, YP_004493948.1, YP_003339515.1, YP_004699488.1, ZP_05101969.1,
YP_485352.1, ZP_01746033.1, ZP_06712293.1, ZP_01158125.1, ZP_01058616.1,
ZP_05739755.1, NP_949067.1, ZP_02364657.1, YP_570690.1, YP_001208663.1,
ZP_02357557.1, ZP_04751682.1, YP_001326253.1, YP_487666.1, ZP_05167919.1,
ADI18237.1, YP_002825245.1, ZP_02144858.1, ZP_02188790.1, ZP_06794586.1,
20 YP_001809828.1, YP_997974.1, YP_001476791.1, ZP_08635286.1, YP_676287.1,
ZP_07308228.1, ZP_04596242.1, YP_001622726.1, NP_699590.1, ZP_01446884.1,
YP_001168504.1, ZP_01616388.1, ZP_05117189.1, ZP_05876432.1, ADT64694.1,
ZP_01754911.1, ZP_05880498.1, ZP_02360829.1, ZP_06052433.1, ZP_08663540.1,
YP_003768966.1, ZP_02165422.1, ZP_00960985.1, ZP_07026655.1, YP_001753039.1,
25 YP_371288.1, YP_002974725.1, YP_776880.1, ZP_05784963.1, ZP_05124380.1,
YP_459030.1, ZP_05090690.1, ZP_05064893.1, ZP_02367982.1, ZP_01890564.1,
NP_541848.1, ZP_00960263.1, ZP_02961617.1, YP_001242097.1, ZP_05838258.1,
insbesondere
Q00593.1, Q9WWW2.1, ZP_00957061.1, YP_957894.1, CAC38030.1, YP_694430.1,
30 YP_957725.1, YP_001672216.1, YP_552061.1, YP_130410.1, ZP_06155535.1,
ZP_01222730.1, YP_691907.1, YP_002297804.1, YP_004283522.1, YP_001234383.1,
YP_004435031.1, ZP_05110316.1, ZP_05042898.1, YP_004466324.1, ZP_08553549.1,

- 119 -

YP_004125220.1, ADI22536.1, ADI18461.1, YP_003810975.1, YP_662346.1,
 YP_004427557.1, YP_692606.1, ZP_05043291.1, YP_440752.1, ZP_02386160.1,
 ZP_04763547.1, ZP_02361232.1, YP_003376674.1, ZP_02354055.1, ZP_05085930.1,
 ADQ00130.1, YP_003643016.1, ZP_05040520.1, YP_691922.1, AAX23098.1, BAD07371.1,
 5 NP_104379.1, YP_002551960.1, YP_003908558.1, YP_987903.1, ZP_05785860.1,
 YP_004145612.1, YP_004140926.1, CAZ88300.1,
 und besonders bevorzugt
 Q00593.1, Q9WWW2.1, ZP_00957061.1, YP_957894.1, CAC38030.1, YP_694430.1,
 YP_957725.1, YP_001672216.1.

10 sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders
 bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste
 gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

15 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
 pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
 20 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
 des Enzyms E_{1d} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-ol zu Dodekan-1-al bzw.
 Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

25

Bestimmte Enzyme E_{1e}

Solche bevorzugten Alkoholdehydrogenasen der EC 1.1.1.1 oder EC 1.1.1.2 sind ausgewählt
 aus AdhE, AdhP, YjgB, YqhD, GldA, EutG, YiaY, AdhE, AdhP, YhhX, YahK, HdhA, HisD, SerA,
 30 Tdh, Ugd, Udg, Gmd, YefA, YbiC, YdfG, YeaU, TtuC, YeiQ, YgbJ, YgcU, YgcT, YgcV, YggP,
 YgjR, Ylil, YqiB, YzzH, LdhA, GapA, Epd, Dld, GatD, Gcd, GlpA, GlpB, GlpC, GlpD, GpsA und
 YphC aus Bakterien, insbesondere *E. coli*

sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
5 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
10 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{1e} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

15

Bestimmte Enzyme E_{1f}

Solche bevorzugten Aldehyddehydrogenasen sind ausgewählt aus Prr, Usg, MhpF, AstD,
20 GdhA, FrmA, Feab, Asd, Sad, PuuE, GabT, YgaW, BetB, PutA, PuuC, FeaB, AldA, Prr, EutA, GabD, AldB, TynA und Ynel aus Bakterien, insbesondere *E. coli*

sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
25 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
30 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der

Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{1f} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

5

Hilfsenzyme zu E_{1a}

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass, wenn die Aktivität eines Enzyms E_{1a} , einer eukaryotischen P450 Alkanhydroxylase vermindert wird, der erfindungsgemäße

10 Mikroorganismus ebenfalls eine im Vergleich zu seinem Wildtyp abgeschwächte Aktivität einer NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase der EC 1.6.2.4 aufweist. Dies hat den technischen Effekt, dass die Aktivität der eukaryotischen P450 Alkanhydroxylasen weiter vermindert und die Produktausbeuten von Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen, Alkanen und terminalen Olefinen erhöht werden.

15 NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen der EC 1.6.2.4 katalysieren die folgende Reaktion:
 $\text{Oxidiertes Cytochrom P450} + \text{NADPH}^+ = \text{Reduziertes Cytochrom P450} + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass, wenn die Aktivität eines Enzyms E_{1a} , einer prokaryotischen P450 Alkanhydroxylase vermindert wird, der erfindungsgemäße

20 Mikroorganismus ebenfalls eine im Vergleich zu seinem Wildtyp abgeschwächte Aktivität einer Ferredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase der EC 1.18.1.2 oder EC 1.18.1.3 und/oder eines Ferredoxins aufweist. Dies hat den technischen Effekt, dass die Aktivität der prokaryotischen P450 Alkanhydroxylase des CYP153-Typs weiter vermindert und die Produktausbeuten von Alkan-1-olen, Alkan-1-alen, Alkan-1-aminen, Alkanen und terminalen Olefinen erhöht werden.

25 Ferredoxin-NAD(P)⁺-Reduktasen der EC 1.18.1.2 oder EC 1.18.1.3 katalysieren die folgende Reaktion:

oxidiertes Ferredoxin + NAD(P)H + H⁺ = reduziertes Ferredoxin + NAD(P)⁺ und werden bevorzugt kodiert durch ein Gen, welches sich in unmittelbarer Nähe eines Genes einer vorgenannten prokaryotischen P450 Alkanhydroxylase des CYP153-Typs oder eines im

30 Zusammenhang mit dieser Erfindung beschriebenen Ferredoxins befindet.

Der Begriff „in unmittelbarer Nähe“ bedeutet, dass zwischen den betrachteten Genen maximal drei andere Strukturgene lokalisiert sind.

- 122 -

Ferredoxine katalysieren die folgenden Reaktionen:

Alkanhydroxylase + reduziertes Ferredoxin + Alkansäure(ester) = Alkanmonooxygenase +
oxidiertes Ferredoxin + ω -Hydroxy-Alkansäure(ester) + H₂O,

Alkanhydroxylase + 2 reduzierte Ferredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanhydroxylase + 2

5 oxidierte Ferredoxine + ω -Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H₂O oder

Alkanhydroxylase + 3 reduzierte Ferredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanhydroxylase + 3
oxidierte Ferredoxine + ω -Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H₂O und

werden bevorzugt kodiert durch ein Gen, welches sich in unmittelbarer Nähe eines Genes einer
vorgenannten prokaryotischen P450 Alkanhydroxylase des CYP153-Typs oder einer

10 vorgenannten Ferredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase der EC 1.18.1.2 oder EC 1.18.1.3 befindet. Der
Begriff „in unmittelbarer Nähe“ bedeutet, dass zwischen den betrachteten Genen maximal drei
andere Strukturgene lokalisiert sind.

Bevorzugte Mikroorganismen weisen eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp gesteigerte Aktivität
der Ferredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase AlkT und eines Ferredoxins auf.

15

Hilfsenzyme zu E_{1b}

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass , wenn die Aktivität eines Enzyms E_{1b}, einer AlkB

20 Alkanhydroxylase der EC 1.14.15.3 vermindert wird, der erfindungsgemäße Mikroorganismus
ebenfalls eine im Vergleich zu seinem Wildtyp gesteigerte Aktivität einer AlkT Rubredoxin-
NAD(P)⁺-Reduktase der EC 1.18.1.1 oder der EC 1.18.1.4 und/oder eines Rubredoxins AlkG
aufweist. Dies hat den technischen Effekt, dass die Aktivität der AlkB Alkanhydroxylase
gesteigert und die Produktausbeuten erhöht werden.

25 AlkT Rubredoxin-NAD(P)⁺-Reduktasen der EC 1.18.1.1 oder EC 1.18.1.4, katalysieren die
folgende Reaktion:

oxidiertes Rubredoxin + NAD(P)H + H⁺ = reduziertes Rubredoxin + NAD(P)⁺ und werden

bevorzugt kodiert durch ein Gen, welches sich in unmittelbarer Nähe eines Genes einer
vorgenannten AlkB Alkanhydroxylase der EC 1.14.15.3 oder eines im Zusammenhang mit

30 dieser Erfindung beschriebenen Rubredoxins AlkG befindet.

Der Begriff „in unmittelbarer Nähe“ bedeutet, dass zwischen den betrachteten Genen maximal
drei andere Strukturgene lokalisiert sind.

Rubredoxine AlkG katalysieren die folgenden Reaktionen:

Alkanmonooxygenase + reduziertes Rubredoxin + Alkansäure(ester) = Alkanmonooxygenase + oxidiertes Rubredoxin + ω -Hydroxy-Alkansäure(ester) + H₂O, Alkanmonooxygenase + 2 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanmonooxygenase + 2 oxidierte Rubredoxine + ω -Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H₂O oder

Alkanmonooxygenase + 3 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanmonooxygenase + 3 oxidierte Rubredoxine + ω -Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H₂O und

werden bevorzugt kodiert durch ein Gen, welches sich in unmittelbarer Nähe eines Genes einer vorgenannten AlkB Alkanhydroxylase der EC 1.14.15.3 oder einer vorgenannten AlkT

10 Rubredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase der EC 1.18.1.1 oder EC 1.18.1.4 befindet. Der Begriff „in unmittelbarer Nähe“ bedeutet, dass zwischen den betrachteten Genen maximal drei andere Strukturgene lokalisiert sind.

Bevorzugte Mikroorganismen weisen eine im Vergleich zu ihrem Wildtyp verminderte Aktivität
15 der AlkT Rubredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase und des Rubredoxins AlkG auf.

Bestimmte Ausführungen bevorzugter Mikroorganismen und Enzyme

20 Erfindungsgemäß sind Mikroorganismen besonders bevorzugt ausgewählt aus denen, die eine erste und eine zweite gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung, eine erste, eine zweite und eine fünfte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung, eine erste, eine zweite und eine sechste gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung, eine erste, eine zweite und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
25 eine erste, eine zweite, eine fünfte und eine sechste gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung, eine erste, eine zweite, eine fünfte und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung, eine erste, eine zweite, eine sechste und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
30 eine erste, eine zweite, eine fünfte, eine sechste und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,

- eine erste, eine zweite und eine dritte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine dritte und eine fünfte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine dritte und eine sechste gentechnische Modifikation im Sinne der
5 Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine dritte und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine dritte, eine fünfte und eine sechste gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
10 eine erste, eine zweite, eine dritte, eine fünfte und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine dritte, eine sechste und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine dritte, eine fünfte, eine sechste und eine siebte gentechnische
15 Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite und eine vierte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine vierte und eine fünfte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine vierte und eine sechste gentechnische Modifikation im Sinne der
20 Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine vierte und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine vierte, eine fünfte und eine sechste gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
25 eine erste, eine zweite, eine vierte, eine fünfte und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung,
eine erste, eine zweite, eine vierte, eine sechste und eine siebte gentechnische Modifikation im Sinne der Erfindung oder
eine erste, eine zweite, eine vierte, eine fünfte, eine sechste und eine siebte gentechnische
30 Modifikation im Sinne der Erfindung
aufweisen.

- 125 -

Erfindungsgemäß sind Mikroorganismen besonders bevorzugt, die eine erste gentechnische Modifikation aufweisen, so dass sie verglichen zu ihrem Wildtyp mehr Carbonsäuren und Carbonsäurederivate aus mindestens einer einfachen Kohlenstoffquelle zu bilden vermögen,

- 5 wobei die erste gentechnische Modifikation eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i oder eines der Enzyme mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 %

Aminosäurereste gegenüber den in der folgenden Tabelle durch Verweise angegebenen

- 10 Sequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der jeweiligen Bezugssequenz besitzen, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP-Thioestes mit der in
- 15 der folgenden Tabelle den einzelnen Enzymen E_i zugeordneten Kohlenstoffkettenlänge verstanden wird,

darstellt

und die Carbonsäure und Carbonsäurederivate eine Kohlenstoffkettenlänge des Carbonsäureteils aufweisen, wie in der folgenden Tabelle dargestellt:

20

Enzym E _i ausgewählt aus	Kohlenstoffkettenlänge
AAC49269.1, CAB60830.1, AAC49179.1, AAC49784.1, ABB71579.1, CAC19934.1 sowie die SEQ ID NR: 26, 29, 33, 38, 40, 97 und 99 der WO2011008565	C8
AAC49269.1, CAB60830.1, AAC49179.1, AAC49784.1, ABB71579.1, CAC19934.1 sowie die SEQ ID NR: 73, 75, 87 und 89 der WO2011008565.	C10
Q41635.1, Q39473.1, AAC49180.1, CAC19934.1, AAC72881.1, AAC49783.1, AAC49784.1 sowie die SEQ ID NR: 49 und	C12

- 126 -

51 der WO2011008565.	
Q41635.1, Q39473.1, AAC49180.1, CAC19934.1, AAC72881.1 AAC49783.1, AAC49784.1 sowie die SEQ ID NR: 49, 51, 53, 55, 61, 63, 67, 69, 77, 79, 83 und 85 der WO2011008565.	C14

Die oben erwähnten Deletionen von Aminosäurereste gegenüber den in der obigen Tabelle durch Verweise angegebenen Sequenzen beziehen sich insbesondere auf Deletionen am N- und/oder C-Terminus, insbesondere am N-Terminus. Besonders bevorzugt handelt es sich bei

5 vorgenanntem N-Terminus um den einer pflanzlichen Plastiden-Targeting-Sequenz. Solche pflanzlichen Plastiden-Targeting -Sequenzen lassen sich zum Beispiel mit Hilfe der durch das Vorhersage-Tool TargetP 1.1 (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) benutzten und in den folgenden Veröffentlichungen beschriebenen Algorithmen, bevorzugt ohne Verwendung von cutoffs, vorhersagen:

- 10 *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.* Olof Emanuelsson, Henrik Nielsen, Søren Brunak and Gunnar von Heijne. J. Mol. Biol., 300: 1005-1016, 2000 und *Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.* Henrik Nielsen, Jacob Engelbrecht, Søren Brunak and Gunnar von Heijne. Protein Engineering, 10:1-6, 1997.

15

Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugte Mikroorganismen (abgekürzt MO) sind hervorragend geeignet für die Produktion von Carbonsäuren und weisen in der folgenden Tabelle beschriebene erhöhte bzw. erniedrigte Enzymaktivitäten (abgekürzt E) auf, wobei diese

20 zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Synthase III (EC 2.3.1.41), insbesondere jene aus Pflanzen, bevorzugt jene aus Pflanzen, deren Samen Fettsäuren mit Alkylresten kürzer als 14 C-Atome enthalten, und besonders bevorzugt jene aus Pflanzen der Gattungen *Cuphea*, *Elaeis*, *Cocos*, *Umbellularia*

25 und *Cinnamomum* sowie Genprodukte ausgewählt aus AccA, AccB, AccC, AccD, AceE, AceF,

- 127 -

Lpd, AcpP, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, PanD, PanK, UdhA, PntA oder PntB.

Es können beliebige Kombinationen von mindestens zwei dieser Enzymaktivitäten vorteilhaft erhöht werden.

- 5 Zusätzlich vorteilhaft kann es des weiteren sein, wenn der Mikroorganismus mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erniedrigten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die Genprodukte ausgewählt aus TdcE, PflA, PflB, PflC, PflD, PoxB, YgfG, AckA, AckB, TdcD, Pta, LdhA, AdhE, MgsA, FdnG, FdnH, FdnI, FdhF, FdoG, FdoH, FdoI, PrpC, PrpD, PrpF, PrpB, TdcD, Pdc, PorA, PorB, PorC, PorD, AlsS, IlvB, IlvM, IlvN, IlvG, IlvI, IlvH, AlsD, ButB, Thl, ThIA, ThIB, PhaA, PhaB, Crt, BdhA, BdhB, Adc, Adh, CtfB, AtoA, AtoD, LdhL, GltA, FabR, FhuA, Dld, LldA oder LldP, einzeln oder in beliebiger Kombination, ausgestattet ist.
- 10

- 128 -

MO	E erhöht	E erniedrigt
1	AlkL	
2	AlkLE _i	
3	AlkLE _{ii}	
4	AlkLE _{ii} E _{iib}	
5	AlkLE _{iii}	
6	AlkLE _{iv}	
7	AlkL	E _a
8	AlkLE _i	E _a
9	AlkLE _{ii}	E _a
10	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _a
11	AlkLE _{iii}	E _a
12	AlkLE _{iv}	E _a
13	AlkL	E _b
14	AlkLE _i	E _b
15	AlkLE _{ii}	E _b
16	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _b
17	AlkLE _{iii}	E _b
18	AlkLE _{iv}	E _b
19	AlkL	E _d
20	AlkLE _i	E _d
21	AlkLE _{ii}	E _d
22	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _d
23	AlkLE _{iii}	E _d
24	AlkLE _{iv}	E _d
25	AlkL	E _e
26	AlkLE _i	E _e
27	AlkLE _{ii}	E _e
28	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _e
29	AlkLE _{iii}	E _e
30	AlkLE _{iv}	E _e
31	AlkL	E _f
32	AlkLE _i	E _f
33	AlkLE _{ii}	E _f
34	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _f
35	AlkLE _{iii}	E _f
36	AlkLE _{iv}	E _f
37	AlkL	E ₁
38	AlkLE _i	E ₁
39	AlkLE _{ii}	E ₁

40	AlkLE _{ii} E _{iib}	E ₁
41	AlkLE _{iii}	E ₁
42	AlkLE _{iv}	E ₁
43	AlkL	E _a E ₁
44	AlkLE _i	E _a E ₁
45	AlkLE _{ii}	E _a E ₁
46	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _a E ₁
47	AlkLE _{iii}	E _a E ₁
48	AlkLE _{iv}	E _a E ₁
49	AlkL	E _b E ₁
50	AlkLE _i	E _b E ₁
51	AlkLE _{ii}	E _b E ₁
52	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _b E ₁
53	AlkLE _{iii}	E _b E ₁
54	AlkLE _{iv}	E _b E ₁
55	AlkL	E _d E ₁
56	AlkLE _i	E _d E ₁
57	AlkLE _{ii}	E _d E ₁
58	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _d E ₁
59	AlkLE _{iii}	E _d E ₁
60	AlkLE _{iv}	E _d E ₁
61	AlkL	E _e E ₁
62	AlkLE _i	E _e E ₁
63	AlkLE _{ii}	E _e E ₁
64	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _e E ₁
65	AlkLE _{iii}	E _e E ₁
66	AlkLE _{iv}	E _e E ₁
67	AlkL	E _f E ₁
68	AlkLE _i	E _f E ₁
69	AlkLE _{ii}	E _f E ₁
70	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _f E ₁
71	AlkLE _{iii}	E _f E ₁
72	AlkLE _{iv}	E _f E ₁

Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugte Mikroorganismen (abgekürzt MO) sind hervorragend geeignet für die Produktion von Carbonsäure-Estern und weisen in der folgenden

5 Tabelle beschriebene erhöhte bzw. erniedrigte Enzymaktivitäten (abgekürzt E) auf, wobei diese zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Synthase III (EC 2.3.1.41), insbesondere jene aus Pflanzen, bevorzugt jene aus Pflanzen, deren Samen Fettsäuren mit Alkylresten kürzer als 14 C-Atome enthalten, und

10 besonders bevorzugt jene aus Pflanzen der Gattungen *Cuphea*, *Elaeis*, *Cocos*, *Umbellularia* und *Cinnamomum* sowie Genprodukte ausgewählt aus AccA, AccB, AccC, AccD, AceE, AceF, Lpd, AcpP, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, PanD, PanK, UdhA, PntA oder PntB.

Es können beliebige Kombinationen von mindestens zwei dieser Enzymaktivitäten vorteilhaft

15 erhöht werden.

Zusätzlich vorteilhaft kann es des weiteren sein, wenn der Mikroorganismus mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erniedrigten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die Genprodukte ausgewählt aus TdcE, PflA, PflB, PflC, PflD, PoxB, YgfG, AckA, AckB, TdcD, Pta, LdhA, AdhE, MgsA, FdnG, FdnH, FdnI, FdhF, FdoG, FdoH, FdoI, PrpC, PrpD, PrpF, PrpB, TdcD, Pdc, PorA, PorB, PorC, PorD, AlsS, IlvB, IlvM, IlvN, IlvG, IlvI, IlvH, AlsD, ButB, Thl, ThIA, ThIB, PhaA, PhaB, Crt, BdhA, BdhB, Adc, Adh, CtfB, AtoA, AtoD, LdhL, GltA, FabR, FhuA, Dld, LldA oder LldP, einzeln oder in beliebiger Kombination, ausgestattet ist.

20

MO	E erhöht	E erniedrigt
1	AlkL E _v	
2	AlkLE _i E _v	
3	AlkLE _{ii} E _v	
4	AlkLE _{ii} E _{iib} E _v	
5	AlkLE _{iii} E _v	
6	AlkLE _{iv} E _v	
7	AlkL E _v	E _a
8	AlkLE _i E _v	E _a
9	AlkLE _{ii} E _v	E _a
10	AlkLE _{ii} E _{iib} E _v	E _a
11	AlkLE _{iii} E _v	E _a
12	AlkLE _{iv} E _v	E _a
13	AlkL E _v	E _b

14	AlkLE _i E _v	E _b
15	AlkLE _{ii} E _v	E _b
16	AlkLE _{ii} E _{iib} E _v	E _b
17	AlkLE _{iii} E _v	E _b
18	AlkLE _{iv} E _v	E _b
19	AlkL E _v	E _d
20	AlkLE _i E _v	E _d
21	AlkLE _{ii} E _v	E _d
22	AlkLE _{ii} E _{iib} E _v	E _d
23	AlkLE _{iii} E _v	E _d
24	AlkLE _{iv} E _v	E _d
25	AlkL E _v	E _e
26	AlkLE _i E _v	E _e
27	AlkLE _{ii} E _v	E _e

- 130 -

28	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v	E _e
29	AlkLE _{iii}	E _v	E _e
30	AlkLE _{iv}	E _v	E _e
31	AlkL	E _v	E _f
32	AlkLE _i	E _v	E _f
33	AlkLE _{ii}	E _v	E _f
34	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v	E _f
35	AlkLE _{iii}	E _v	E _f
36	AlkLE _{iv}	E _v	E _f
37	AlkL	E _v E _{vi}	
38	AlkLE _i	E _v E _{vi}	
39	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	
40	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v E _{vi}	
41	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	
42	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	
43	AlkL	E _v E _{vi}	E _a
44	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _a
45	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _a
46	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _a
47	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _a
48	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _a
49	AlkL	E _v E _{vi}	E _b
50	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _b
51	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _b
52	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _b
53	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _b
54	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _b
55	AlkL	E _v E _{vi}	E _d
56	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _d
57	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _d
58	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _d
59	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _d
60	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _d
61	AlkL	E _v E _{vi}	E _e
62	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _e
63	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _e
64	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _e
65	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _e
66	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _e
67	AlkL	E _v E _{vi}	E _f
68	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _f
69	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _f
70	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _f

71	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _f
72	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _f
73	AlkL	E _{vii}	
74	AlkLE _i	E _{vii}	
75	AlkLE _{ii}	E _{vii}	
76	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	
77	AlkLE _{iii}	E _{vii}	
78	AlkLE _{iv}	E _{vii}	
79	AlkL	E _{vii}	E _a
80	AlkLE _i	E _{vii}	E _a
81	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _a
82	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	E _a
83	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _a
84	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _a
85	AlkL	E _{vii}	E _b
86	AlkLE _i	E _{vii}	E _b
87	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _b
88	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	E _b
89	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _b
90	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _b
91	AlkL	E _{vii}	E _d
92	AlkLE _i	E _{vii}	E _d
93	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _d
94	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	E _d
95	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _d
96	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _d
97	AlkL	E _{vii}	E _e
98	AlkLE _i	E _{vii}	E _e
99	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _e
100	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	E _e
101	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _e
102	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _e
103	AlkL	E _{vii}	E _f
104	AlkLE _i	E _{vii}	E _f
105	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _f
106	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	E _f
107	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _f
108	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _f
109	AlkL	E _{vi} E _{vii}	
110	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	
111	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	
112	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	
113	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	

- 131 -

114	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	
115	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _a
116	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _a
117	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _a
118	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _a
119	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _a
120	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _a
121	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _b
122	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _b
123	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _b
124	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _b
125	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _b
126	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _b
127	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _d
128	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _d
129	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _d
130	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _d
131	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _d
132	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _d
133	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _e
134	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _e
135	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _e
136	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _e
137	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _e
138	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _e
139	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _f
140	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _f
141	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _f
142	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _f
143	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _f
144	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _f
145	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	
146	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	
147	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	
148	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	
149	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	
150	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	
151	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a
152	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a
153	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a
154	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a
155	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a
156	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a

157	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b
158	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b
159	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b
160	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b
161	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b
162	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b
163	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d
164	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d
165	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d
166	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d
167	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d
168	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d
169	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e
170	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e
171	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e
172	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e
173	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e
174	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e
175	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f
176	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f
177	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f
178	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f
179	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f
180	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f
181	AlkL	E _v	E ₁
182	AlkLE _i	E _v	E ₁
183	AlkLE _{ii}	E _v	E ₁
184	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v	E ₁
185	AlkLE _{iii}	E _v	E ₁
186	AlkLE _{iv}	E _v	E ₁
187	AlkL	E _v	E _a E ₁
188	AlkLE _i	E _v	E _a E ₁
189	AlkLE _{ii}	E _v	E _a E ₁
190	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v	E _a E ₁
191	AlkLE _{iii}	E _v	E _a E ₁
192	AlkLE _{iv}	E _v	E _a E ₁
193	AlkL	E _v	E _b E ₁
194	AlkLE _i	E _v	E _b E ₁
195	AlkLE _{ii}	E _v	E _b E ₁
196	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v	E _b E ₁
197	AlkLE _{iii}	E _v	E _b E ₁
198	AlkLE _{iv}	E _v	E _b E ₁
199	AlkL	E _v	E _d E ₁

- 132 -

200	AlkLE _i	E _v	E _d	E ₁
201	AlkLE _{ii}	E _v	E _d	E ₁
202	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v	E _d	E ₁
203	AlkLE _{iii}	E _v	E _d	E ₁
204	AlkLE _{iv}	E _v	E _d	E ₁
205	AlkL	E _v	E _e	E ₁
206	AlkLE _i	E _v	E _e	E ₁
207	AlkLE _{ii}	E _v	E _e	E ₁
208	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v	E _e	E ₁
209	AlkLE _{iii}	E _v	E _e	E ₁
210	AlkLE _{iv}	E _v	E _e	E ₁
211	AlkL	E _v	E _f	E ₁
212	AlkLE _i	E _v	E _f	E ₁
213	AlkLE _{ii}	E _v	E _f	E ₁
214	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v	E _f	E ₁
215	AlkLE _{iii}	E _v	E _f	E ₁
216	AlkLE _{iv}	E _v	E _f	E ₁
217	AlkL	E _v E _{vi}		E ₁
218	AlkLE _i	E _v E _{vi}		E ₁
219	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}		E ₁
220	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v E _{vi}		E ₁
221	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}		E ₁
222	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}		E ₁
223	AlkL	E _v E _{vi}	E _a	E ₁
224	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _a	E ₁
225	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _a	E ₁
226	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _a	E ₁
227	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _a	E ₁
228	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _a	E ₁
229	AlkL	E _v E _{vi}	E _b	E ₁
230	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _b	E ₁
231	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _b	E ₁
232	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _b	E ₁
233	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _b	E ₁
234	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _b	E ₁
235	AlkL	E _v E _{vi}	E _d	E ₁
236	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _d	E ₁
237	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _d	E ₁
238	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _d	E ₁
239	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _d	E ₁
240	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _d	E ₁
241	AlkL	E _v E _{vi}	E _e	E ₁
242	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _e	E ₁

243	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _e	E ₁
244	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _e	E ₁
245	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _e	E ₁
246	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _e	E ₁
247	AlkL	E _v E _{vi}	E _f	E ₁
248	AlkLE _i	E _v E _{vi}	E _f	E ₁
249	AlkLE _{ii}	E _v E _{vi}	E _f	E ₁
250	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _v E _{vi}	E _f	E ₁
251	AlkLE _{iii}	E _v E _{vi}	E _f	E ₁
252	AlkLE _{iv}	E _v E _{vi}	E _f	E ₁
253	AlkL	E _{vii}		E ₁
254	AlkLE _i	E _{vii}		E ₁
255	AlkLE _{ii}	E _{vii}		E ₁
256	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vii}		E ₁
257	AlkLE _{iii}	E _{vii}		E ₁
258	AlkLE _{iv}	E _{vii}		E ₁
259	AlkL	E _{vii}	E _a	E ₁
260	AlkLE _i	E _{vii}	E _a	E ₁
261	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _a	E ₁
262	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vii}	E _a	E ₁
263	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _a	E ₁
264	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _a	E ₁
265	AlkL	E _{vii}	E _b	E ₁
266	AlkLE _i	E _{vii}	E _b	E ₁
267	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _b	E ₁
268	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vii}	E _b	E ₁
269	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _b	E ₁
270	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _b	E ₁
271	AlkL	E _{vii}	E _d	E ₁
272	AlkLE _i	E _{vii}	E _d	E ₁
273	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _d	E ₁
274	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vii}	E _d	E ₁
275	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _d	E ₁
276	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _d	E ₁
277	AlkL	E _{vii}	E _e	E ₁
278	AlkLE _i	E _{vii}	E _e	E ₁
279	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _e	E ₁
280	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vii}	E _e	E ₁
281	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _e	E ₁
282	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _e	E ₁
283	AlkL	E _{vii}	E _f	E ₁
284	AlkLE _i	E _{vii}	E _f	E ₁
285	AlkLE _{ii}	E _{vii}	E _f	E ₁

- 133 -

286	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vii}	E _f	E ₁
287	AlkLE _{iii}	E _{vii}	E _f	E ₁
288	AlkLE _{iv}	E _{vii}	E _f	E ₁
289	AlkL	E _{vi} E _{vii}		E ₁
290	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}		E ₁
291	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}		E ₁
292	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}		E ₁
293	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}		E ₁
294	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}		E ₁
295	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
296	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
297	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
298	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
299	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
300	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
301	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
302	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
303	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
304	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
305	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
306	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
307	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
308	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
309	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
310	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
311	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
312	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
313	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
314	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
315	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
316	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
317	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
318	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
319	AlkL	E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
320	AlkLE _i	E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
321	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
322	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
323	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
324	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁

325	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}		E ₁
326	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}		E ₁
327	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}		E ₁
328	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}		E ₁
329	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}		E ₁
330	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}		E ₁
331	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
332	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
333	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
334	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
335	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
336	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _a	E ₁
337	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
338	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
339	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
340	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
341	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
342	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _b	E ₁
343	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
344	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
345	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
346	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
347	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
348	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _d	E ₁
349	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
350	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
351	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
352	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
353	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
354	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _e	E ₁
355	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
356	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
357	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
358	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
359	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁
360	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _{vii}	E _f	E ₁

Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugte Mikroorganismen (abgekürzt MO) sind hervorragend geeignet für die Produktion von Alkan-1-olen und Alkan-1-alen und weisen in der folgenden Tabelle beschriebene erhöhte bzw. erniedrigte Enzymaktivitäten (abgekürzt E) auf, wobei diese zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Synthase III (EC 2.3.1.41), insbesondere jene aus Pflanzen, bevorzugt jene aus Pflanzen, deren Samen Fettsäuren mit Alkylresten kürzer als 14 C-Atome enthalten, und besonders bevorzugt jene aus Pflanzen der Gattungen *Cuphea*, *Elaeis*, *Cocos*, *Umbellularia* und *Cinnamomum* sowie Genprodukte ausgewählt aus AccA, AccB, AccC, AccD, AceE, AceF, Lpd, AcpP, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, PanD, PanK, UdhA, PntA oder PntB.

Es können beliebige Kombinationen von mindestens zwei dieser Enzymaktivitäten vorteilhaft erhöht werden.

Zusätzlich vorteilhaft kann es des weiteren sein, wenn der Mikroorganismus mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erniedrigten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die Genprodukte ausgewählt aus TdcE, PflA, PflB, PflC, PflD, PoxB, YgfG, AckA, AckB, TdcD, Pta, LdhA, AdhE, MgsA, FdnG, FdnH, FdnI, FdhF, FdoG, FdoH, FdoI, PrpC, PrpD, PrpF, PrpB, TdcD, Pdc, PorA, PorB, PorC, PorD, AlsS, IlvB, IlvM, IlvN, IlvG, IlvI, IlvH, AlsD, ButB, ThI, ThIA, ThIB, PhaA, PhaB, Crt, BdhA, BdhB, Adc, Adh, CtfB, AtoA, AtoD, LdhL, GltA, FabR, FhuA, Dld, LldA oder LldP, einzeln oder in beliebiger Kombination, ausgestattet ist.

MO	E erhöht	E erniedrigt
1	AlkL E _{viii}	
2	AlkLE _i E _{viii}	
3	AlkLE _{ii} E _{viii}	
4	AlkLE _{ii} E _{iiib} E _{viii}	
5	AlkLE _{iii} E _{viii}	
6	AlkLE _{iv} E _{viii}	
7	AlkL E _{viii}	E _a
8	AlkLE _i E _{viii}	E _a
9	AlkLE _{ii} E _{viii}	E _a
10	AlkLE _{ii} E _{iiib} E _{viii}	E _a
11	AlkLE _{iii} E _{viii}	E _a
12	AlkLE _{iv} E _{viii}	E _a
13	AlkL E _{viii}	E _b
14	AlkLE _i E _{viii}	E _b

15	AlkLE _{ii} E _{viii}	E _b
16	AlkLE _{ii} E _{iiib} E _{viii}	E _b
17	AlkLE _{iii} E _{viii}	E _b
18	AlkLE _{iv} E _{viii}	E _b
19	AlkL E _{viii}	E _d
20	AlkLE _i E _{viii}	E _d
21	AlkLE _{ii} E _{viii}	E _d
22	AlkLE _{ii} E _{iiib} E _{viii}	E _d
23	AlkLE _{iii} E _{viii}	E _d
24	AlkLE _{iv} E _{viii}	E _d
25	AlkL E _{viii}	E _e
26	AlkLE _i E _{viii}	E _e
27	AlkLE _{ii} E _{viii}	E _e
28	AlkLE _{ii} E _{iiib} E _{viii}	E _e
29	AlkLE _{iii} E _{viii}	E _e

- 135 -

30	AlkLE _{iv}	E _{viii}	E _e
31	AlkL	E _{viii}	E _f
32	AlkLE _i	E _{viii}	E _f
33	AlkLE _{ii}	E _{viii}	E _f
34	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _f
35	AlkLE _{iii}	E _{viii}	E _f
36	AlkLE _{iv}	E _{viii}	E _f
37	AlkL	E _{ix}	
38	AlkLE _i	E _{ix}	
39	AlkLE _{ii}	E _{ix}	
40	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{ix}	
41	AlkLE _{iii}	E _{ix}	
42	AlkLE _{iv}	E _{ix}	
43	AlkL	E _{ix}	E _a
44	AlkLE _i	E _{ix}	E _a
45	AlkLE _{ii}	E _{ix}	E _a
46	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _a
47	AlkLE _{iii}	E _{ix}	E _a
48	AlkLE _{iv}	E _{ix}	E _a
49	AlkL	E _{ix}	E _b
50	AlkLE _i	E _{ix}	E _b
51	AlkLE _{ii}	E _{ix}	E _b
52	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _b
53	AlkLE _{iii}	E _{ix}	E _b
54	AlkLE _{iv}	E _{ix}	E _b
55	AlkL	E _{ix}	E _d
56	AlkLE _i	E _{ix}	E _d
57	AlkLE _{ii}	E _{ix}	E _d
58	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _d
59	AlkLE _{iii}	E _{ix}	E _d
60	AlkLE _{iv}	E _{ix}	E _d
61	AlkL	E _{ix}	E _e
62	AlkLE _i	E _{ix}	E _e
63	AlkLE _{ii}	E _{ix}	E _e
64	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _e
65	AlkLE _{iii}	E _{ix}	E _e
66	AlkLE _{iv}	E _{ix}	E _e
67	AlkL	E _{ix}	E _f
68	AlkLE _i	E _{ix}	E _f
69	AlkLE _{ii}	E _{ix}	E _f
70	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _f
71	AlkLE _{iii}	E _{ix}	E _f
72	AlkLE _{iv}	E _{ix}	E _f

73	AlkL	E _x	
74	AlkLE _i	E _x	
75	AlkLE _{ii}	E _x	
76	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _x	
77	AlkLE _{iii}	E _x	
78	AlkLE _{iv}	E _x	
79	AlkL	E _x	E _a
80	AlkLE _i	E _x	E _a
81	AlkLE _{ii}	E _x	E _a
82	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _x	E _a
83	AlkLE _{iii}	E _x	E _a
84	AlkLE _{iv}	E _x	E _a
85	AlkL	E _x	E _b
86	AlkLE _i	E _x	E _b
87	AlkLE _{ii}	E _x	E _b
88	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _x	E _b
89	AlkLE _{iii}	E _x	E _b
90	AlkLE _{iv}	E _x	E _b
91	AlkL	E _x	E _d
92	AlkLE _i	E _x	E _d
93	AlkLE _{ii}	E _x	E _d
94	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _x	E _d
95	AlkLE _{iii}	E _x	E _d
96	AlkLE _{iv}	E _x	E _d
97	AlkL	E _x	E _e
98	AlkLE _i	E _x	E _e
99	AlkLE _{ii}	E _x	E _e
100	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _x	E _e
101	AlkLE _{iii}	E _x	E _e
102	AlkLE _{iv}	E _x	E _e
103	AlkL	E _x	E _f
104	AlkLE _i	E _x	E _f
105	AlkLE _{ii}	E _x	E _f
106	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _x	E _f
107	AlkLE _{iii}	E _x	E _f
108	AlkLE _{iv}	E _x	E _f
109	AlkL	E _{vi} E _{viii}	
110	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	
111	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	
112	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	
113	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	
114	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	
115	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _a

- 136 -

116	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _a
117	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _a
118	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _a
119	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _a
120	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _a
121	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _b
122	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _b
123	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _b
124	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _b
125	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _b
126	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _b
127	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _d
128	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _d
129	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _d
130	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _d
131	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _d
132	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _d
133	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _e
134	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _e
135	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _e
136	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _e
137	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _e
138	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _e
139	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _f
140	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _f
141	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _f
142	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _f
143	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _f
144	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _f
145	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	
146	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	
147	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	
148	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	
149	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	
150	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	
151	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a
152	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a
153	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a
154	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a
155	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a
156	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a
157	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
158	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b

159	AlkLE _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
160	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
161	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
162	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
163	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
164	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
165	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
166	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
167	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
168	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
169	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
170	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
171	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
172	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
173	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
174	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
175	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
176	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
177	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
178	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
179	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
180	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
181	AlkL	E _{viii}	E ₁
182	AlkLE _i	E _{viii}	E ₁
183	AlkLE _{ii}	E _{viii}	E ₁
184	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E ₁
185	AlkLE _{iii}	E _{viii}	E ₁
186	AlkLE _{iv}	E _{viii}	E ₁
187	AlkL	E _{viii}	E _a E ₁
188	AlkLE _i	E _{viii}	E _a E ₁
189	AlkLE _{ii}	E _{viii}	E _a E ₁
190	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _a E ₁
191	AlkLE _{iii}	E _{viii}	E _a E ₁
192	AlkLE _{iv}	E _{viii}	E _a E ₁
193	AlkL	E _{viii}	E _b E ₁
194	AlkLE _i	E _{viii}	E _b E ₁
195	AlkLE _{ii}	E _{viii}	E _b E ₁
196	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _b E ₁
197	AlkLE _{iii}	E _{viii}	E _b E ₁
198	AlkLE _{iv}	E _{viii}	E _b E ₁
199	AlkL	E _{viii}	E _d E ₁
200	AlkLE _i	E _{viii}	E _d E ₁
201	AlkLE _{ii}	E _{viii}	E _d E ₁

- 137 -

202	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _d	E ₁
203	AikLE _{iii}	E _{viii}	E _d	E ₁
204	AikLE _{iv}	E _{viii}	E _d	E ₁
205	AikL	E _{viii}	E _e	E ₁
206	AikLE _i	E _{viii}	E _e	E ₁
207	AikLE _{ii}	E _{viii}	E _e	E ₁
208	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _e	E ₁
209	AikLE _{iii}	E _{viii}	E _e	E ₁
210	AikLE _{iv}	E _{viii}	E _e	E ₁
211	AikL	E _{viii}	E _f	E ₁
212	AikLE _i	E _{viii}	E _f	E ₁
213	AikLE _{ii}	E _{viii}	E _f	E ₁
214	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _f	E ₁
215	AikLE _{iii}	E _{viii}	E _f	E ₁
216	AikLE _{iv}	E _{viii}	E _f	E ₁
217	AikL	E _{ix}		E ₁
218	AikLE _i	E _{ix}		E ₁
219	AikLE _{ii}	E _{ix}		E ₁
220	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{ix}		E ₁
221	AikLE _{iii}	E _{ix}		E ₁
222	AikLE _{iv}	E _{ix}		E ₁
223	AikL	E _{ix}	E _a	E ₁
224	AikLE _i	E _{ix}	E _a	E ₁
225	AikLE _{ii}	E _{ix}	E _a	E ₁
226	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{ix}	E _a	E ₁
227	AikLE _{iii}	E _{ix}	E _a	E ₁
228	AikLE _{iv}	E _{ix}	E _a	E ₁
229	AikL	E _{ix}	E _b	E ₁
230	AikLE _i	E _{ix}	E _b	E ₁
231	AikLE _{ii}	E _{ix}	E _b	E ₁
232	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{ix}	E _b	E ₁
233	AikLE _{iii}	E _{ix}	E _b	E ₁
234	AikLE _{iv}	E _{ix}	E _b	E ₁
235	AikL	E _{ix}	E _d	E ₁
236	AikLE _i	E _{ix}	E _d	E ₁
237	AikLE _{ii}	E _{ix}	E _d	E ₁
238	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{ix}	E _d	E ₁
239	AikLE _{iii}	E _{ix}	E _d	E ₁
240	AikLE _{iv}	E _{ix}	E _d	E ₁
241	AikL	E _{ix}	E _e	E ₁
242	AikLE _i	E _{ix}	E _e	E ₁
243	AikLE _{ii}	E _{ix}	E _e	E ₁
244	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{ix}	E _e	E ₁

245	AikLE _{iii}	E _{ix}	E _e	E ₁
246	AikLE _{iv}	E _{ix}	E _e	E ₁
247	AikL	E _{ix}	E _f	E ₁
248	AikLE _i	E _{ix}	E _f	E ₁
249	AikLE _{ii}	E _{ix}	E _f	E ₁
250	AikLE _{ij} E _{iib}	E _{ix}	E _f	E ₁
251	AikLE _{iii}	E _{ix}	E _f	E ₁
252	AikLE _{iv}	E _{ix}	E _f	E ₁
253	AikL	E _x		E ₁
254	AikLE _i	E _x		E ₁
255	AikLE _{ii}	E _x		E ₁
256	AikLE _{ij} E _{iib}	E _x		E ₁
257	AikLE _{iii}	E _x		E ₁
258	AikLE _{iv}	E _x		E ₁
259	AikL	E _x	E _a	E ₁
260	AikLE _i	E _x	E _a	E ₁
261	AikLE _{ii}	E _x	E _a	E ₁
262	AikLE _{ij} E _{iib}	E _x	E _a	E ₁
263	AikLE _{iii}	E _x	E _a	E ₁
264	AikLE _{iv}	E _x	E _a	E ₁
265	AikL	E _x	E _b	E ₁
266	AikLE _i	E _x	E _b	E ₁
267	AikLE _{ii}	E _x	E _b	E ₁
268	AikLE _{ij} E _{iib}	E _x	E _b	E ₁
269	AikLE _{iii}	E _x	E _b	E ₁
270	AikLE _{iv}	E _x	E _b	E ₁
271	AikL	E _x	E _d	E ₁
272	AikLE _i	E _x	E _d	E ₁
273	AikLE _{ii}	E _x	E _d	E ₁
274	AikLE _{ij} E _{iib}	E _x	E _d	E ₁
275	AikLE _{iii}	E _x	E _d	E ₁
276	AikLE _{iv}	E _x	E _d	E ₁
277	AikL	E _x	E _e	E ₁
278	AikLE _i	E _x	E _e	E ₁
279	AikLE _{ii}	E _x	E _e	E ₁
280	AikLE _{ij} E _{iib}	E _x	E _e	E ₁
281	AikLE _{iii}	E _x	E _e	E ₁
282	AikLE _{iv}	E _x	E _e	E ₁
283	AikL	E _x	E _f	E ₁
284	AikLE _i	E _x	E _f	E ₁
285	AikLE _{ii}	E _x	E _f	E ₁
286	AikLE _{ij} E _{iib}	E _x	E _f	E ₁
287	AikLE _{iii}	E _x	E _f	E ₁

- 138 -

288	AlkLE _{iv}	E _x	E _f	E ₁
289	AlkL	E _{vi} E _{viii}		E ₁
290	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}		E ₁
291	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}		E ₁
292	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}		E ₁
293	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}		E ₁
294	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}		E ₁
295	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _a	E ₁
296	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _a	E ₁
297	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _a	E ₁
298	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _a	E ₁
299	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _a	E ₁
300	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _a	E ₁
301	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _b	E ₁
302	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _b	E ₁
303	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _b	E ₁
304	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _b	E ₁
305	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _b	E ₁
306	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _b	E ₁
307	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
308	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
309	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
310	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
311	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
312	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
313	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
314	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
315	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
316	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
317	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
318	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
319	AlkL	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
320	AlkLE _i	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
321	AlkLE _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
322	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
323	AlkLE _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
324	AlkLE _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
325	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁

326	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
327	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
328	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
329	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
330	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
331	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
332	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
333	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
334	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
335	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
336	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
337	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
338	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
339	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
340	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
341	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
342	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
343	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
344	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
345	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
346	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
347	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
348	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
349	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
350	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
351	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
352	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
353	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
354	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
355	AlkL	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
356	AlkLE _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
357	AlkLE _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
358	AlkLE _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
359	AlkLE _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
360	AlkLE _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁

5 Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugte Mikroorganismen (abgekürzt MO) sind hervorragend geeignet für die Produktion von Alkanen und weisen in der folgenden Tabelle

beschriebene erhöhte bzw. erniedrigte Enzymaktivitäten (abgekürzt E) auf, wobei diese zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Synthase III (EC 2.3.1.41), insbesondere jene aus Pflanzen, bevorzugt jene aus Pflanzen, deren Samen Fettsäuren mit Alkylresten kürzer als 14 C-Atome enthalten, und besonders bevorzugt jene aus Pflanzen der Gattungen *Cuphea*, *Elaeis*, *Cocos*, *Umbellularia* und *Cinnamomum* sowie Genprodukte ausgewählt aus AccA, AccB, AccC, AccD, AceE, AceF, Lpd, AcpP, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, PanD, PanK, UdhA, PntA oder PntB.

- 5 Es können beliebige Kombinationen von mindestens zwei dieser Enzymaktivitäten vorteilhaft erhöht werden.

Zusätzlich vorteilhaft kann es des weiteren sein, wenn der Mikroorganismus mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erniedrigten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die Genprodukte ausgewählt aus TdcE, PflA, PflB, PflC, PflD, PoxB, YgfG, AckA, AckB, TdcD, Pta, LdhA, AdhE, MgsA, FdnG, FdnH, FdnI, FdhF, FdoG, FdoH, FdoI, PrpC, PrpD, PrpF, PrpB, TdcD, Pdc, PorA, PorB, PorC, PorD, AlsS, IlvB, IlvM, IlvN, IlvG, IlvI, IlvH, AlsD, ButB, ThI, ThIA, ThIB, PhaA, PhaB, Crt, BdhA, BdhB, Adc, Adh, CtfB, AtoA, AtoD, LdhL, GltA, FabR, FhuA, Dld, LldA oder LldP, einzeln oder in beliebiger Kombination, ausgestattet ist.

20

MO	E erhöht	E erniedrigt
1	AlkLE _{xii} E _{viii}	
2	AlkLE _{xii} E _i E _{viii}	
3	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{viii}	
4	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	
5	AlkLE _{xii} E _{iii} E _{viii}	
6	AlkLE _{xii} E _{iv} E _{viii}	
7	AlkLE _{xii} E _{viii}	E _a
8	AlkLE _{xii} E _i E _{viii}	E _a
9	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{viii}	E _a
10	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _a
11	AlkLE _{xii} E _{iii} E _{viii}	E _a
12	AlkLE _{xii} E _{iv} E _{viii}	E _a
13	AlkLE _{xii} E _{viii}	E _b
14	AlkLE _{xii} E _i E _{viii}	E _b
15	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{viii}	E _b

16	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _b
17	AlkLE _{xii} E _{iii} E _{viii}	E _b
18	AlkLE _{xii} E _{iv} E _{viii}	E _b
19	AlkLE _{xii} E _{viii}	E _d
20	AlkLE _{xii} E _i E _{viii}	E _d
21	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{viii}	E _d
22	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _d
23	AlkLE _{xii} E _{iii} E _{viii}	E _d
24	AlkLE _{xii} E _{iv} E _{viii}	E _d
25	AlkLE _{xii} E _{viii}	E _e
26	AlkLE _{xii} E _i E _{viii}	E _e
27	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{viii}	E _e
28	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _e
29	AlkLE _{xii} E _{iii} E _{viii}	E _e
30	AlkLE _{xii} E _{iv} E _{viii}	E _e
31	AlkLE _{xii} E _{viii}	E _f

- 140 -

32	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E _f
33	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{viii}	E _f
34	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _f
35	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E _f
36	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E _f
37	AikLE _{xii}	E _{ix}	
38	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	
39	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	
40	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	
41	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	
42	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	
43	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _a
44	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _a
45	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _a
46	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _a
47	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _a
48	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _a
49	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _b
50	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _b
51	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _b
52	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _b
53	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _b
54	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _b
55	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _d
56	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _d
57	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _d
58	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _d
59	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _d
60	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _d
61	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _e
62	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _e
63	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _e
64	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _e
65	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _e
66	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _e
67	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _f
68	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _f
69	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _f
70	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _f
71	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _f
72	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _f
73	AikLE _{xii}	E _x	
74	AikLE _{xii} E _i	E _x	

75	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	
76	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	
77	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	
78	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	
79	AikLE _{xii}	E _x	E _a
80	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _a
81	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _a
82	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _a
83	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _a
84	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _a
85	AikLE _{xii}	E _x	E _b
86	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _b
87	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _b
88	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _b
89	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _b
90	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _b
91	AikLE _{xii}	E _x	E _d
92	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _d
93	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _d
94	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _d
95	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _d
96	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _d
97	AikLE _{xii}	E _x	E _e
98	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _e
99	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _e
100	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _e
101	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _e
102	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _e
103	AikLE _{xii}	E _x	E _f
104	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _f
105	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _f
106	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _f
107	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _f
108	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _f
109	AikLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	
110	AikLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	
111	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	
112	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	
113	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	
114	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	
115	AikLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	E _a
116	AikLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _a
117	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _a

161	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
162	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b
163	AikLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
164	AikLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
165	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
166	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
167	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
168	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d
169	AikLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
170	AikLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
171	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
172	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
173	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
174	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e
175	AikLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
176	AikLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
177	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
178	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
179	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
180	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
181	AikLE _{xii}	E _{viii}	E ₁
182	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E ₁
183	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{viii}	E ₁
184	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E ₁
185	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E ₁
186	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E ₁
187	AikLE _{xii}	E _{viii}	E _a E ₁
188	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E _a E ₁
189	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{viii}	E _a E ₁
190	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _a E ₁
191	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E _a E ₁
192	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E _a E ₁
193	AikLE _{xii}	E _{viii}	E _b E ₁
194	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E _b E ₁
195	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{viii}	E _b E ₁
196	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _b E ₁
197	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E _b E ₁
198	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E _b E ₁
199	AikLE _{xii}	E _{viii}	E _d E ₁
200	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E _d E ₁
201	AikLE _{xii} E _{ij}	E _{viii}	E _d E ₁
202	AikLE _{xii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _d E ₁
203	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E _d E ₁

- 142 -

204	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E _d	E ₁
205	AikLE _{xii}	E _{viii}	E _e	E ₁
206	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E _e	E ₁
207	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{viii}	E _e	E ₁
208	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _e	E ₁
209	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E _e	E ₁
210	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E _e	E ₁
211	AikLE _{xii}	E _{viii}	E _f	E ₁
212	AikLE _{xii} E _i	E _{viii}	E _f	E ₁
213	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{viii}	E _f	E ₁
214	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _f	E ₁
215	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{viii}	E _f	E ₁
216	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{viii}	E _f	E ₁
217	AikLE _{xii}	E _{ix}		E ₁
218	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}		E ₁
219	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}		E ₁
220	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}		E ₁
221	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}		E ₁
222	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}		E ₁
223	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _a	E ₁
224	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _a	E ₁
225	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _a	E ₁
226	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _a	E ₁
227	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _a	E ₁
228	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _a	E ₁
229	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _b	E ₁
230	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _b	E ₁
231	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _b	E ₁
232	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _b	E ₁
233	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _b	E ₁
234	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _b	E ₁
235	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _d	E ₁
236	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _d	E ₁
237	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _d	E ₁
238	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _d	E ₁
239	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _d	E ₁
240	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _d	E ₁
241	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _e	E ₁
242	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _e	E ₁
243	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _e	E ₁
244	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _e	E ₁
245	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _e	E ₁
246	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _e	E ₁

247	AikLE _{xii}	E _{ix}	E _f	E ₁
248	AikLE _{xii} E _i	E _{ix}	E _f	E ₁
249	AikLE _{xii} E _{ii}	E _{ix}	E _f	E ₁
250	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _f	E ₁
251	AikLE _{xii} E _{iii}	E _{ix}	E _f	E ₁
252	AikLE _{xii} E _{iv}	E _{ix}	E _f	E ₁
253	AikLE _{xii}	E _x		E ₁
254	AikLE _{xii} E _i	E _x		E ₁
255	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x		E ₁
256	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x		E ₁
257	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x		E ₁
258	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x		E ₁
259	AikLE _{xii}	E _x	E _a	E ₁
260	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _a	E ₁
261	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _a	E ₁
262	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _a	E ₁
263	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _a	E ₁
264	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _a	E ₁
265	AikLE _{xii}	E _x	E _b	E ₁
266	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _b	E ₁
267	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _b	E ₁
268	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _b	E ₁
269	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _b	E ₁
270	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _b	E ₁
271	AikLE _{xii}	E _x	E _d	E ₁
272	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _d	E ₁
273	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _d	E ₁
274	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _d	E ₁
275	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _d	E ₁
276	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _d	E ₁
277	AikLE _{xii}	E _x	E _e	E ₁
278	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _e	E ₁
279	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _e	E ₁
280	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _e	E ₁
281	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _e	E ₁
282	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _e	E ₁
283	AikLE _{xii}	E _x	E _f	E ₁
284	AikLE _{xii} E _i	E _x	E _f	E ₁
285	AikLE _{xii} E _{ii}	E _x	E _f	E ₁
286	AikLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _f	E ₁
287	AikLE _{xii} E _{iii}	E _x	E _f	E ₁
288	AikLE _{xii} E _{iv}	E _x	E _f	E ₁
289	AikLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}		E ₁

290	AlkLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E ₁
291	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
292	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
293	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
294	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
295	AlkLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
296	AlkLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
297	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
298	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
299	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
300	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
301	AlkLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
302	AlkLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
303	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
304	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
305	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
306	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
307	AlkLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
308	AlkLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
309	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
310	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
311	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
312	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
313	AlkLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	E _e E ₁
314	AlkLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _e E ₁
315	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _e E ₁
316	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _e E ₁
317	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _e E ₁
318	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _e E ₁
319	AlkLE _{xii}	E _{vi} E _{viii}	E _f E ₁
320	AlkLE _{xii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _f E ₁
321	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _f E ₁
322	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _f E ₁
323	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _f E ₁
324	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _f E ₁
325	AlkLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E ₁
326	AlkLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E ₁

327	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E ₁
328	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E ₁
329	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E ₁
330	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E ₁
331	AlkLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a E ₁
332	AlkLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a E ₁
333	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a E ₁
334	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a E ₁
335	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a E ₁
336	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a E ₁
337	AlkLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b E ₁
338	AlkLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b E ₁
339	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b E ₁
340	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b E ₁
341	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b E ₁
342	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b E ₁
343	AlkLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d E ₁
344	AlkLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d E ₁
345	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d E ₁
346	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d E ₁
347	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d E ₁
348	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d E ₁
349	AlkLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e E ₁
350	AlkLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e E ₁
351	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e E ₁
352	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e E ₁
353	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e E ₁
354	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e E ₁
355	AlkLE _{xii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f E ₁
356	AlkLE _{xii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f E ₁
357	AlkLE _{xii} E _{ii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f E ₁
358	AlkLE _{xii} E _{ii} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f E ₁
359	AlkLE _{xii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f E ₁
360	AlkLE _{xii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f E ₁

- 5 Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugte Mikroorganismen (abgekürzt MO) sind hervorragend geeignet für die Produktion von terminalen Olefinen und weisen in der folgenden Tabelle beschriebene erhöhte bzw. erniedrigte Enzymaktivitäten (abgekürzt E) auf, wobei diese

zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Synthase III (EC 2.3.1.41), insbesondere jene aus Pflanzen, bevorzugt jene aus Pflanzen, deren Samen Fettsäuren mit Alkylresten kürzer als 14 C-Atome enthalten, und besonders bevorzugt jene aus Pflanzen der Gattungen *Cuphea*, *Elaeis*, *Cocos*, *Umbellularia* und *Cinnamomum* sowie Genprodukte ausgewählt aus AccA, AccB, AccC, AccD, AceE, AceF, Lpd, AcpP, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, PanD, PanK, UdhA, PntA oder PntB.

Es können beliebige Kombinationen von mindestens zwei dieser Enzymaktivitäten vorteilhaft erhöht werden.

Zusätzlich vorteilhaft kann es des weiteren sein, wenn der Mikroorganismus mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erniedrigten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die Genprodukte ausgewählt aus TdcE, PflA, PflB, PflC, PflD, PoxB, YgfG, AckA, AckB, TdcD, Pta, LdhA, AdhE, MgsA, FdnG, FdnH, FdnI, FdhF, FdoG, FdoH, FdoI, PrpC, PrpD, PrpF, PrpB, TdcD, Pdc, PorA, PorB, PorC, PorD, AlsS, IlvB, IlvM, IlvN, IlvG, IlvI, IlvH, AlsD, ButB, ThI, ThIA, ThIB, PhaA, PhaB, Crt, BdhA, BdhB, Adc, Adh, CtfB, AtoA, AtoD, LdhL, GltA, FabR, FhuA, Dld, LldA oder LldP, einzeln oder in beliebiger Kombination, ausgestattet ist.

MO	E erhöht	E erniedrigt
1	AlkL E _{xi}	
2	AlkLE _i E _{xi}	
3	AlkLE _{ii} E _{xi}	
4	AlkLE _{ii} E _{iib} E _{xi}	
5	AlkLE _{iii} E _{xi}	
6	AlkLE _{iv} E _{xi}	
7	AlkL E _{xi}	E _a
8	AlkLE _i E _{xi}	E _a
9	AlkLE _{ii} E _{xi}	E _a
10	AlkLE _{ii} E _{iib} E _{xi}	E _a
11	AlkLE _{iii} E _{xi}	E _a
12	AlkLE _{iv} E _{xi}	E _a
13	AlkL E _{xi}	E _b
14	AlkLE _i E _{xi}	E _b
15	AlkLE _{ii} E _{xi}	E _b
16	AlkLE _{ii} E _{iib} E _{xi}	E _b
17	AlkLE _{iii} E _{xi}	E _b

18	AlkLE _{iv} E _{xi}	E _b
19	AlkL E _{xi}	E _d
20	AlkLE _i E _{xi}	E _d
21	AlkLE _{ii} E _{xi}	E _d
22	AlkLE _{ii} E _{iib} E _{xi}	E _d
23	AlkLE _{iii} E _{xi}	E _d
24	AlkLE _{iv} E _{xi}	E _d
25	AlkL E _{xi}	E _e
26	AlkLE _i E _{xi}	E _e
27	AlkLE _{ii} E _{xi}	E _e
28	AlkLE _{ii} E _{iib} E _{xi}	E _e
29	AlkLE _{iii} E _{xi}	E _e
30	AlkLE _{iv} E _{xi}	E _e
31	AlkL E _{xi}	E _f
32	AlkLE _i E _{xi}	E _f
33	AlkLE _{ii} E _{xi}	E _f
34	AlkLE _{ii} E _{iib} E _{xi}	E _f
35	AlkLE _{iii} E _{xi}	E _f

- 145 -

36	AlkLE _{iv}	E _{xi}	E _f	
37	AlkL	E _{xi}		E ₁
38	AlkLE _i	E _{xi}		E ₁
39	AlkLE _{ii}	E _{xi}		E ₁
40	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{xi}		E ₁
41	AlkLE _{iii}	E _{xi}		E ₁
42	AlkLE _{iv}	E _{xi}		E ₁
43	AlkL	E _{xi}	E _a	E ₁
44	AlkLE _i	E _{xi}	E _a	E ₁
45	AlkLE _{ii}	E _{xi}	E _a	E ₁
46	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{xi}	E _a	E ₁
47	AlkLE _{iii}	E _{xi}	E _a	E ₁
48	AlkLE _{iv}	E _{xi}	E _a	E ₁
49	AlkL	E _{xi}	E _b	E ₁
50	AlkLE _i	E _{xi}	E _b	E ₁
51	AlkLE _{ii}	E _{xi}	E _b	E ₁
52	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{xi}	E _b	E ₁
53	AlkLE _{iii}	E _{xi}	E _b	E ₁
54	AlkLE _{iv}	E _{xi}	E _b	E ₁
55	AlkL	E _{xi}	E _d	E ₁
56	AlkLE _i	E _{xi}	E _d	E ₁

57	AlkLE _{ii}	E _{xi}	E _d	E ₁
58	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{xi}	E _d	E ₁
59	AlkLE _{iii}	E _{xi}	E _d	E ₁
60	AlkLE _{iv}	E _{xi}	E _d	E ₁
61	AlkL	E _{xi}	E _e	E ₁
62	AlkLE _i	E _{xi}	E _e	E ₁
63	AlkLE _{ii}	E _{xi}	E _e	E ₁
64	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{xi}	E _e	E ₁
65	AlkLE _{iii}	E _{xi}	E _e	E ₁
66	AlkLE _{iv}	E _{xi}	E _e	E ₁
67	AlkL	E _{xi}	E _f	E ₁
68	AlkLE _i	E _{xi}	E _f	E ₁
69	AlkLE _{ii}	E _{xi}	E _f	E ₁
70	AlkLE _{ii} E _{iib}	E _{xi}	E _f	E ₁
71	AlkLE _{iii}	E _{xi}	E _f	E ₁
72	AlkLE _{iv}	E _{xi}	E _f	E ₁

Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugte Mikroorganismen (abgekürzt MO) sind hervorragend geeignet für die Produktion von Alkan-1-aminen und weisen in der folgenden

- 5 Tabelle beschriebene erhöhte bzw. erniedrigte Enzymaktivitäten (abgekürzt E) auf, wobei diese zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrier Protein)-Synthase III (EC 2.3.1.41), insbesondere jene aus Pflanzen, bevorzugt jene aus Pflanzen, deren Samen Fettsäuren mit Alkylresten kürzer als 14 C-Atome enthalten, und
- 10 besonders bevorzugt jene aus Pflanzen der Gattungen *Cuphea*, *Elaeis*, *Cocos*, *Umbellularia* und *Cinnamomum* sowie Genprodukte ausgewählt aus AccA, AccB, AccC, AccD, AceE, AceF, Lpd, AcpP, FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI, FabZ, PanD, PanK, UdhA, PntA oder PntB.

- Es können beliebige Kombinationen von mindestens zwei dieser Enzymaktivitäten vorteilhaft
- 15 erhöht werden.

Zusätzlich vorteilhaft kann es des weiteren sein, wenn der Mikroorganismus mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erniedrigten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die Genprodukte ausgewählt aus TdcE, PflA, PflB, PflC, PflD, PoxB, YgfG, AckA, AckB, TdcD, Pta,

LdhA, AdhE, MgsA, FdnG, FdnH, FdnI, FdhF, FdoG, FdoH, FdoI, PrpC, PrpD, PrpF, PrpB, TdcD, Pdc, PorA, PorB, PorC, PorD, AlsS, IlvB, IlvM, IlvN, IlvG, IlvI, IlvH, AlsD, ButB, Thl, ThIA, ThIB, PhaA, PhaB, Crt, BdhA, BdhB, Adc, Adh, CtfB, AtoA, AtoD, LdhL, GltA, FabR, FhuA, Dld, LldA oder LldP, einzeln oder in beliebiger Kombination, ausgestattet ist.

5

MO	E erhöht	E ernidrigt
1	AlkLE _{vii} E _{viii}	
2	AlkLE _{vii} E _i E _{viii}	
3	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{viii}	
4	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	
5	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{viii}	
6	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{viii}	
7	AlkLE _{vii} E _{viii}	E _a
8	AlkLE _{vii} E _i E _{viii}	E _a
9	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{viii}	E _a
10	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _a
11	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{viii}	E _a
12	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{viii}	E _a
13	AlkLE _{vii} E _{viii}	E _b
14	AlkLE _{vii} E _i E _{viii}	E _b
15	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{viii}	E _b
16	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _b
17	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{viii}	E _b
18	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{viii}	E _b
19	AlkLE _{vii} E _{viii}	E _d
20	AlkLE _{vii} E _i E _{viii}	E _d
21	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{viii}	E _d
22	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _d
23	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{viii}	E _d
24	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{viii}	E _d
25	AlkLE _{vii} E _{viii}	E _e
26	AlkLE _{vii} E _i E _{viii}	E _e
27	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{viii}	E _e
28	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _e
29	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{viii}	E _e
30	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{viii}	E _e
31	AlkLE _{vii} E _{viii}	E _f
32	AlkLE _{vii} E _i E _{viii}	E _f
33	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{viii}	E _f
34	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{viii}	E _f

35	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{viii}	E _f
36	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{viii}	E _f
37	AlkLE _{vii} E _{ix}	
38	AlkLE _{vii} E _i E _{ix}	
39	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{ix}	
40	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{ix}	
41	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{ix}	
42	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{ix}	
43	AlkLE _{vii} E _{ix}	E _a
44	AlkLE _{vii} E _i E _{ix}	E _a
45	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{ix}	E _a
46	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{ix}	E _a
47	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{ix}	E _a
48	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{ix}	E _a
49	AlkLE _{vii} E _{ix}	E _b
50	AlkLE _{vii} E _i E _{ix}	E _b
51	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{ix}	E _b
52	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{ix}	E _b
53	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{ix}	E _b
54	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{ix}	E _b
55	AlkLE _{vii} E _{ix}	E _d
56	AlkLE _{vii} E _i E _{ix}	E _d
57	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{ix}	E _d
58	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{ix}	E _d
59	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{ix}	E _d
60	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{ix}	E _d
61	AlkLE _{vii} E _{ix}	E _e
62	AlkLE _{vii} E _i E _{ix}	E _e
63	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{ix}	E _e
64	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{ix}	E _e
65	AlkLE _{vii} E _{iii} E _{ix}	E _e
66	AlkLE _{vii} E _{iv} E _{ix}	E _e
67	AlkLE _{vii} E _{ix}	E _f
68	AlkLE _{vii} E _i E _{ix}	E _f
69	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{ix}	E _f
70	AlkLE _{vii} E _{ii} E _{iib} E _{ix}	E _f

[illegible]

157	$A_{ik}LE_{vij}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_a
158	$A_{ik}LE_{vij}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_a
159	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_a
160	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_a
161	$A_{ik}LE_{vij}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_a
162	$A_{ik}LE_{vij}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_a
163	$A_{ik}LE_{vij}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_b
164	$A_{ik}LE_{vij}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_b
165	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_b
166	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_b
167	$A_{ik}LE_{vij}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_b
168	$A_{ik}LE_{vij}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_b
169	$A_{ik}LE_{vij}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_d
170	$A_{ik}LE_{vij}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_d
171	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_d
172	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_d
173	$A_{ik}LE_{vij}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_d
174	$A_{ik}LE_{vij}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_d
175	$A_{ik}LE_{vij}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_e
176	$A_{ik}LE_{vij}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_e
177	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_e
178	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_e
179	$A_{ik}LE_{vij}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_e
180	$A_{ik}LE_{vij}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_e
181	$A_{ik}LE_{vij}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_f
182	$A_{ik}LE_{vij}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_f
183	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_f
184	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_f
185	$A_{ik}LE_{vij}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_f
186	$A_{ik}LE_{vij}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	E_f
187	$A_{ik}LE_{vij}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
188	$A_{ik}LE_{vij}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
189	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
190	$A_{ik}LE_{vij}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
191	$A_{ik}LE_{vij}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
192	$A_{ik}LE_{vij}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
193	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	
194	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{viii}	
195	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	
196	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	
197	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	
198	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	
199	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_a

200	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{viii}	E_a
201	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_a
202	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_a
203	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_a
204	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_a
205	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_b
206	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{viii}	E_b
207	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_b
208	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_b
209	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_b
210	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_b
211	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_d
212	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{viii}	E_d
213	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_d
214	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_d
215	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_d
216	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_d
217	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_e
218	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{viii}	E_e
219	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_e
220	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_e
221	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_e
222	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_e
223	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_f
224	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{viii}	E_f
225	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_f
226	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_f
227	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_f
228	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_f
229	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	
230	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{ix}	
231	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	
232	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	
233	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	
234	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	
235	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_a
236	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{ix}	E_a
237	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_a
238	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_a
239	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_a
240	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_a
241	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_b
242	$A_{ik}LE_{xiii}E_{vii}E_i$	E_{ix}	E_b

286	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i E _{jib}	E _x	E _d
287	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _d
288	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _d
289	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _e
290	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _e
291	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _e
292	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _x	E _e
293	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _e
294	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _e
295	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _f
296	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _f
297	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _f
298	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _x	E _f
299	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _f
300	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _f
301	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{vi} E _{viii}	
302	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	
303	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	
304	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _{vi} E _{viii}	
305	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	
306	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	
307	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _a
308	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _a
309	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _a
310	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _{vi} E _{viii}	E _a
311	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _a
312	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _a
313	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _b
314	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _b
315	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _b
316	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _{vi} E _{viii}	E _b
317	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _b
318	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _b
319	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _d
320	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _d
321	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _d
322	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _{vi} E _{viii}	E _d
323	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _d
324	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _d
325	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _e
326	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _e
327	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _e
328	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{jib}	E _{vi} E _{viii}	E _e

372	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f
373	AikLE _{vii}	E _{viii}	E ₁
374	AikLE _{vii} E _i	E _{vii}	E ₁
375	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{viii}	E ₁
376	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E ₁
377	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E ₁
378	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E ₁
379	AikLE _{vii}	E _{viii}	E _a E ₁
380	AikLE _{vii} E _i	E _{viii}	E _a E ₁
381	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{viii}	E _a E ₁
382	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{vii}	E _a E ₁
383	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _a E ₁
384	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _a E ₁
385	AikLE _{vii}	E _{viii}	E _b E ₁
386	AikLE _{vii} E _i	E _{viii}	E _b E ₁
387	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{viii}	E _b E ₁
388	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _b E ₁
389	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _b E ₁
390	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _b E ₁
391	AikLE _{vii}	E _{viii}	E _d E ₁
392	AikLE _{vii} E _i	E _{viii}	E _d E ₁
393	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{viii}	E _d E ₁
394	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _d E ₁
395	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _d E ₁
396	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _d E ₁
397	AikLE _{vii}	E _{viii}	E _e E ₁
398	AikLE _{vii} E _i	E _{viii}	E _e E ₁
399	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{viii}	E _e E ₁
400	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _e E ₁
401	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _e E ₁
402	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _e E ₁
403	AikLE _{vii}	E _{viii}	E _f E ₁
404	AikLE _{vii} E _i	E _{viii}	E _f E ₁
405	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{viii}	E _f E ₁
406	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{viii}	E _f E ₁
407	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _f E ₁
408	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _f E ₁
409	AikLE _{vii}	E _{ix}	E ₁
410	AikLE _{vii} E _i	E _{ix}	E ₁
411	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E ₁
412	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E ₁
413	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E ₁
414	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E ₁

- 151 -

415	AikLE _{vii}	E _{ix}	E _a E ₁
416	AikLE _{vii} E _i	E _{ix}	E _a E ₁
417	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E _a E ₁
418	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _a E ₁
419	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E _a E ₁
420	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _a E ₁
421	AikLE _{vii}	E _{ix}	E _b E ₁
422	AikLE _{vii} E _i	E _{ix}	E _b E ₁
423	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E _b E ₁
424	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _b E ₁
425	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E _b E ₁
426	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _b E ₁
427	AikLE _{vii}	E _{ix}	E _d E ₁
428	AikLE _{vii} E _i	E _{ix}	E _d E ₁
429	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E _d E ₁
430	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _d E ₁
431	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E _d E ₁
432	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _d E ₁
433	AikLE _{vii}	E _{ix}	E _e E ₁
434	AikLE _{vii} E _i	E _{ix}	E _e E ₁
435	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E _e E ₁
436	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _e E ₁
437	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E _e E ₁
438	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _e E ₁
439	AikLE _{vii}	E _{ix}	E _f E ₁
440	AikLE _{vii} E _i	E _{ix}	E _f E ₁
441	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E _f E ₁
442	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _f E ₁
443	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E _f E ₁
444	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _f E ₁
445	AikLE _{vii}	E _x	E ₁
446	AikLE _{vii} E _i	E _x	E ₁
447	AikLE _{vii} E _{ii}	E _x	E ₁
448	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E ₁
449	AikLE _{vii} E _{iii}	E _x	E ₁
450	AikLE _{vii} E _{iv}	E _x	E ₁
451	AikLE _{vii}	E _x	E _a E ₁
452	AikLE _{vii} E _i	E _x	E _a E ₁
453	AikLE _{vii} E _{ii}	E _x	E _a E ₁
454	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _a E ₁
455	AikLE _{vii} E _{iii}	E _x	E _a E ₁
456	AikLE _{vii} E _{iv}	E _x	E _a E ₁
457	AikLE _{vii}	E _x	E _b E ₁

458	AikLE _{vii} E _i	E _x	E _b E ₁
459	AikLE _{vii} E _{ii}	E _x	E _b E ₁
460	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _b E ₁
461	AikLE _{vii} E _{iii}	E _x	E _b E ₁
462	AikLE _{vii} E _{iv}	E _x	E _b E ₁
463	AikLE _{vii}	E _x	E _d E ₁
464	AikLE _{vii} E _i	E _x	E _d E ₁
465	AikLE _{vii} E _{ii}	E _x	E _d E ₁
466	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _d E ₁
467	AikLE _{vii} E _{iii}	E _x	E _d E ₁
468	AikLE _{vii} E _{iv}	E _x	E _d E ₁
469	AikLE _{vii}	E _x	E _e E ₁
470	AikLE _{vii} E _i	E _x	E _e E ₁
471	AikLE _{vii} E _{ii}	E _x	E _e E ₁
472	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _e E ₁
473	AikLE _{vii} E _{iii}	E _x	E _e E ₁
474	AikLE _{vii} E _{iv}	E _x	E _e E ₁
475	AikLE _{vii}	E _x	E _f E ₁
476	AikLE _{vii} E _i	E _x	E _f E ₁
477	AikLE _{vii} E _{ii}	E _x	E _f E ₁
478	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _f E ₁
479	AikLE _{vii} E _{iii}	E _x	E _f E ₁
480	AikLE _{vii} E _{iv}	E _x	E _f E ₁
481	AikLE _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
482	AikLE _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E ₁
483	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
484	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
485	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
486	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E ₁
487	AikLE _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
488	AikLE _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
489	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
490	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
491	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
492	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _a E ₁
493	AikLE _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
494	AikLE _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
495	AikLE _{vii} E _{ii}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
496	AikLE _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
497	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
498	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _b E ₁
499	AikLE _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁
500	AikLE _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _d E ₁

- 152 -

501	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
502	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
503	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
504	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _d	E ₁
505	AikLE _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
506	AikLE _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
507	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
508	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
509	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
510	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _e	E ₁
511	AikLE _{vii}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
512	AikLE _{vii} E _i	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
513	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
514	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
515	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
516	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{vi} E _{viii}	E _f	E ₁
517	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
518	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
519	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
520	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
521	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
522	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
523	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
524	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
525	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
526	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
527	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
528	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
529	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
530	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
531	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
532	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
533	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
534	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _a	E ₁
535	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
536	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
537	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
538	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
539	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
540	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _b	E ₁
541	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
542	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
543	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁

544	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
545	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
546	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _d	E ₁
547	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
548	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
549	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
550	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
551	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
552	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _e	E ₁
553	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
554	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
555	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
556	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
557	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
558	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x	E _f	E ₁
559	AikLE _{vii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
560	AikLE _{vii} E _i	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
561	AikLE _{vii} E _{ij}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
562	AikLE _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
563	AikLE _{vii} E _{iii}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
564	AikLE _{vii} E _{iv}	E _{iib} E _{vi} E _x		E ₁
565	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{viii}		E ₁
566	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{viii}		E ₁
567	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij}	E _{viii}		E ₁
568	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}		E ₁
569	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{viii}		E ₁
570	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{viii}		E ₁
571	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{viii}	E _a	E ₁
572	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{viii}	E _a	E ₁
573	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij}	E _{viii}	E _a	E ₁
574	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _a	E ₁
575	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _a	E ₁
576	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _a	E ₁
577	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{viii}	E _b	E ₁
578	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{viii}	E _b	E ₁
579	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij}	E _{viii}	E _b	E ₁
580	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _b	E ₁
581	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{viii}	E _b	E ₁
582	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{viii}	E _b	E ₁
583	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{viii}	E _d	E ₁
584	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{viii}	E _d	E ₁
585	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij}	E _{viii}	E _d	E ₁
586	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ij} E _{iib}	E _{viii}	E _d	E ₁

630	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _e	E _i
631	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _{ix}	E _f	E _i
632	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _{ix}	E _f	E _i
633	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _{ix}	E _f	E _i
634	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _{ix}	E _f	E _i
635	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _{ix}	E _f	E _i
636	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _{ix}	E _f	E _i
637	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x		E _i
638	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x		E _i
639	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x		E _i
640	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x		E _i
641	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x		E _i
642	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x		E _i
643	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _a	E _i
644	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _a	E _i
645	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _a	E _i
646	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _a	E _i
647	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _a	E _i
648	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _a	E _i
649	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _b	E _i
650	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _b	E _i
651	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _b	E _i
652	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _b	E _i
653	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _b	E _i
654	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _b	E _i
655	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _d	E _i
656	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _d	E _i
657	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _d	E _i
658	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _d	E _i
659	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _d	E _i
660	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _d	E _i
661	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _e	E _i
662	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _e	E _i
663	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _e	E _i
664	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _e	E _i
665	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _e	E _i
666	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _e	E _i
667	AikLE _{xiii} E _{vii}	E _x	E _f	E _i
668	AikLE _{xiii} E _{vii} E _i	E _x	E _f	E _i
669	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii}	E _x	E _f	E _i
670	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{ii} E _{iib}	E _x	E _f	E _i
671	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iii}	E _x	E _f	E _i
672	AikLE _{xiii} E _{vii} E _{iv}	E _x	E _f	E _i

Besonders bevorzugte, alternative Ausführungsformen erfindungsgemäßer Mikroorganismen werden im Folgenden ausgeführt:

- Zur Herstellung von Carbonsäuren mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen, insbesondere Fettsäuren, sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte
- 5 Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49180.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 10), AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9), AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37), AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35) sowie
- 10 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
- 15 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
- 20 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP–Thioester verstanden wird, und das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine
- 25 mit Polypeptidsequenz SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 oder mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens
- 30 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der jeweiligen Bezugssequenz SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der

Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, wie es in den

5 Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird.

Es kann in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b

10 aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1) sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder

15 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro

20 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

25

Zur Herstellung von Carbonsäureestern mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen im Carbonsäureanteil, bei denen die Alkoholkomponente sich ableitet von Methanol oder Ethanol, sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind,

30 dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49180.1

(kodiert durch SEQ ID NR: 10), AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9), AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37), AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35)

sowie

- 5 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der
- 10 entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der
- 15 Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP–Thioester verstanden wird,
- und
- das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus
- 20 *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere
- 25 mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der Bezugssequenz SEQ ID NR. 2 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden
- 30 wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird,
- und

dass er eine dritte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität der Enzyme E_v und E_{vi} aufweist,

wobei E_v ausgewählt ist aus YP_694462.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 67) und YP_045555.1

5 (kodiert durch SEQ ID Nr. 19), sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

10 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des

15 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_v generell insbesondere die Umwandlung von Dodecanoyl-CoA-Thioester mit Methanol zu Dodecanoyl-Methylester verstanden wird,

und E_{vi} ausgewählt ist aus YP_001724804.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 18), sowie

20 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber der vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden,

25 vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem

30 Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{vi} generell insbesondere die Synthese von Dodecanoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

- Es kann auch in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus
- 5 YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
- 10 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
- 15 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.
- 20 In einer alternativen Ausführungsform zur Herstellung von Carbonsäureestern mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen im Carbonsäureanteil, bei denen die Alkoholkomponente sich ableitet von Methanol oder Ethanol, sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des
- 25 Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9), AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37), AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35)
- sowie
- 30 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder

- 160 -

eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP–Thioester verstanden wird, und das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der Bezugssequenz SEQ ID NR. 2 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird, und dass er eine dritte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität des Enzyms E_{va} aufweist, wobei E_{va} ausgewählt ist aus YP_888622.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 114) sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination

davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit

5 umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{va} generell insbesondere die Umwandlung von Laurinsäure und S-Adenosylmethionin zu
10 Laurinsäuremethylester und S-Adenosylhomocystein verstanden wird.

Es kann auch in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus

15 YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
20 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
25 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

30

Zur Herstellung von einwertigen Alkoholen mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind,

dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35)

5 sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

10 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des

15 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP-Thioester verstanden wird,

und

20 das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert

25 sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der Bezugssequenz SEQ ID NR. 2 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im

30 Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird,

und

dass er eine dritte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität des Enzymes E_{vi} aufweist,

- 5 wobei E_{vi} ausgewählt ist aus YP_001724804.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 18) sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber der vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine

- 10 Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{vi} generell insbesondere die Synthese von Dodecanoyl-CoA-Thioester verstanden wird, und dass er eine vierte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität des Enzymes E_x aufweist,

wobei E_x ausgewählt ist aus BAB85476.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 77), YP_047869.1 (kodiert durch SEQ ID Nr 79 bzw. 81), YP_959486.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 83), YP_959769.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 139), B9TSP7.1 (kodiert durch (SEQ ID Nr. 141), sowie

- 25 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber der vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
- 30

Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_x generell insbesondere die Synthese von Laurylalkohol und NAD(P)^+ aus Lauryl-ACP, NAD(P)H und H^+ verstanden wird.

Es kann auch in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus

YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Zur Herstellung von einwertigen Alkoholen und Aldehyden mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9), AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37), AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35) sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,
5 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
10 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP–Thioester verstanden wird,
und
15 das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert
20 sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der Bezugssequenz SEQ ID NR. 2 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im
25 Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird,
und
dass er eine vierte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der
30 enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität des Enzyms E_{ix} aufweist,

wobei E_{ix} ausgewählt ist aus YP_887275.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 117), ABI83656.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 122), sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste

5 gegenüber der vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die
10 pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{ix} generell insbesondere die Synthese von Laurylaldehyd, NADP, AMP und 2 P_i
15 aus Laurinsäure, ATP, NADPH und H^+ verstanden wird.

Es kann auch in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus

20 YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), sowie

Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%,

25 besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des
30 Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität

des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

- 5 Zur Herstellung von Alkylaminen mit 8 bis 16 Kohlenstoffatomen sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9), AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37),
10 sowie
Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder
15 eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro
20 Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP-Thioester verstanden wird,
25 und
das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber
30 SEQ ID NR. 2, durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der Bezugssequenz SEQ ID NR. 2 besitzen, wobei

unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird, und

er eine vierte gentechnische Modifikation auf, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines Enzymes E_{xiii} aufweist, wobei dieses ausgewählt ist NP_901695.1 (kodiert durch SEQ ID Nr. 132) sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{xiii} generell insbesondere die Umsetzung von ω -Oxo-Laurinsäure und/oder ω -Oxo-Laurinsäuremethylester zu ω -Amino-Laurinsäure und/oder ω -Amino-Laurinsäuremethylester verstanden wird.

Es kann auch in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus YP_488518.1 (kodiert durch Seq ID Nr. 14, ehemals AP_000876.1), sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder

eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_p generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Zur Herstellung von Alkenen mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen sind besonders bevorzugt erfindungsgemäße Mikroorganismen geeignet, die dadurch gekennzeichnet sind, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_i handelt, welches Sequenzen umfasst, ausgewählt aus: AAC49269.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 8), Q39513.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 9), AAC49001.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 37), AEM72521.1 (kodiert durch SEQ ID NR: 35) sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität

- 170 -

des Enzyms E_i generell insbesondere die Hydrolyse von Dodecanoyl-ACP–Thioester verstanden wird,
und

das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus solchen, kodiert durch das alkL-Gen aus

- 5 *Pseudomonas putida* GPo1, welche wiedergegeben wird durch SEQ ID NR. 1, sowie Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere
10 mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der Bezugssequenz SEQ ID NR. 2 besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden
15 wird, und zwar in einem System, wie es in den Ausführungsbeispielen beschrieben wird, bei dem Glucose zu Palmitoleinsäure in einer *E. coli*-Zelle umgesetzt wird,
und

er eine vierte gentechnische Modifikation auf, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines Enzyms
20 E_{xi} aufweist, wobei dieses ausgewählt ist aus ADW41779.1 (kodiert durch SEQ ID NO. 168) sowie

- Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenz durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine
25 Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm
30 Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität des Enzyms E_{xiii}

- 171 -

generell insbesondere die Umsetzung von Natriumpalmitat mit Wasserstoffperoxid zu Pentadecen, CO₂ und Wasser verstanden wird.

Es kann auch in diesem Zusammenhang vorteilhaft sein, wenn der Mikroorganismus eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des

- 5 Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme E_b aufweist, wobei E_b ausgewählt ist aus Enzymen welche Sequenzen umfassen, ausgewählt aus YP_488518.1 (kodiert durch SEQ ID NR. 14), sowie

- 10 Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60%, bevorzugt bis zu 25%, besonders bevorzugt bis zu 15% insbesondere bis zu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 % der Aminosäurereste gegenüber den vorgenannten Bezugssequenzen durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50%, bevorzugt 65%, besonders bevorzugt 80%, insbesondere mehr als 90 % der Aktivität des Proteins mit der entsprechenden, vorgenannten Bezugssequenz besitzen, wobei unter 100% Aktivität des
- 15 Bezugsprotein die Erhöhung der Aktivität der als Biokatalysator verwendeten Zellen, also die pro Zeiteinheit umgesetzte Stoffmenge bezogen auf die eingesetzte Zellmenge (Units pro Gramm Zelltrockenmasse (cell dry weight) [U/g CDW]) im Vergleich zur Aktivität des Biokatalysators ohne Anwesenheit des Bezugsproteins verstanden wird, wobei unter der Aktivität in diesem Zusammenhang und im Zusammenhang mit der Bestimmung der Aktivität
- 20 des Enzyms E_b generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Verwendung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen

- 25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der vorgenannten Mikroorganismen zur Herstellung von organischen Substanzen, insbesondere von Fettsäuren, Fettsäureestern, Alkan-1-olen, Alkan-1-olen und Alkan-1-aminen, Alken-1-olen, Alken-1-aminen, Alkanen und Alkenen, insbesondere 1-Alkenen, welche gegebenenfalls eine
- 30 weitere Doppelbindung aufweisen können.

Im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Mikroorganismen als bevorzugte organische Substanzen und bevorzugte Mikroorganismen herausgestellte sind im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung ebenfalls bevorzugt.

Welche erfindungsgemäßen Organismen bevorzugt für bestimmte organische Substanzen
5 verwendet werden, ist im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Mikroorganismen bereits hervorgehoben.

Verfahren zur Herstellung einer organischen Substanz aus einer einfachen Kohlenstoffquelle

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer organischen Substanz, insbesondere von Fettsäuren, Fettsäureestern, Alkan-1-olen, Alkan-1-olen und Alkan-1-aminen, Alken-1-olen, Alken-1-aminen, Alkanen und Alkenen, insbesondere 1-Alkenen, welche gegebenenfalls eine weitere Doppelbindung aufweisen
15 können, aus einer einfachen Kohlenstoffquelle umfassend die Verfahrensschritte

- I) in Kontakt Bringen eines erfindungsgemäßen Mikroorganismus mit einem Medium beinhalten die einfache Kohlenstoffquelle,
- II) Kultivieren des Mikroorganismus unter Bedingungen, die es dem Mikroorganismus ermöglichen aus der einfachen Kohlenstoffquelle die organische Substanz zu bilden und
20 III) gegebenenfalls Isolierung der gebildeten organischen Substanz.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können die erfindungsgemäßen Mikroorganismen kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed-batch-Verfahren (Zulaufverfahren) oder repeated-fed-batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
25 zum Zwecke der Produktion der organischen Substanz mit dem Nährmedium in Kontakt gebracht und somit kultiviert werden. Denkbar ist auch ein semi-kontinuierliches Verfahren, wie es in der GB-A-1009370 beschrieben wird. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel („Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) oder im Lehrbuch von Storhas
30 („Bioreaktoren und periphere Einrichtungen“, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

- 5 In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugte erfindungsgemäße Mikroorganismen bevorzugt eingesetzt.

Als einfache Kohlenstoffquelle werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren die oben als bevorzugt genannten eingesetzt.

- Als Stickstoffquelle können organische stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, 10 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat, Ammoniak, Ammoniumhydroxid oder Ammoniakwasser verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 15 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogen-phosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten 20 Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie 25 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in 30 die Kultur eingetragen.

Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dieses in einem Zwei-Phasen-System durchgeführt, beinhaltend

A) eine wässrige Phase, sowie

B) eine organische Phase,

- 5 wobei die Bildung der organischen Substanz durch den Mikroorganismus im Verfahrensschritt II) in der wässrigen Phase erfolgt und sich die gebildete organische Substanz in der organischen Phase anreichert. Auf dieser Weise ist es möglich, die gebildete organische Substanz *in situ* zu extrahieren.

Bevorzugte organische Substanzen, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt

- 10 werden, sind die oben als bevorzugt genannten Substanzen, insbesondere die Fettsäuren und Fettsäurederivate.

In den nachfolgend aufgeführten Beispielen wird die vorliegende Erfindung beispielhaft

- 15 beschrieben, ohne dass die Erfindung, deren Anwendungsbreite sich aus der gesamten Beschreibung und den Ansprüchen ergibt, auf die in den Beispielen genannten Ausführungsformen beschränkt sein soll.

Welche erfindungsgemäßen Organismen bevorzugt in bevorzugten erfindungsgemäßen

Verfahren für bestimmte organische Substanzen eingesetzt werden, ist im Zusammenhang mit

- 20 den erfindungsgemäßen Mikroorganismen bereits hervorgehoben.

Beispiele:

- 25 *Beispiel 1: Herstellung eines E. coli-Expressionsvektors für die Überexpression des Gens alkL aus P. putida GPo1*

Zur Herstellung eines *E. coli*-Expressionsvektors für die Überexpression des *Pseudomonas putida*-Gens *alkL* (SEQ ID NR: 01) wurde dieses Gen synthetisch hergestellt und dann wie der

- 30 Promotor *P_{lacuv5}* (SEQ ID NR: 34) aus einem pJ294-Derivat unter Einbringung homologer Bereiche zur Rekombinationsklonierung amplifiziert. Gleichzeitig wurden über die verwendeten

- 175 -

Oligonukleotide eine Schnittstelle stromaufwärts des Promotors und eine Schnittstelle stromabwärts des Stopcodons von *alkL* eingeführt.

Bei der Amplifikation des Gens *alkL* und des Promotors P_{lacuv5} aus den jeweiligen pJ294-Derivaten als Matrize kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

5

Promotorbereich:

fw-Prom+H1: 5'- ACC ACA GCC AGG ATC CTT CAA TAT TAT TGA AGC -3' (SEQ ID NR: 03)

rv-Prom: 5'- ATG CCA CTC TCC TTG -3' (SEQ ID NR: 04)

10

fw-*alkL*+H2: 5'- CAA GGA GAG TGG CAT GTG AGT TTT TCT AAT TAT -3' (SEQ ID NR: 05)

rv-*alkL*+H3: 5'- TTA CCA GAC TCG AGG GTA CCT TAG AAA ACA TAT GAC -3' (SEQ ID NR: 06)

15

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98 °C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98 °C, 0:30 min, Annealing, 50,5 °C, 0:45 min; Elongation, 72 °C, 0:15 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 5 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 100 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarosegel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise.

20

In beiden Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrug für den Promotorbereich 654 Basenpaare und für das *alkL*-Konstrukt 728 Basenpaare.

25

Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem „Quick Gel Extraktion Kit“ von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte zusammen mit dem *Bam*HI-*Kpn*I-geschnittenen pCDFDuet-1 (71340-3, Merck, Darmstadt) mittels *in vitro*-Klonierung unter Verwendung des „In-Fusion Advantage PCR Cloning Kits“ von Clontech (Saint-Germain-en-Laye) unter Erhalt des resultierenden Vektors rekombiniert. Die Verwendung entsprach den Empfehlungen des Herstellers.

30

pCDFDuet-1 ist ein *E. coli*-Vektor, der in dem Organismus eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz vermittelt sowie einen ColDF13 Replikationsursprung trägt. Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte in dem

5 Fachmann bekannter Art und Weise.

Die Richtigkeit des Plasmids wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *Xba*I kontrolliert. Die Authentizität der inserierten Fragmente wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Der fertiggestellte *E. coli*-Expressionsvektor wurden als pCDF[alkL] (SEQ ID NR:07) bezeichnet.

10 *Beispiel 2: Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene fatB2 und fatB1 aus Cuphea hookeriana sowie fatB2 aus Cuphea palustris*

Zur Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene *fatB2* und *fatB1* aus *Cuphea hookeriana* (SEQ ID NR. 08 bzw. SEQ ID NR. 09) bzw. *fatB2* aus *Cuphea palustris* (SEQ ID NR. 10)

15 wurden diese Gene für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert. Die Gene wurden zusammen mit einem *tac*-Promotor (SEQ ID Nr. 39) synthetisiert und gleichzeitig eine Schnittstelle stromaufwärts des Promotors und eine Schnittstelle stromabwärts des Terminators eingeführt. Die synthetisierten DNA-Fragmente *P_{tac}-ChFatB2*, *P_{tac}-ChFatB1* und *P_{tac}-CpFatB2*, wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I verdaut und in den entsprechend

20 geschnittenen Vektor pJ294 (DNA 2.0 Inc.; Menlo Park, CA, USA) ligiert. Die fertiggestellten *E.coli*-Expressionsvektoren wurden als pJ294[P_{tac}-ChFATB2_optEc] (SEQ ID NR. 11), pJ294[P_{tac}-CpFATB2_optEc] (SEQ ID NR. 13) und pJ294[P_{tac}-ChFATB1_optEc] (SEQ ID NR. 12) bezeichnet.

25

Beispiel 3: Chromatografische Quantifizierung von Produkten

Die Quantifizierung von Fettsäuren erfolgte nach Derivatisierung als Fettsäuremethylester mittels Gaschromatografie. Zu den Proben, bestehend aus 2 ml Kulturbrühe, wurden nach

30 Zugabe von 1 ml Aceton und 2 ml Wasser 50 μ l Heptadecansäure (10 g/l gelöst in Ethanol) als interne Referenzsubstanz zugesetzt. Die Proben wurden mit 200 μ l Essigsäure angesäuert und mit 10 ml einer 1:1 (v/v) Chloroform/Methanol-Mischung versetzt. Die Proben wurden mindestens 1 min kräftig durchmischt. Anschließend wurde die Chloroformphase entnommen

und eingedampft. Der trockene Rückstand wurde in 1 ml 1,25 M methanolischer Salzsäure aufgenommen und zur Veresterung der enthaltenen Fettsäuren bei 50°C über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung abgestoppt (alle Substanzen Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Extraktion der Fettsäuremethylester erfolgte durch
5 Zugabe von 1 ml n-Heptan und 15sekündiges kräftiges Durchmischen. Die Heptanphase wurde mittels Gaschromatografie vermessen. Für die Trennung von Fettsäuremethylestern wurde die Kapillarsäule SPTM-2560 mit den Maßen 100 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,2 µm (Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim) als stationäre Phase eingesetzt. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Trennung erfolgte innerhalb von 45 min mit einer Injektortemperatur von
10 260°C, Detektortemperatur von 260°C und Säulentemperatur von 140°C zu Beginn, gehalten für 5 min und erhöht auf 240°C mit einer Rate von 4°C/min und gehalten für 15 min. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, die Splitrate 1:20 und der Durchfluss des Trägergases 1 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (GC Perkin Elmer Clarus 500, Perkin Elmer, Rodgau). Heptadecansäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde als interne
15 Referenzsubstanz zur Quantifizierung der Fettsäuremethylester verwendet. Die Referenzsubstanzen C8:0-Me Caprylsäuremethylester, C10:0-Me Caprinsäuremethylester, C12:0-Me Laurinsäuremethylester, C14:0-Me Myristinsäuremethylester, C16:0-Me Palmitinsäuremethylester, C16:1-Me Palmitoleinsäuremethylester, C18:0-Me Stearinsäuremethylester, C18:1-Me Ölsäuremethylester (GLC Standard Mix GLC-20 1892-
20 1AMP, GLC-30 1893-1AMP, GLC-50 1894-1AMP, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden zur Kalibrierung verwendet. Die unteren Bestimmungsgrenzen lagen für alle Fettsäuremethylester bei einer Konzentration von 10 mg/l.

*Beispiel 4: Produktion von Fettsäuren durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen *fadE*, welche
25 die Gene *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 in verschiedenen Modifikationen und *fatB2* aus *Cuphea hookeriana* überexprimieren.*

Zunächst wurde ein *E.coli* Stamm mit Deletion im Gen *fadE* (SEQ ID NR. 14) konstruiert. Zur Herstellung der Gendeletion wurde ein Plasmid konstruiert, welches die DNA-Sequenz $\Delta fadE$
30 (SEQ ID Nr. 15) trägt. Diese Sequenz wurde synthetisiert und besteht aus homologen Bereichen 500 Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts des *fadE*-Gens sowie der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NotI* am 5'- und 3'-Ende. Die Sequenz

ΔfadE wurde mit der Restriktionsendonuclease *NofI* verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pKO3 ligiert. Die Konstruktion des Stammes *E.coli* W3110 *ΔfadE* erfolgte mit Hilfe des pKO3-*ΔfadE* Konstruktes (SEQ ID NR. 16) mit dem Fachmann bekannten Methoden (siehe Link AJ, Phillips D, Church GM. J.Bacteriol. 1997. 179(20).). Die DNA-Sequenz nach Deletion ist in SEQ ID NR. 17 wiedergegeben.

Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor für das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 in Kombination mit dem Expressionsvektor für das Gen *fatB2* aus *Cuphea hookeriana* wurden elektrokompente Zellen von *E. coli* W3110 *ΔfadE* hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Diese wurden mit den Plasmiden pCDFDuet-1 oder pCDF[*alkL*] in Kombination mit pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] transformiert und auf LB-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft.

So wurden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]
- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[*alkL*]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]

Diese Stämme wurden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettsäuren zu untersuchen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die Stämme wurden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu

untersuchenden Stämme wurden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste

Kultivierungsschritt erfolgte in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM

Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-

Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung,

wurde mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die

zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat,

6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM

Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat

und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 37%iger Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt), wurde vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium wurden mit 100

- 179 -

- µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden wurden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml
- 5 Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,4 bis 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (Zeitpunkt t_0). Die Stämme wurden mindestens weitere 24 Stunden bei gleichbleibenden Bedingungen kultiviert.
- 10 Während der Kultivierung wurden Proben von 2 ml entnommen und die Konzentration von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen analog zu Beispiel 3 quantifiziert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

- Tabelle 1: Produktion von Fettsäuren mit *E.coli* W3110 $\Delta fadE$, der *fatB2* aus *C.hookeriana*
- 15 sowie *alkL* aus *P.putida* GPo1 überexprimiert. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 29 Stunden Inkubation.

Stamm	C _{Caprylsäure} [mg/l*OD]	C _{Caprinsäure} [mg/l*OD]	C _{Myristinsäure} [mg/l*OD]	C _{Palmitinsäure} [mg/l*OD]	C _{Palmitoleinsäure} [mg/l*OD]	C _{Stearinsäure} [mg/l*OD]	C _{Ölsäure} [mg/l*OD]
<i>E.coli</i> W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]	30,1	2,4	1,9	13,6	17,3	3,6	1,9
<i>E.coli</i> W3110 $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]	82,6	10,6	4,1	23,7	74,0	9,1	4,1

- Somit wurde gezeigt, dass die Stämme mit *alkL* wesentlich mehr Caprylsäure, Caprinsäure,
- 20 Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure und Ölsäure bilden, als die Stämme ohne *alkL*. Das zeigt, dass die Verstärkung von *alkL* förderlich für die Herstellung von Fettsäuren verschiedener Kettenlänge und Sättigungsgrade aus nicht verwandten Kohlenstoffquellen ist.

- 180 -

Beispiel 5: Herstellung eines E. coli-Expressionsvektors für die Gene fadD aus Escherichia coli und atfA aus Acinetobacter sp. ADP1

Zur Herstellung des *E. coli*-Expressionsvektors für die Gene *fadD* (SEQ ID NR: 18) aus
 5 *Escherichia coli* und *atfA* mit Terminator (SEQ ID NR: 19) aus *Acinetobacter sp. ADP1* unter
 Kontrolle eines *tac*-Promotor wurden diese Gene aus chromosomaler DNA von *E. coli* W3110
 bzw. *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 per PCR unter Einbringung homologer Bereiche zur
 Rekombinationsklonierung amplifiziert. Der synthetische *tac*-Promotor (SEQ ID NR: 20) wurde
 mit Ribosombindungsstelle aus einem pJ294-Derivat unter Einbringung homologer Bereiche
 10 amplifiziert. Die Präparation der chromosomalen DNA von *E. coli* W3110 bzw. *Acinetobacter*
calcoaceticus ADP1 erfolgte mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den
 Angaben des Herstellers. Bei der Amplifikation der Gene *fadD* aus *E. coli* sowie *atfA* aus
Acinetobacter sp. ADP1 mit chromosomaler DNA von *E. coli* W3110 bzw. *Acinetobacter*
calcoaceticus ADP1 als Matrize, sowie der Amplifikation des synthetischen Promotors P_{tac} aus
 15 einem pJ294-Derivat kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

P_{tac} :

11-001_fw: 5'-TTATGCGACTCCTGCGTTTAGGGAAAGAGCATTTG-3'
 (SEQ ID NR: 21)

20 Ptac-rv: 5'-GTAAACATATGTTTTACCTCCTGTAAACAAA-3'
 (SEQ ID NR: 22)

fadD [*E.coli*]:

fadD-fw: 5'-TAAACATATGTTAACGGCATGTATATCATTT-3'
 25 (SEQ ID NR: 23)

fadD-rv: 5'-TCTCCTCAGACTTAACGCTCAGGCTTTATTGT-3'
 (SEQ ID NR: 24)

atfA [*Acinetobacter sp. ADP1*]:

30 atfA-fw: 5'-GTAAAGTCTGAGGAGATCCACGCTATGCGCCC-3'
 (SEQ ID NR: 25)

11-002_rv: 5'-CAATTGAGATCTGCCACGACTGCAATGGTTCATC-3'
 (SEQ ID NR: 26)

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 103 °C, 3:00 min; 35 x: Denaturierung, 98 °C, 0:10 min, Annealing, 65°C, 0:15 min; Elongation, 72 °C, 0:45 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gelelektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise.

In allen Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrugen für den Promotorbereich P_{tac} 607 bp, für *fadD* 1778 bp und für *atfA* 1540 bp.

Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert und mit dem Quick Gel Extraktion Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit dem *Eco*NI/*Nde*I -

geschnittenen Vektor pCDFDuet™-1 (71340-3, Merck, Darmstadt) mittels in-vitro Klonierung unter Verwendung des Geneart Seamless Cloning and Assembly Kit der Firma Invitrogen (Darmstadt) rekombiniert. Die Verwendung entsprach den Empfehlungen des Herstellers.

pCDFDuet-1 ist ein *E. coli*-Vektor, der in dem Organismus eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz vermittelt sowie einen ColDF13 Replikationsursprung trägt. Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise.

Die Richtigkeit des Plasmids wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *Xba*I kontrolliert. Die Authentizität der inserierten Fragmente wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Der fertig gestellte *E. coli*-Expressionsvektor wurde als pCDF[*fadD*-*atfA*] (SEQ ID NR: 27), bezeichnet.

Beispiel 6: Herstellung eines E. coli-Expressionsvektors für die Gene fadD aus Escherichia coli, atfA aus Acinetobacter sp. ADP1 und alkL aus Pseudomonas putida GPO1

Zur Herstellung eines *E. coli*-Expressionsvektors für die Gene *fadD* aus *Escherichia coli*, *atfA* aus *Acinetobacter sp. ADP1* und *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPO1 wird das Plasmid pCDF[*alkL*] (SEQ ID NR: 07) mit *Fse*I und *Xho*I verdaut, um im Anschluß das Fragment,

welches das *alkL*-Gens aus *Pseudomonas putida* GPo1 unter Kontrolle des P_{lacuv5} -Promotors trägt (siehe Beispiel 1), zu isolieren.

Das verdaute Plasmid wird zu diesem Zweck auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der Restriktionsverdaus, der Agarose-Gelelektrophorese,

- 5 Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der Restriktionsfragmentgrößen erfolgt in dem Fachmann bekannter Art und Weise. Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wird die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert und mit dem Quick Gel Extraktion Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

- 10 Das aufgereinigte Restriktionsfragment wird anschließend mit dem ebenfalls mit *FseI* und *XhoI* geschnittenen Vektor-Fragment (7290 bp) von pCDF[*fadD*-*atfA*] (SEQ ID NR: 27) ligiert. Ligation des DNA-Fragments und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgen in dem Fachmann bekannter Art und Weise.

- Die Richtigkeit der entstandenen Plasmide wird durch eine Restriktionsanalyse mit *FseI* und *XhoI* kontrolliert. Die Authentizität der inserierten Fragmente wird mittels DNA-Sequenzierung
15 überprüft. Der fertig gestellte *E. coli*-Expressionsvektor wird als pCDF[*fadD*-*atfA*]-[*alkL*] (SEQ ID NR: 28), bezeichnet.

Beispiel 7: Chromatografische Quantifizierung von Produkten

- 20 Die Quantifizierung von Fettsäureestern erfolgt mittels Gaschromatografie. Zu den Proben, bestehend aus 1 ml Kulturbrühe, werden nach Zugabe von 100 μ l Heptadecansäuremethylester-Lösung (5 g/l gelöst in Aceton) 1,1 ml n-Heptan zugegeben und die Proben dann 15 Sekunden kräftig gevortexed. Die Heptanphase wird mittels
25 Gaschromatografie vermessen. Für die Trennung von Fettsäureestern wird die Kapillarsäule SPTM-2560 mit den Maßen 100 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,2 μ m (Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim) als stationäre Phase eingesetzt. Als Trägergas wird Helium verwendet. Die Trennung erfolgt innerhalb von 45 min mit einer Injektortemperatur von 260°C, Detektortemperatur von 260°C und Säulentemperatur von 140°C zu Beginn, gehalten für 5 min
30 und erhöht auf 240°C mit einer Rate von 4°C/min und gehalten für 15 min. Das Injektionsvolumen beträgt 1 μ l, die Splitrate 1:20 und der Durchfluss des Trägergases 1 ml/min. Die Detektion erfolgt mittels Flammenionisationsdetektor (GC Perkin Elmer Clarus 500, Perkin

Elmer, Rodgau). Heptadecansäuremethylester (Sigma-Aldrich, Steinheim) wird als interne Referenzsubstanz zur Quantifizierung der Fettsäureester verwendet. Die Referenzsubstanzen C8:0-Me Caprylsäuremethylester, C10:0-Me Caprinsäuremethylester, C12:0-Me Laurinsäuremethylester, C14:0-Me Myristinsäuremethylester, C16:0-Me

- 5 Palmitinsäuremethylester, C16:1-Me Palmitoleinsäuremethylester, C18:0-Me Stearinsäuremethylester, C18:1-Me Ölsäuremethylester (GLC Standard Mix GLC-20 1892-1AMP, GLC-30 1893-1AMP, GLC-50 1894-1AMP; Sigma-Aldrich, Steinheim) C8:0-Et Caprylsäureethylester, C10:0-Et Caprinsäureethylester, C12:0-Et Laurinsäureethylester, C14:0-Et Myristinsäureethylester, C16:0-Et Palmitinsäureethylester, C18:0-Et Stearinsäureethylester, 10 C18:1-Et Ölsäureethylester (alle von Sigma-Aldrich, Steinheim) und C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester (Biomol, Hamburg) werden zur Kalibrierung verwendet. Die unteren Bestimmungsgrenzen liegen für alle Fettsäureester bei einer Konzentration von 10 mg/l.

- 15 *Beispiel 8: Produktion von Fettsäureestern durch E. coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE, welcher die Gene alkL aus Pseudomonas putida GPo1, ChfatB1 bzw. ChfatB2 aus Cuphea hookeriana bzw. Cpfat2“ aus Cuphea palustris, fadD aus E. coli und atfA aus Acinetobacter sp. ADP1 überexprimiert.*

- 20 Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor für die Gene *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1, *fadD* aus *Escherichia coli* und *atfA* aus *Acinetobacter sp.* ADP1 aus *Pseudomonas putida* GPo1 in Kombination mit dem Expressionsvektor für das Gen *fatB2* aus *Cuphea hookeriana* werden elektrokompente Zellen von *E. coli* W3110 $\Delta fadE$ (siehe Beispiel 4) hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Diese 25 werden mit den Plasmiden pCDF[fadD-atfA] (SEQ ID NR: 27) bzw. pCDF[fadD-atfA]-[alkL] (SEQ ID NR: 28) in Kombination mit pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID NR. 11), pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] (SEQ ID NR: 13) bzw. pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] (SEQ ID NR: 12) transformiert und auf LB-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten werden durch Plasmidpräparation und analytische 30 Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft. So werden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDF[fadD-atfA]-/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]

- 184 -

- *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-attA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]
 - *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-attA]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc]
 - *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-attA]-[alkL]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc]
 - *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-attA]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]
- 5 • *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-attA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]

Diese Stämme werden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettsäureestern zu untersuchen. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

- Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu
- 10 untersuchenden Stämme werden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgt in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-
- 15 Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wird mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat
- 20 und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 37%iger Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt), wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium werden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden
- 25 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgt bei 30°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,4 bis 0,5 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (Zeitpunkt t_0). Die Stämme
- 30 werden mindestens weitere 24 Stunden bei gleichbleibenden Bedingungen kultiviert. Während

der Kultivierung werden Proben von 2 ml entnommen und die Konzentration von Fettsäuremethylestern bzw. Fettsäureethylestern unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen analog zu Beispiel 7 quantifiziert.

Dabei wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-

- 5 ChFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] vor allem in der Lage sind, C8:0-Me Caprylsäuremethylester, C10:0-Me Caprinsäuremethylester, C16:0-Me Palmitinsäuremethylester, C16:1-Me Palmitoleinsäuremethylester und C18:1-Me Ölsäuremethylester (bei Zugabe von Methanol) bzw. C8:0-Et Caprylsäureethylester, C10:0-Et Caprinsäureethylester, C16:0-Et
- 10 Palmitinsäureethylester, C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester und C18:1-Et Ölsäureethylester (bei Zugabe von Ethanol) zu bilden.

Weiterhin wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-

- CpFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] vor allem in der Lage sind, C12:0-Me Laurinsäuremethylester, C14:0-Me
- 15 Myristinsäuremethylester, C16:0-Me Palmitinsäuremethylester, C16:1-Me Palmitoleinsäuremethylester, C18:0-Me Stearinsäuremethylester und C18:1-Me Ölsäuremethylester (bei Zugabe von Methanol) bzw. C12:0-Et Laurinsäureethylester, C14:0-Et Myristinsäureethylester, C16:0-Et Palmitinsäureethylester, C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester und C18:1-Et Ölsäureethylester (bei Zugabe von Ethanol) zu bilden.

- 20 Weiterhin wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] und *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] vor allem in der Lage sind, C14:0-Me Myristinsäuremethylester, C16:0-Me Palmitinsäuremethylester, C16:1-Me Palmitoleinsäuremethylester, C18:0-Me Stearinsäuremethylester und C18:1-Me Ölsäuremethylester (bei Zugabe von Methanol) bzw.
- 25 C14:0-Et Myristinsäureethylester, C16:0-Et Palmitinsäureethylester, C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester und C18:1-Et Ölsäureethylester (bei Zugabe von Ethanol) zu bilden.

Schließlich wird gezeigt, dass die in diesem Beispiel benannten Stämme *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc], *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]-

- 30 [alkL]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc], wesentlich mehr der jeweiligen Fettsäuremethylester (bei Zugabe von Methanol) bzw. Fettsäureethylester (bei Zugabe von Ethanol) bilden, als die

Stämme *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc], *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 Δ fadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]. Das zeigt, dass die Verstärkung des *alkL*-Genproduktes förderlich für die Herstellung von Fettsäureestern mit verschiedenen Kettenlängen der Alkylkette sowohl des Fettsäure- als auch des Alkoholrestes der Fettsäureester bzw. unterschiedlichem Sättigungsgrad der Alkylkette der Fettsäure aus nicht verwandten Kohlenstoffquellen ist.

10 *Beispiel 9: Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene CnfatB3 aus Cocos nucifera und synUcTE aus Umbellularia californica*

Zur Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene *fatB3* (SEQ ID NO. 35) aus *Cocos nucifera* und *synUcTE* (SEQ ID Nr. 37) aus *Umbellularia californica* (jeweils kodierend für ein Enzym E_i) wurden diese Gene für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert. Die Gene wurden jeweils zusammen mit einem *tac*-Promotor (SEQ ID Nr. 39) synthetisiert und gleichzeitig eine Schnittstelle stromaufwärts des Promotors und eine Schnittstelle stromabwärts des Terminators eingeführt. Die synthetisierten DNA-Fragmente *P_{tac}-CnFATB3* sowie *P_{tac}-synUcTE* wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pJ294 (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA) ligiert. Die fertiggestellten *E.coli*-Expressionsvektoren wurden als pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 40), pJ294[Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 41) bezeichnet. Der Vektor pJ294 ist ein *E.coli*-Vektor, der Ampicillin-Resistenz vermittelt sowie einen p15A Replikationsursprung trägt und damit eine niedrige Kopienzahl (10-15 Kopien pro Zelle) aufweist.

25

Beispiel 10: Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene alkL_Oa aus Oceanocaulis alexandrii, alkL_Ma aus Marinobacter aquaeolei, alkL_CspK31 aus Caulobacter sp. K31

30 Zur Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene *alkL_Oa* (SEQ ID Nr. 42) aus *Oceanocaulis alexandrii* HTCC2633, *alkL_Ma* (SEQ ID Nr. 44) aus *Marinobacter aquaeolei* VT8, *alkL_CspK31* (SEQ ID Nr. 46) aus *Caulobacter sp. K31* (jeweils kodierend für ein AlkL-

Genprodukt) wurden diese Gene zusammen mit einem *lacuv5*-Promotor (SEQ ID Nr. 34) synthetisiert. Die synthetisierten DNA-Fragmente *P_{lacuv5}-alkL_Oa*, *P_{lacuv5}-alkL_Ma* und *P_{lacuv5}-alkL_CspK31* wurden unter Einbringung homologer Bereiche zur Rekombinationsklonierung amplifiziert.

- 5 Für die Amplifikation der Zielgene kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz.

alkL_H1_fw: 5'-GCTTACTGAATTTGCCTGAACCATGGGGCAGTGAG-3' (SEQ ID Nr. 48)

alkL_H2_rv: 5'-TTCTGAAGTGGGGGCGGCCGCCCTTTTGACGGGTACC-3' (SEQ ID Nr. 49)

- Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98°C, 1 min; 35
 10 x: Denaturierung, 98°C, 0:15 min, Annealing, 60°C, 0:45 min; Elongation, 72 °C, 1:30 min; 1 x:
 terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity
 Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des
 Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem
 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-
 15 Gelelektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-
 Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise. In allen Fällen konnten
 PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrugen für *P_{lacuv5}-alkL_Oa*
 906 Basenpaare, *P_{lacuv5}-alkL_Ma* 960 Basenpaare und für *P_{lacuv5}-alkL_CspK31* 903 Basenpaare.
 Zur Isolierung der DNA aus dem TAE-Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus
 20 dem Gel herausgeschnitten und mit dem QiaQuick Gel extraction Kit nach Anleitung des
 Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden zusammen
 mit dem *NotI*-geschnittenen Vektor pJ294[P_{tac}-ChFATB2_{optEc}] (SEQ ID Nr. 11) mittels
 Rekombination unter Verwendung des Geneart® Seamless Cloning and Assembly Kit nach
 Anleitung des Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kloniert. Aus den so
 25 entstandenen pJ294-Derivaten pJ294{P_{tac}}[ChFATB2(co_Ec){Placuv5}][*alkL_Oa*] (SEQ ID Nr.
 50), pJ294{P_{tac}}[ChFATB2(co_Ec){Placuv5}][*alkL_Ma*] (SEQ ID Nr. 51) und
 pJ294{P_{tac}}[ChFATB2(co_Ec){Placuv5}][*alkL_CspK31*] (SEQ ID Nr. 52) wurden die Fragmente
P_{lacuv5}-alkL_Oa, *P_{lacuv5}-alkL_Ma* und *P_{lacuv5}-alkL_CspK31* mittels Restriktionsverdau mit den
 Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* herausgeschnitten und in den entsprechend
 30 geschnittenen Vektor pCDFDuet-1 (71340-3, Merck, Darmstadt; SEQ ID Nr. 53) ligiert. Die
 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte
 nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wurde durch

Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität der eingebrachten Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die entstandenen Expressionsvektoren wurden als pCDF[alkL_Oa] (SEQ ID Nr. 54) , pCDF[alkL_Ma] (SEQ ID Nr. 55) und pCDF[alkL_CspK31] (SEQ ID Nr. 56) bezeichnet.

5

Beispiel 11: HPLC/ESI-basierte Quantifizierung von Fettsäuren

Die Quantifizierung von Octansäure, 3-Hydroxydecansäure, Decansäure, Laurinsäure,
10 3-Hydroxymyristinsäure, Myristinsäure, Palmitoleinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure und Stearinsäure in Fermentationsproben erfolgte mittels HPLC-ESI/MS anhand einer internen Kalibrierung für alle Analyten und unter Verwendung der internen Standards D3-Laurinsäure (Methyl-D3, 99%) für Octansäure, 3- Hydroxydecansäure, Decansäure, Laurinsäure,
15 3-Hydroxymyristinsäure, Myristinsäure, Palmitoleinsäure und D3-Stearinsäure (Methyl-D3, 98%) für Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure.

Dabei kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- HPLC Anlage: Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), bestehend aus Surveyor MS Pump, Surveyor Autosampler plus und Surveyor PDA
20 Surveyor
- Massenspektrometer: TSQ Vantage mit HESI II – Quelle (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- HPLC-Säule: XBridge BEH C8, 100 x 2,1 mm, Partikelgröße: 2,5 µm, Porengröße 130 Å
(Waters, Milford Massachusetts, USA)

25

Die Proben wurden vorbereitet, indem 1200 µL Aceton und 300 µL Probe ca. 10 Sekunden gemischt und anschließend bei ca. 13000 rpm für 5 min zentrifugiert wurden. Der klare Überstand wurde entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit Aceton analysiert. Zu
je 900 µL der verdünnten Probe wurden 100 µL ISTD hinzupipettiert.

30 Die HPLC-Trennung erfolgte mit oben genannter HPLC-Säule. Das Injektionsvolumen betrug 2 µL, die Säulentemperatur 25°C, die Flussrate 0,3 mL/min. Die mobile Phase bestand aus Eluent

- 189 -

A (Wasser + 10 mMol Ammoniumacetat mit Ammoniak auf pH = 9 eingestellt) und Eluent B (Acetonitril / Eluent A 95/5). Folgendes Gradientenprofil wurde genutzt

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
1	95	5
1,1	70	30
7	5	95
8	5	95

5 Die ESI-MS-Analyse erfolgte bei negativer Ionisierung mit folgenden Parametern der ESI-Quelle:

- Spray Voltage: 3000 V
- Vaporizer Temperature: 380 °C
- Sheath gas Pressure: 40
- 10 • Aux Gas Pressure: 15
- Capillary Temperature: 380 °C

Die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Verbindungen erfolgte per „single ion monitoring“ (SIM) mit den folgenden Parametern:

15

Analyt	Ion [M-H] ⁻ [m/z]	Scan Weite [m/z]	Scan Zeit [ms]	Peak-Weite Q ₃
Octansäure	143,13	0,002	100	0,7
3- Hydroxydecansäure	187,13	0,002	50	0,7
Decansäure	171,13	0,002	100	0,7
Laurinsäure	199,16	0,002	50	0,7
3-Hydroxymyristinsäure	243,18	0,002	50	0,7
Myristinsäure	227,19	0,002	50	0,7
Palmitoleinsäure	253,18	0,002	50	0,7
Palmitinsäure	255,22	0,002	30	0,7
Ölsäure	281,23	0,002	30	0,7
Stearinsäure	283,25	0,002	30	0,7
D3-Laurinsäure	202,16	0,002	50	0,7
D3-Stearinsäure	286,25	0,002	30	0,7

Beispiel 12: Produktion von Fettsäuren durch *E.coli*-Stämme mit Deletion im Gen *fadE*, welcher die Gene *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1, *alkL* aus *Oceanocaulis alexandrii* HTCC2633

oder *alkL* aus *Caulobacter* sp. K31 und *fatB1* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB2* aus *Cuphea hookeriana*, *synUcTE* aus *Umbellularia californica* oder *fatB3* aus *Cocos nucifera* überexprimiert.

- 5 Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor für das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1, *alkL* aus *Oceanocaulis alexandrii* HTCC2633 oder *alkL* aus *Caulobacter* sp. K31 in Kombination mit dem Expressionsvektor für das Gen *fatB1* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB2* aus *Cuphea hookeriana*, *synUcTE* aus *Umbellularia californica* oder *fatB3* aus *Cocos nucifera* wurden elektrokompente Zellen von *E.coli* W3110 Δ *fadE* sowie *E.coli* JW5020-1 Kan^S hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. *E.coli* JW5020-1 Kan^S ist ein Derivat von *E.coli* JW5020-1 (CGSC, The coli genetic stock center, Yale University, New Haven, USA), dieser wiederum ein *E.coli* BW25113-Derivat, der eine Deletion des Gens *fadE* trägt. Das Gen *fadE* wurde durch eine Kanamycinkassette ausgetauscht. Diese wurde vor der Ausstattung des Stammes mit den Expressionsvektoren mit Hilfe eines Helferplasmides, welches für *flp*-Rekombinase codiert, in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise entfernt (siehe Datsenko K.A. und Wanner B.L. (2000) PNAS 97(12):6640-6645) resultierend in Stamm *E.coli* JW5020-1 Kan^S. *E.coli* JW5020-1 Kan^S wurde mit den Plasmiden pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] (SEQ ID Nr. 12), pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 11) oder pJ294[Ptac][CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 40) in Kombination mit pCDFDuet-1, pCDF[*alkL*] (SEQ ID Nr. 7) oder pCDF[*alkL*_Oa] (SEQ ID Nr. 54) oder pCDF[*alkL*_CspK31] (SEQ ID Nr. 56), sowie *E.coli* W3110 Δ *fadE* mit den Plasmiden pJ294[Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 41) in Kombination mit pCDFDuet-1 (SEQ ID Nr. 53) oder pCDF[*alkL*] (SEQ ID Nr. 7) transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft.

So wurden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDFDuet-1
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[*alkL*]
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDFDuet-1
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[*alkL*_Oa]

- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL_CspK31]
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDFDuet-1
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL]
- *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDFDuet-1
- 5 • *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL]

Diese Stämme wurden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettsäuren zu untersuchen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme wurden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Spectinomycin als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgte in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wurde mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wurde vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium wurden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme wurden weitere 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min kultiviert.

- 192 -

Während der Kultivierung werden Proben von 300 µl entnommen und die Konzentration von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen wie in Beispiel 10 beschrieben quantifiziert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

- 5 Produktion von Fettsäuren mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S, der *fatB2* aus *C.hookeriana* sowie *alkL* aus *Oceanocaulis alexandrii* HTCC2633 bzw. *alkL* aus *Caulobacter* sp. K31 überexprimiert. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 24 Stunden Kultivierung (n.n. = nicht nachweisbar):

Stamm	C _{Caprylsäure} [mg//OD]	C _{Caprinsäure} [mg//OD]	C _{Palmitoleinsäure} [mg//OD]	C _{Vaccensäure} [mg//OD]
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDFDuet-1	21,0	1,8	0,1	1,3
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL_Oa]	27,5	6,3	5,9	2,3
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL_CspK31]	38,6	4,7		

10

Produktion von Fettsäuren mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S, der *fatB3* aus *C.nucifera* sowie *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 überexprimiert. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 48 Stunden Kultivierung (n.n. = nicht nachweisbar):

Stamm	C _{Caprylsäure} [mg//OD]	C _{Laurinsäure} [mg//OD]	C _{Myristinsäure} [mg//OD]	C _{Palmitoleinsäure} [mg//OD]	C _{Palmitinsäure} [mg//OD]	C _{Vaccensäure} [mg//OD]
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDFDuet-1	0,1	3,2	4,5	13,4	1,7	4,0
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL]	0,5	6,8	9,9	21,2	3,1	5,6

15

- 193 -

Produktion von Fettsäuren mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S, der *fatB1* aus *C.hookeriana* sowie *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 überexprimiert. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 24 Stunden Kultivierung (n.n. = nicht nachweisbar):

Stamm	C _{Myristinsäure} [mg//OD]	C _{Palmitoleinsäure} [mg//OD]
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDFDuet-1	38,2	0,1
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[alkL]	42,8	62,0

Produktion von Fettsäuren mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S, der *synUcTE* aus *U.californica* sowie *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 überexprimiert. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 24 Stunden Kultivierung (n.n. = nicht nachweisbar):

Stamm	C _{Laurinsäure} [mg//OD]	C _{Myristinsäure} [mg//OD]
<i>E.coli</i> W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDFDuet-1	0,1	0,1
<i>E.coli</i> W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL]	20,1	1,9

Somit wurde gezeigt, dass Stämme, die *alkL* aus *P.putida*, *O.alexandrii* oder *Caulobacter sp.* überexprimieren, in der Lage sind, mehr Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmitoleinsäure oder Vaccensäure, abhängig von der Spezifität der überexprimierten Acyl-ACP Thioesterase, zu bilden. Dies zeigt, dass eine Verstärkung von *alkL* förderlich für die Herstellung von Fettsäuren verschiedener Kettenlängen und Sättigungsgrade aus nicht verwandten Kohlenstoffquellen ist.

Beispiel 13: Herstellung von Vektoren für die Coexpression der Gene fatB2 aus Cuphea hookeriana, fatB3 aus Cocos nucifera, synUcTE aus Umbellularia californica mit alkL aus Pseudomonas putida

5

Zur Herstellung von Vektoren für die Coexpression der Gene *fatB2* (SEQ ID Nr. 8) aus *Cuphea hookeriana*, *fatB3* (SEQ ID Nr. 35) aus *Cocos nucifera*, *synUcTE* (SEQ ID Nr. 37) aus *Umbellularia californica* mit einem *alkL*-Gen aus *Pseudomonas putida* wurde das Gen *alkL* (SEQ ID Nr. 1) zusammen mit dem *lacuv5*-Promotor und Terminator aus dem Vektor pCDF[*alkL*] (SEQ ID Nr. 7) amplifiziert.

10

Für die Amplifikation des Fragmentes P-*alkL*-T (SEQ ID NO. 58) für die Coexpression mit *fatB2* und *synUcTE* kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz.

NP-FA-P19: 5'-ATCCGCTCACAATTGCAAATGCCTGAGGTTTCAGC-3' (SEQ ID Nr. 59)

15

NP-FA-P20: 5'-CTTCCCTTCATTTTGGTCTCGGTCGATCATTCAGC-3' (SEQ ID Nr. 60)

Für die Amplifikation des Fragmentes P-*alkL*-T (SEQ ID NO. 58) für die Coexpression mit *fatB3* kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz.

NP-FA-P19: 5'-ATCCGCTCACAATTGCAAATGCCTGAGGTTTCAGC-3' (SEQ ID Nr. 59)

20

NP-FA-P21: 5'-ACTTAGTCGCTGAAGGTCTCGGTCGATCATTCAGC-3' (SEQ ID Nr. 61)

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98°C, 1 min; 35 x: Denaturierung, 98°C, 0:15 min, Annealing, 65°C, 0:45 min; Elongation, 72 °C, 1:30 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gelelektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die PCR-Fragmente mit einer erwarteten Größe von 1095 Basenpaaren konnte amplifiziert werden. Zur Isolierung der DNA aus dem TAE-Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel extraction Kit* nach Anleitung des Herstellers

25

30

- 195 -

(Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden zusammen mit den oben beschriebenen Vektoren pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 11), pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 40), pJ294[Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 41), welche mit *Bam*HI linearisiert wurden, mittels Rekombination unter Verwendung des Geneart®

- 5 Seamless Cloning and Assembly Kit nach Anleitung des Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kloniert. Die entstandenen Expressionsvektoren wurden als pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[ChFATB2(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 62), pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 63) und pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[synUcTE(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 64) bezeichnet. Die Transformation
- 10 chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α erfolgte nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wurde durch Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität des Inserts durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

- 15 *Beispiel 14: Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene fadD aus Escherichia coli und wax-dgaT (atfA) aus Acinetobacter sp. ADP1 sowie atfA1 aus Alcanivorax borkumensis*

- Zur Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene *fadD* (SEQ ID Nr. 57) aus *Escherichia coli* (kodierend für ein Enzym E_v) und *wax-dgaT* (*atfA* in Beispiel 5) (SEQ ID Nr. 65) aus
- 20 *Acinetobacter sp. ADP1* bzw. *atfA1* (SEQ ID Nr. 67) aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (jeweils kodierend für ein Enzym E_v) wurden die Gene *wax-dgaT* und *atfA1* für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert und in Kombination mit dem Gen *fadD* aus *E.coli* synthetisiert. Die synthetisierten DNA-Fragmente *wax-dgaT_AsADP1-fadD_Ec* (SEQ ID Nr. 69) und *atfA1_Ab-fadD_Ec* (SEQ ID Nr. 70) wurden unter Einbringung homologer Bereiche zur
- 25 Rekombinationsklonierung amplifiziert.

Für die Amplifikation des Fragmentes *wax-dgaT_AsADP1-fadD_Ec* kamen folgenden Oligonukleotide zum Einsatz:

- wax-dgaT_H1_fw: 5'- ACAGGAGGTAAAACATATGCGTCCTCTGCACCCG-3' (SEQ ID Nr. 71)
- 30 fadD_H2_rv: 5'- GTTTCTTTACCAGACTCGAGATTGTTTTCTCTTTAGTGGGCGTC-3' (SEQ ID Nr. 72)

Für die Amplifikation des Fragmentes *atfA1_Ab-fadD_Ec* kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

atfA_Ab_fw_kurz: 5'- ACAGGAGGTAAAACATATGAAAGCGCTGTCCC-3' (SEQ ID Nr. 73)

fadD_H2_rv_N: 5'-GTTTCTTTACCAGACTCGAGATTGTTTTCTCTTTAGTGGGC-3' (SEQ ID

5 Nr. 74)

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98°C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98°C, 0:10 min, Annealing, 70°C, 0:20 min; Elongation, 72°C, 1 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise. In beiden Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrugen für *wax-dgaT_AsADP1-fadD_Ec* 3192 Basenpaare und *atfA1_Ab-fadD_Ec* 3189 Basenpaare. Zur Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel extraction Kit* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in ein *NdeI*- und *XhoI*-geschnittenen pCDF-Derivat, das bereits einen synthetischen *tac*-Promotor enthält (SEQ ID Nr. 39), mittels Rekombination unter Verwendung des Geneart® Seamless Cloning and Assembly Kit nach Anleitung des Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) kloniert. Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wurde durch Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität der eingebrachten Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die entstandenen Expressionsvektoren wurden als pCDF[*wax-dgaT_AsADP1(co_Ec)-fadD_Ec*] (SEQ ID Nr. 75) und pCDF[*atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec*] (SEQ ID Nr. 76) bezeichnet.

30 *Beispiel 15: Gaschromatografische Quantifizierung von Fettsäuremethylestern*

Die Quantifizierung von Fettsäuremethylestern in der Kulturbrühe erfolgte mittels Gaschromatografie. Der Kulturbrühe wurden 500 mg/L Heptadecansäuremethylester als interne Referenzsubstanz zugesetzt. Die Kulturbrühe wurde zur Extraktion der Fettsäuremethylester in einem äquivalenten Volumen n-Heptan 15 min bei 12 Hz geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde die Probe 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert und die organische Phase wurde mittels Gaschromatografie vermessen. Für die Trennung von Fettsäuremethylestern wurde die Kapillarsäule SPTM-2560 mit den Maßen 100 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,2 µm (Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim) als stationäre Phase eingesetzt. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Trennung erfolgte innerhalb von 45 min mit einer Injektortemperatur von 260°C, Detektortemperatur von 260°C und Säulentemperatur von 140°C zu Beginn, gehalten für 5 min und erhöht auf 240°C mit einer Rate von 4°C/min und gehalten für 15 min. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, die Splitrate 1:20 und der Durchfluss des Trägergases 1 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (GC Perkin Elmer Clarus 500, Perkin Elmer, Rodgau). Heptadecansäuremethylester (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde als interne Referenzsubstanz zur Quantifizierung der Fettsäuremethylester verwendet. Die Referenzsubstanzen C8:0-Me Caprylsäuremethylester, C10:0-Me Caprinsäuremethylester, C12:0-Me Laurinsäuremethylester, C14:0-Me Myristinsäuremethylester, C16:0-Me Palmitinsäuremethylester, C16:1-Me Palmitoleinsäuremethylester, C18:0-Me Stearinsäuremethylester, C18:1-Me Ölsäuremethylester (GLC Standard Mix GLC-20 1892-1AMP, GLC-30 1893-1AMP, GLC-50 1894-1AMP, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden zur Kalibrierung verwendet. Die Bestimmungsgrenzen lagen für alle Fettsäuremethylester bei einer Konzentration von 10 mg/l.

Beispiel 16: Produktion von Fettsäuremethylestern durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE, welcher die Gene alkL aus Pseudomonas putida GPo1 und eine pflanzliche Acyl-ACP-Thioesterase sowie eine Acyl-CoA-Synthetase und eine Wachs-Ester-Synthase überexprimiert.

Zur Erzeugung von E.coli-Stämmen mit dem Expressionsvektor für die Gene alkL aus Pseudomonas putida GPo1 und fatB2 aus Cuphea hookeriana, fatB3 aus Cocos nucifera bzw. synUcTE aus Umbellularia californica in Kombination mit dem Expressionsvektor für die Gene fadD aus Escherichia coli und wax-dgaT aus Acinetobacter sp. ADP1 bzw. atfA1 aus

Alcanivorax borkumensis SK2 wurden elektrokompente Zellen von *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ sowie *E.coli* JW5020-1 Kan^S hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. *E.coli* JW5020-1 Kan^S wurde mit den Vektoren

pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[ChFATB2(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 62) oder

- 5 pJ294[Placuv5][alkL]{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 63) bzw. pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 11) oder pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 40) in Kombination mit pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec] (SEQ ID Nr. 76) sowie *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ mit den Vektoren pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[synUcTE] (SEQ ID Nr. 62) bzw. pJ294[Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 41) in Kombination mit pCDF[wax-dgaT_AsAPD1(co_Ec)-fadD_Ec] (SEQ ID Nr. 75) transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft.

So wurden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]
- 15 • *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Placuv5}[alkL][Ptac][ChFATB2(co_Ec)] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Placuv5}[alkL][Ptac][CnFATB3(co_Ec)] /
- 20 pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[wax-dgaT_AsAPD1(co_Ec)-fadD_Ec]
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[synUcTE] / pCDF[wax-dgaT_AsAPD1(co_Ec)-fadD_Ec]

- 25 Diese Stämme wurden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettsäuremethylestern zu untersuchen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme wurden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Spectinomycin als 5 ml-Vorkultur aus je

- einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgte in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und
- 5 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wurde mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1 M Salzsäure (alle
- 10 Substanzen von Merck, Darmstadt) wurde vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium wurden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und
- 15 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme wurden weitere 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min kultiviert. Eine
- 20 Stunde nach der Induktion der Genexpression wird 1% (v/v) Methanol in die Kulturbrühe gegeben. Während der Kultivierung werden Proben entnommen und die Konzentration von Fettsäuremethylester unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen wie in Beispiel 15 beschrieben quantifiziert. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt.
- 25 Produktion von Fettsäuremethylestern mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 Δ*fadE*, die eine Acyl-ACP-Thioesterase, *fadD* aus *E.coli* sowie eine Wachs-Ester-Synthase überexprimieren. Gezeigt sind Stämme mit und ohne Überexpression von *alkL* aus *P.putida* GPo1. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettsäuremethylester unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 24 Stunden Kultivierung (n.n. = nicht nachweisbar):

- 200 -

Stamm	C ₆ Caprylsäuremethylester [mg/L/OD]	C ₈ Caprinsäuremethylester [mg/L/OD]	C ₁₂ Laurinsäuremethylester [mg/L/OD]	C ₁₄ Myristinsäuremethylester [mg/L/OD]
<i>E. coli</i> W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[wax-dgaT_AsADP1(co_Ec)-fadD_Ec]	n.n.	n.n.	0,1.	1,5
<i>E. coli</i> W3110 ΔfadE pJ294[alkL][Ptac-synUcTE] / pCDF[wax-dgaT_AsADP1(co_Ec)-fadD_Ec]	n.n.	n.n.	11,1	3,7
<i>E. coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]	8,0	4,0		
<i>E. coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Placuv5}[alkL][Ptac][ChFATB2(co_Ec)] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]	9,5	4,8		
<i>E. coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]	n.n.	n.n.	3,1	6,3
<i>E. coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Placuv5}[alkL][Ptac][CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]	n.n.	n.n.	4,3	8,5

Somit wurde gezeigt, dass Stämme, die *alkL* aus *P. putida* überexprimieren, in der Lage sind mehr Caprylsäuremethylester, Caprinsäuremethylester, Laurinsäuremethylester und Myristinsäuremethylester, abhängig von der Spezifität der überexprimierten Acyl-ACP-Thioesterase, zu bilden. Dies zeigt, dass eine Verstärkung von *alkL* förderlich für die Herstellung von Fettsäuremethylestern unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge aus nicht verwandten Kohlenstoffquellen ist.

- 5
- 10 *Beispiel 17: Herstellung von Expressionsvektoren für die Coexpression von Acyl-ACP-Reduktase-Genen mit dem Acyl-CoA-Synthetase-Gen fadD aus Escherichia coli und alkL aus Pseudomonas putida*

- 201 -

Zur Herstellung von Expressionsvektoren für die Coexpression von *fadD* (SEQ ID Nr. 57) aus *Escherichia coli* (kodierend für ein Enzym E_v) und *acrM* (SEQ ID Nr. 77) aus *Acinetobacter sp. M-1*, *acr1b* (SEQ ID Nr. 79) aus *Acinetobacter sp. ADP1*, *acr1a* (SEQ ID Nr. 81) aus *Acinetobacter sp. ADP1* bzw. *Maqu_2220* (SEQ ID Nr. 83) aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 (kodierend für ein Enzym E_x) und *alkL* aus *Pseudomonas putida* (SEQ ID Nr. 1, kodierend für ein AlkL-Genprodukt) wurden die Gene *acr1a* aus *Acinetobacter sp. ADP1* und *Maqu_2220* für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert und diese Gene sowie das Gen *acrM* aus *Acinetobacter sp. M-1* synthetisiert (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA). Diese Gene wurden ausgehend von der synthetischen DNA sowie das Gen *acr1b* aus *Acinetobacter sp. ADP1* ausgehend von chromosomaler DNA als Matrize mittels PCR amplifiziert. Über die eingesetzten Oligonukleotide wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit homologen Bereichen zum jeweiligen Nachbarfragment und zum mit *PspXI* linearisierten Zielvektor pCDF[*alkL*] (SEQ ID Nr. 7) zur Rekombinationsklonierung versehen. Gleichzeitig wurde das Gen *fadD* aus *Escherichia coli* zusammen mit einem synthetischen *tac*-Promotor (SEQ ID Nr. 39) ausgehend von einem pCDF-Derivat als Matrize per PCR amplifiziert und ebenfalls über die eingesetzten Oligonukleotide mit homologen Bereichen versehen.

Zur Herstellung des Expressionsvektors für die Gene *luxC*, *luxD* und *luxE* aus dem *lux*-Operon von *Photobacterium luminescens* und *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 wurde das *luxCDE*-Operon (SEQ ID Nr. 85) für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert und synthetisiert (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA). Das Operon wurde ausgehend von der synthetisierten DNA als Matrize per PCR amplifiziert sowie der *tac*-Promotor, ausgehend von einem pCDF-Derivat, welches diesen Promotor enthält (SEQ ID Nr. 39). Beide DNA-Fragmente wurden für die Rekombinationsklonierung über die verwendeten Oligonukleotide mit homologen Bereichen für die zum jeweiligen Nachbarfragment und zum linearisierten Zielvektor versehen.

Bei der Amplifikation des *tac*-Promotor, des Acyl-CoA-Synthetase-Gens und der Acyl-ACP-Reduktase-Gene für die Coexpression mit *alkL* kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

P_{tac} und *fadD* für die Coexpression mit *acr1a* [*Acinetobacter sp. ADP1*]:

NP-FA-P1: 5'-TTTTCTAAGGTACCCGATAACAATTACGAGCTTCATG-3' (SEQ ID Nr. 86)

NP-FA-P2: 5'-CTCCTTCAGCTCAGGCTTTATTGTCCAC-3' (SEQ ID Nr. 87)

- 202 -

P_{tac} und *fadD* für die Coexpression mit *acrM* [*Acinetobacter sp. M-1*]:

NP-FA-P1: 5'-TTTTCTAAGGTACCCGATAACAATTACGAGCTTCATG-3' (SEQ ID Nr. 86)

NP-FA-P5: 5'-CTCCTTCAGCTCAGGCTTTATTGTC-3' (SEQ ID Nr. 88)

5 P_{tac} und *fadD* für die Coexpression mit Maqu_2220 [*Marinobacterium aquaeolei* VT8]:

NP-FA-P1: 5'-TTTTCTAAGGTACCCGATAACAATTACGAGCTTCATG-3' (SEQ ID Nr. 86)

NP-FA-P8: 5'-TCCTTCTCGCTCAGGCTTTATTGTCC-3' (SEQ ID Nr. 89)

P_{tac} und *fadD* für die Coexpression mit *acr1b* [*Acinetobacter sp. ADP1*]:

10 NP-FA-P1: 5'-TTTTCTAAGGTACCCGATAACAATTACGAGCTTCATG-3' (SEQ ID Nr. 86)

NP-FA-P14: 5'-CCTGATTGGCTCAGGCTTTATTGTC-3' (SEQ ID Nr. 90)

P_{tac} für die Expression von *luxCDE* [*Photorhabdus luminescens*]:

NP-FA-P1: 5'-TTTTCTAAGGTACCCGATAACAATTACGAGCTTCATG-3' (SEQ ID Nr. 86)

15 NP-FA-P11: 5'-ACCTCCTAGTTTTACCTCCTGTTAAACAA-3' (SEQ ID Nr. 91)

acr1a [*Acinetobacter sp. ADP1*]:

NP-FA-P3: 5'- CCTGAGCTGAAGGAGTTACAGTTTGATC-3' (SEQ ID Nr. 92)

NP-FA-P4: 5'- GTTTCTTTACCAGACTTATCACCAGTGCTCACC-3' (SEQ ID Nr. 93)

20

acrM [*Acinetobacter sp. M1*]:

NP-FA-P6: 5'-CCTGAGCTGAAGGAGTTACAGTATGAATG-3' (SEQ ID Nr. 94)

NP-FA-P7: 5'-GTTTCTTTACCAGACTTATTACCAGTGTTTCG-3' (SEQ ID Nr. 95)

25 Maqu_2220 [*Marinobacterium aquaeolei* VT8]:

NP-FA-P9: 5'-CCTGAGCGAGAAGGAGTTCTATCATGG-3' (SEQ ID Nr. 96)

NP-FA-P10: 5'-GTTTCTTTACCAGACTCATTACGCGGCCTTTTTGTC-3' (SEQ ID Nr. 97)

acr1b [*Acinetobacter sp. ADP1*]:

30 NP-FA-P15: 5'-CCTGAGCCAATCAGGGAAAAACGCGTG-3' (SEQ ID Nr. 98)

NP-FA-P16: 5'-GTTTCTTTACCAGACCTCTCGGTATGAGAGGCTTC-3' (SEQ ID Nr. 99)

luxCDE [*Photorhabdus luminescens*]:

NP-FA-P12: 5'-GTAAACTAGGAGGTAAAAAATGACG-3' (SEQ ID Nr. 100)

NP-FA-P13: 5'-GTTTCTTTACCAGACTTAGCTATCGAACGAACGCCTCG-3' (SEQ ID Nr. 101)

- 5 Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98°C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98°C, 0:10 min, Annealing, 60°C, 0:45 min; Elongation, 72°C, 1:30 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem
- 10 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise.
- In allen Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrugen für den *tac*-Promotor 171 Basenpaare, für den *tac*-Promotor und *fadD* zur
- 15 Coexpression mit *acr1a* [*A.sp.* ADP1] bzw. Maqu2220 1927 Basenpaare, zur Coexpression mit *acrM* 1919 Basenpaare und zur Coexpression mit *acr1b* [*A.sp.* ADP1] 1933 Basenpaare. Die PCR-Fragmente für *acr1a* [*A.sp.* ADP1] betrugen 952 Basenpaare, für *acrM* 906 Basenpaare, für Maqu2220 1561 Basenpaare, für *acr1b* [*A.sp.*ADP1] 903 Basenpaare und für *luxCDE* 3621 Basenpaare.
- 20 Zur Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel extraction Kit* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mittels Rekombination unter Verwendung des Geneart® Seamless Cloning and Assembly Kit nach Anleitung des Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in den mit *PspXI* linearisierten Vektor
- 25 pCDF[alkL] (SEQ ID Nr. 7) kloniert. Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wurde durch Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität der eingebrachten Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

So entstanden folgenden Expressionsvektoren:

- 30
- pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1] (SEQ ID Nr. 102)
 - pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acr1a_AsADP1(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 103)
 - pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acrM_AsM1] (SEQ ID Nr. 104)

- 204 -

- pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 105)
- pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_PI(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 106)

Zur Herstellung von Vektoren für die Coexpression von *fadD* aus *Escherichia coli* und *acrM* aus *Acinetobacter* sp. M-1, *acr1b* aus *Acinetobacter* sp. ADP1, *acr1a* aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (codonoptimiert) bzw. *Maqu_2220* aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 (codonoptimiert) sowie die Expression von *luxC*, *luxD* und *luxE* aus *Photobacterium luminescens* (codonoptimiert) ohne die Coexpression von *alkL* wurden diese Gene mittels PCR ausgehend von den bereits erzeugten Expressionsvektoren pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-*acr1b*_AsADP1], pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-*acr1a*_AsADP1(co_Ec)], pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-*acrM*_AsM1], pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] und pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_PI(co_Ec)] unter Einbringung homologer Bereiche zum *PspXI* / *NcoI*-geschnittenen Zielvektor pCDF[alkL] (SEQ ID Nr. 7) amplifiziert.

Dabei kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

NP-FA-P17: 5'-AATAAGGAGATATACGATAACAATTACGAGCTTCATG-3' (SEQ ID Nr. 107)

NP-FA-P18: 5'-GTTTCTTTACCAGACGCGTTCAAATTTGCGAGCAG-3' (SEQ ID Nr. 108)

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98°C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98°C, 0:15 min, Annealing, 60°C, 0:45 min; Elongation, 72°C, 1:30 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gelelektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise.

In allen Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrugen für *P_{tac}-fadD_Ec-*acr1a*_AsADP1* 2901 Basenpaare, für *P_{tac}-fadD_Ec-*acrM*_AsM1* 2877 Basenpaare, für *P_{tac}-fadD_Ec-Maqu_2220* 3532 Basenpaare, für *P_{tac}-fadD_Ec-*acr1b*_AsADP1* 2907 Basenpaare und für *P_{tac}-luxCDE* 3810 Basenpaare.

- 205 -

Zur Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel extraction Kit* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mittels Rekombination unter Verwendung des Geneart® Seamless Cloning and Assembly Kit nach Anleitung des
5 Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in den mit *PspXI* und *NcoI* verdauten Vektor pCDF[alkL] (SEQ ID Nr. 7) kloniert. Durch die Restriktion des Vektors wird das Gen *alkL* aus diesem entfernt. Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der
10 Zielgene wurde durch Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität der eingebrachten Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

So entstanden folgenden Expressionsvektoren:

- pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1] (SEQ ID Nr. 109)
- pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acr1a_AsADP1(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 110)
- pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acrM_AsM1] (SEQ ID Nr. 111)
- 15 • pCDF{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 112)
- pCDF{Ptac}[luxCDE_PI(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 113)

Beispiel 18: Chromatografische Quantifizierung von Fettalkoholen und Fettaldehyden

20 Die Quantifizierung von Fettalkoholen und Fettaldehyden erfolgt mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS).

Zur Extraktion der Proben werden diese, bestehend aus 1 ml Kulturbrühe, mit 500 µl Ethylacetat (Chromasolv®Plus 99,9%, Sigma Nr. 650528-1L) versetzt, 10 min bei 12 Hz
25 geschüttelt und 5 min bei 13200 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) sedimentiert. Die organische Phase (Essigsäureethylester) wird in HPLC-Vials mit Insert überführt und mittels GC/MS-Kopplung auf Fettalkohole und Fettaldehyde unterschiedlicher Kettenlänge (C8-C18) analysiert.

Für die Trennung von Fettalkoholen und Fettaldehyden wird die Kapillarsäule ZB-50 mit den
30 Maßen 30 m x 320 µm und einer Filmdicke von 0,5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg) als stationäre Phase eingesetzt. Als Trägergas wird Helium mit einer konstanten Flussrate von 1,5 ml/min verwendet. Die Trennung erfolgt innerhalb von 45 min mit einer Injektortemperatur von

250°C und einer Detektortemperatur von 250°C. Die Säulentemperatur beträgt zu Beginn 40°C und wird für 2 min gehalten. Im Folgenden wird die Säulentemperatur mit 7°C/min auf 150 °C, anschließend mit 15°C/min auf 320°C erhöht und für 10 min gehalten. Das Injektionsvolumen beträgt 1 µl splitlos. Die Detektion erfolgt mittels MS (DSQ II)-Detektor (Thermo Fisher Scientific) mit einem Massenbereich von 12-800 m/z. Als Referenzsubstanz wird ein Standardgemisch, bestehend aus je 10µg/ml 1-Octanal (99%, Sigma-Aldrich), 1-Octanol (Sigma-Aldrich), 1-Decanal (>98%, Sigma-Aldrich), 1-Decanol (>99%, Sigma-Aldrich), 1-Dodecanal (>92%, Sigma-Aldrich), 1-Dodecanol (>98%, Sigma-Aldrich), 1-Tetradecanal, 1-Tetradecanol (>99%, Fluka) , 1-Hexadecanal und 1-Hexadecanol (99%, Sigma-Aldrich) zur Kalibrierung verwendet. Es wird eine relative Quantifizierung der Proben über die Peakflächen vorgenommen.

Beispiel 19: Produktion von Fettalkoholen durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE, welcher die Gene alkL aus Pseudomonas putida GPo1 und fatB2 aus Cuphea hookeriana oder fatB3 aus Cocos nucifera sowie das Gen fadD aus Escherichia coli und ein Acyl-ACP-Reduktase-Gen überexprimiert.

Zur Erzeugung von E.coli-Stämmen mit dem Expressionsvektor für das Gen alkL aus Pseudomonas putida GPo1 und das Gen fadD aus E.coli sowie die Gene acr1a aus Acinetobacter sp. ADP1 oder acr1b aus Acinetobacter sp. ADP1 oder acrM aus Acinetobacter sp. M-1 oder Maqu2220 aus Marinobacterium aquaeolei VT8 oder luxCDE aus Photorhabdus luminescens in Kombination mit dem Expressionsvektor für das Gen fatB2 aus Cuphea hookeriana bzw. fatB3 aus Cocos nucifera wurden elektrokompente Zellen von E.coli W3110 ΔfadE sowie E.coli JW5020-1 Kan^S hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. E.coli JW5020-1 Kan^S ist ein Derivat von E.coli JW5020-1 (CGSC, The coli genetic stock center, Yale University, New Haven, USA), dieser wiederum ein E.coli BW25113-Derivat, der eine Deletion des Gens fadE trägt. Das Gen fadE wurde durch eine Kanamycinkassette ausgetauscht. Diese wurde vor der Ausstattung des Stammes mit den Expressionsvektoren mit Hilfe eines Helferplasmides, welches für flp-Rekombinase codiert, in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise entfernt (siehe Datsenko K.A. und Wanner B.L. (2000) PNAS 97(12):6640-6645) resultierend in Stamm E.coli JW5020-1 Kan^S. E.coli JW5020-1

- 207 -

- Kan^S wurde mit den Plasmiden pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 10) in Kombination mit pCDF{Ptac}[fadD_Ec-*acr1a*_AsADP1(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 110), pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[fadD_Ec-*acr1a*_AsADP1(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 103), pCDF{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 112) oder
- 5 pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 105) sowie *E.coli* W3110 Δ fadE mit den Plasmiden pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 40) in Kombination mit pCDF{Ptac}[fadD_Ec-*acr1b*_AsADP1] (SEQ ID Nr. 109), pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[fadD_Ec-*acr1b*_AsADP1] (SEQ ID Nr. 102), pCDF{Ptac}[fadD_Ec-*acrM*_AsM1] (SEQ ID Nr. 111), pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[fadD_Ec-*acrM*_AsM1] (SEQ ID Nr. 104),
- 10 pCDF{Ptac}[luxCDE_PI(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 113) oder pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[luxCDE_PI(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 106) transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft.
- 15 So wurden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-*acr1a*_AsADP1(co_Ec)]
 - *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[fadD_Ec-*acr1a*_AsADP1(co_Ec)]
 - 20 • *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)]
 - *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Placuv5}[*alkL*]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)]
 - *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-*acrM*_AsM1]
 - 25 • *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[*alkL*][fadD_Ec-*acrM*_AsM1]
 - *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-*acr1b*_AsADP1]

- 208 -

- *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1]
- *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[luxCDE_Pl(co_Ec)]
- *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_Pl(co_Ec)]

Diese Stämme wurden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettalkoholen zu untersuchen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu

- 10 untersuchenden Stämme wurden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Spectinomycin als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgte in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v)
- 15 Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wurde mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM
- 20 Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wurde vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium wurden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer
- 25 Kultivierungsdauer von 8 Stunden wurden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM
- 30 IPTG induziert. Die Stämme wurden weitere 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min kultiviert. Während der Kultivierung werden Proben entnommen und die Konzentration von Fettalkoholen

unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen wie in Beispiel 18 beschrieben quantifiziert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

- 5 Produktion von Fettalkoholen mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 Δ fadE, die eine pflanzliche Acyl-ACP-Thioesterase, *fadD* aus *E.coli* sowie eine Fett Acyl-CoA-Reduktase überexprimieren. Gezeigt sind Stämme mit und ohne Überexpression von *alkL* aus *P.putida* GPo1. Angegeben sind die Konzentrationen von Fettalkohole unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge nach 24 Stunden Kultivierung (n.n. = nicht nachweisbar):

	Decanol [Peakfläche/OD]	Dodecanol [Peakfläche/OD]	Tetradecanol [Peakfläche/OD]	Hexadecanol [Peakfläche/OD]
<i>E.coli</i> W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec- <i>acrM</i> _AsM1(co_Ec)]	n.n.	2,53E+06	9,74E+06	1,39E+07
<i>E.coli</i> W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[<i>alkL</i>]{Ptac}[fadD_Ec- <i>acrM</i> _AsM1(co_Ec)]	n.n.	1,15E+07	2,90E+07	3,01E+07
<i>E.coli</i> W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[<i>luxCDE_PI</i> (co_Ec)]	n.n.	1,42E+06	6,91E+06	n.n.
<i>E.coli</i> W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[<i>alkL</i>]{Ptac}[<i>luxCDE_PI</i> (co_Ec)]	n.n.	3,78E+06	1,77E+07	n.n.
<i>E.coli</i> W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec- <i>acr1b</i> _AsADP1])	n.n.	2,43E+04	1,59E+06	n.n.
<i>E.coli</i> W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[<i>alkL</i>]{Ptac}[fadD_Ec- <i>acr1b</i> _AsADP1])	n.n.	8,65E+05	2,44E+06	n.n.
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec- <i>acr1a</i> _AsADP1(co_Ec)]	4,65E+06	n.n.	3,49E+06	5,63E+06
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Placuv5}[<i>alkL</i>]{Ptac}[fadD_Ec- <i>acr1a</i> _AsADP1(co_Ec)]	1,61E+07	n.n.	4,23E+07	3,45E+07
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220_Ma(co_Ec)]	n.n.	n.n.	5,66E+04.	7,12E+04.
<i>E.coli</i> JW5020-1 Kan ^S pJ294{Ptac}[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Placuv5}[<i>alkL</i>]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220_Ma(co_Ec)]	n.n.	n.n.	6,74E+07	2,48E+08

Somit wurde gezeigt, dass Stämme, die *alkL* aus *P.putida* überexprimieren, in der Lage sind mehr Decanol, Dodecanol, Tetradecanol und Hexadecanol zu bilden als Stämme ohne *alkL*. Dies zeigt, dass eine Verstärkung von *alkL* förderlich für die Herstellung von Fettalkoholen verschiedener Kettenlängen aus nicht verwandten Kohlenstoffquellen ist.

5

Beispiel 20: Herstellung eines Expressionsvektors für das Gen Mmar_3356 aus Mycobacterium marinum

10 Zur Herstellung eines Expressionsvektors für das Gen *Mmar_3356* (SEQ ID Nr. 114) aus *Mycobacterium marinum* wurde das Gen für die Expression in *E.coli* codonoptimiert. Das synthetisierte Gen für die SAM-abhängige Methyltransferase (*E_{va}*) wurde unter Einbringung einer *NdeI*-Schnittstelle stromaufwärts und einer *XbaI*-Schnittstelle stromabwärts amplifiziert. Die Restriktionsschnittstellen wurden über die eingesetzten Oligonukleotide eingebracht.

15

mt_fw_NdeI: 5'- TATATACATATGCCAAGAGAGATTAGATTACC-3' (SEQ ID Nr.119)
mt_rv_XbaI: 5'- TATATATCTAGACTGAGTTAGGCACGTTTCG-3' (SEQ ID Nr. 120)

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98°C, 0:30 min;
20 35 x: Denaturierung, 98°C, 0:10 min, Annealing, 62°C, 0:20 min; Elongation, 72°C, 0:30 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1,5%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-
25 Gel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise.

Das PCR-Fragmente mit der erwarteten Größe von 1133 Basenpaaren konnte amplifiziert werden. Zur Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel extraction Kit* nach Anleitung des
30 Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XbaI* verdaut und wurde in ein entsprechend geschnittenes pJ281-Derivat (SEQ ID Nr. 121), das einen *lacuv5*-Promotor enthält, ligiert. Die

Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wurde durch Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität der eingebrachten Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Der fertiggestellte *E.coli*-Expressionsvektor wurde als

5 pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 116) bezeichnet.

Beispiel 21: Produktion von Fettsäureestern durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE, welche ein pflanzliches Acyl-ACP Thioesterase-Gen, die Gene alkL aus Pseudomonas putida
 10 *GPO1* sowie Mmar_3356 aus *Mycobacterium marinum* überexprimieren.

Zur Erzeugung eines *E.coli*-Stammes mit Expressionsvektoren für die Gene *fatB1* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB2* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB3* aus *Cocos nucifera* oder *synUcTE* aus *Umbellularia californica* in Kombination mit einem Expressionsvektor für das Gen Mmar_3356
 15 aus *Mycobacterium marinum* sowie einem Expressionsvektor für das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* *GPO1* werden elektrokompente Zellen von *E. coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 Δ *fadE* hergestellt. Dies geschieht in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Die Stämme werden sequentiell mit den Vektoren pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] (SEQ ID Nr. 12), pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 10), pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ
 20 ID Nr. 40) bzw. pJ294[Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 41) sowie pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 116) sowie pCDF[*alkL*] (SEQ ID Nr. 7) bzw. pCDFDuet-1 (71340-3, Merck, Darmstadt) transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml), Kanamycin (50 μ g/ml) und Spectinomycin (100 μ g/ml) ausplattiert. Transformanten werden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der
 25 Anwesenheit der korrekten Plasmide überprüft. Auf diese Weise werden folgende Stämme konstruiert:

- *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] /
 pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[*alkL*]
- *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] /
 30 pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDFDuet-1

- 212 -

- *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL]
- *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDFDuet-1
- 5 • *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL]
- *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDFDuet-1
- 10 • *E. coli* W3110 Δ fadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL]
- *E. coli* W3110 Δ fadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDFDuet-1

15 Diese Stämme werden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettsäuremethylestern aus Glucose zu untersuchen. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme werden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) mit 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgt in 20 M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wird mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM 25 Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium steriltfiltriert. 10 ml M9-Medium werden mit 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in

100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane

5 vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme werden mindestens weitere 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min kultiviert. Während der Kultivierung werden Proben entnommen und die

10 Konzentration von Fettsäuremethylestern unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen wie in Beispiel 15 beschrieben quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die Stämme *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL], *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL], *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] /

15 pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL] und *E. coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL] in der Lage sind, abhängig von der Spezifität des überexprimierten Acyl-CoA-Thioesterase-Gens, Fettsäuremethylester unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge und Sättigungsgrades im Vergleich zu den entsprechenden Stämmen, die das Gen *alkL* nicht überexprimieren, zu bilden. Insbesondere

20 kann *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL] mehr Fettsäuremethylester der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL] mehr Fettsäuremethylester der Kettenlänge C8:0 und C10:0, *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] /

25 pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL] mehr Fettsäuremethylester der Kettenlänge C12:0, C14:0 und C16:1 und *E. coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL] mehr Fettsäuremethylester der Kettenlänge C12:0 und C14:0 aus Glucose produzieren als die korrespondierenden Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt.

Beispiel 22: Herstellung eines Expressionsvektors für Coexpression der Gene MSMEG_2956 aus Mycobacterium smegmatis, npt aus Nocardia sp. mit alkL aus Pseudomonas putida

Zur Herstellung eines *E. coli*-Expressionsvektors für die Gene *MSMEG_2956* (SEQ ID Nr. 117)
5 aus *Mycobacterium smegmatis*, *npt* (SEQ ID Nr. 122) aus *Nocardia sp.* und *alkL* (SEQ ID Nr. 1) aus *Pseudomonas putida* GPo1 werden die Gene *MSMEG_2956* und *npt* für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert und synthetisiert. Die synthetisierten Gene werden mittels Rekombinationsklonierung als Operon hinter einen *lacuv5*-Promotor kloniert. *MSMEG_2956* und *npt* werden ausgehend von der synthetischen DNA als Matrize und der Promotor *P_{lacuv5}* aus
10 einem pJ294-Derivat unter Einbringung homologer Bereiche für die Rekombinationsklonierung amplifiziert. Dabei kommen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

Promotorbereich *P_{lacuv5}*:

NP-FA-P22: 5'-CCGGTAGTCAATAAAATCGCACCTGGTGTTTAAACG-3' (SEQ ID Nr. 126)
15 NP-FA-P23: 5'-TGTCATATGCCACTCTCCTTGGTTCC-3' (SEQ ID Nr. 127)

MSMEG_2956(co_Ec) und *npt_Noc*(co_Ec):

NP-FA-P24: 5'-GAGTGGCATATGACAATTGAAACGCGCGAAG-3' (SEQ ID Nr. 128)
NP-FA-P25: 5'-TCTATTGCTGGTTTACCTAGGTTATCATTATCATGC-3' (SEQ ID Nr. 129)
20

Folgende Parameter werden für die PCR eingesetzt: 1x: initiale Denaturierung, 98 °C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98 °C, 0:15 min, Annealing, 60°C, 0:30 min; Elongation, 72 °C, 0:20 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 10 min. Für die Amplifikation wird der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des
25 Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen werden anschließend auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gelelektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen sowie Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgt in dem Fachmann bekannter Art und Weise. Es werden PCR Fragmente von 210 Basenpaaren
30 für den *lacuv5*-Promotorbereich und 4241 Basenpaaren für das DNA-Fragment *MSMEG_2956*(co_Ec)-*npt_Noc*(co_Ec) erwartet. Die aufgereinigten PCR Fragmente werden mittels Rekombination unter Verwendung des Geneart® Seamless Cloning and Assembly Kit

nach Anleitung des Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in den mit der Restriktionsendonuklease *AgeI* verdauten Vektor pCDF[alkL] (SEQ ID Nr. 7) sowie pCDFDuet-1 (71340-3, Merck, Darmstadt) kloniert. Dadurch werden die Vektoren pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 124) und
 5 pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 125) erzeugt. Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH10 β erfolgt nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wird durch Restriktionsanalyse überprüft und die Autentizität des Inserts durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

10

Beispiel 23: Produktion von Fettaldehyden und Fettalkoholen durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE, welche ein pflanzliches Acyl-ACP-Thioesterase-Gen, die Gene alkL aus Pseudomonas putida GPo1 sowie MSMEG_2956 aus Mycobacterium smegmatis und npt aus Nocardia sp. überexprimieren.

15

Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit Expressionsvektoren für die Gene *fatB1* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB2* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB3* aus *Cocos nucifera* oder *synUcTE* aus *Umbellularia californica* in Kombination mit einem Expressionsvektor für die Gene MSMEG_2956 aus *Mycobacterium smegmatis*, *npt* aus *Nocardia sp.* und *alkL* aus

20

Pseudomonas putida GPo1 werden elektrokompente Zellen von *E. coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 Δ *fadE* hergestellt. Dies geschieht in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Die Stämme werden mit den Vektoren pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] (SEQ ID Nr. 12), pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 11), pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 40) bzw. pJ294[Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 41) sowie pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-
 25 npt_Noc(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 124) bzw. pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 128) transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml) und Spectinomycin (100 μ g/ml) ausplattiert. Transformanten werden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Anwesenheit der korrekten Plasmide überprüft. Auf diese Weise werden folgende Stämme konstruiert:

30

- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] /
 pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]

- 216 -

- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- 5 • *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- 10 • *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- 15 • *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]

20 Diese Stämme werden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettalkoholen und Fettaldehyden aus Glucose zu untersuchen. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme werden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Spectinomycin als 5 ml-Vorkultur aus je
 25 einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgt in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v)

- 217 -

Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wird mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium werden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme werden mindestens weitere 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min kultiviert. Während der Kultivierung werden Proben entnommen und die Konzentration von Fettalkoholen und Fettaldehyden unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen wie in Beispiel 18 beschrieben quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] , *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)], *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)], *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] und *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] in der Lage sind, abhängig von der Spezifität des überexprimierten Acyl-CoA-Thioesterase-Gens, Fettalkohole und Fettaldehyde unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge und unterschiedlichen Sättigungsgrades im Vergleich zu den entsprechenden Stämmen, die das Gen *alkL* nicht überexprimieren, zu bilden. Insbesondere kann *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der

- 218 -

Kettenlänge C8:0 und C10:0, *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0, C14:0 und C16:1, *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0, C14:0 und C16:1 und *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0 aus Glucose produzieren als die korrespondierenden Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt.

10

Beispiel 24: Herstellung von Expressionsvektoren für die Coexpression eines Acyl-ACP-Thioesterase-Gens, ald aus Bacillus subtilis und Cv_2025 aus Chromobacterium violaceum.

Zur Herstellung von *E. coli*-Expressionsvektoren für die Gene *fatB1* (SEQ ID Nr. 9) aus *Cuphea hookeriana*, *fatB2* (SEQ ID Nr. 8) aus *Cuphea hookeriana* bzw. *synUcTE* (SEQ ID Nr. 37) aus *Umbellularia californica* (jeweils kodierend für ein Enzym E_i) sowie *ald* (SEQ ID Nr. 130) aus *Bacillus subtilis* (kodierend für ein Enzym E_{xiv}) und *Cv_2025* (SEQ ID Nr. 132) aus *Chromobacterium violaceum* (kodierend für ein Enzym E_{xiii}) werden die Gene *fatB1*, *fatB2* und *synUcTE* für die Expression in *Escherichia coli* codonoptimiert und zusammen mit einem *tac*-Promotor (SEQ ID Nr. 39) synthetisiert. Während der Synthese wird eine Schnittstelle stromaufwärts des Promotors und eine Schnittstelle stromabwärts des Terminators eingeführt. Die synthetisierten DNA-Fragmente werden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pJ294_alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct) (SEQ ID Nr. 121) ligiert. Der hier verwendete Expressionsvektor wurde bereits beschrieben in der Deutschen Patentanmeldung DE102011110946 und dort unter SEQ ID Nr. 17 geführt. Die fertiggestellten Vektoren werden als pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB1_optEc] (SEQ ID Nr. 134), pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID Nr. 135) sowie pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE] (SEQ ID Nr. 136) bezeichnet.

30

Beispiel 25: Produktion von Alkylaminen durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE, welche ein Acyl-CoA-Thioesterase-Gen, die Gene Cv_2025 aus Chromobacterium violaceum sowie

- 219 -

ald aus *Bacillus subtilis*, *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1, *carA* aus *Mycobacterium smegmatis* und *npt* aus *Nocardia* sp. überexprimieren.

- Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit Expressionsvektoren für die Gene *ald* aus *Bacillus subtilis*, *Cv_2025* aus *Chromobacterium violaceum* sowie *fatB1* aus *Cuphea hookeriana*, *fatB2* aus *Cuphea hookeriana*, *synUcTE* aus *Umbellularia californica* in Kombination mit einem Expressionsvektor für die Gene MSMEG_2956 aus *Mycobacterium smegmatis*, *npt* aus *Nocardia* sp. und *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 werden elektrokompente Zellen von *E. coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 Δ fadE hergestellt. Dies geschieht in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Die Stämme werden mit den Vektoren pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB1_optEc*] (SEQ ID Nr. 134), pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB2_optEc*] (SEQ ID Nr. 135) bzw. pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE*] (SEQ ID Nr. 136) in Kombination mit pCDF[*alkL*][MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)] (SEQ ID Nr. 124) bzw. pCDF[MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)] (SEQ ID Nr. 125) transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) und Spectinomycin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten werden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Anwesenheit der korrekten Plasmide überprüft. Auf diese Weise werden folgende Stämme konstruiert:
- *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB1_optEc*] / pCDF[*alkL*][MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)]
 - *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB1_optEc*] / pCDF[MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)]
 - *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB2_optEc*] / pCDF[*alkL*][MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)]
 - *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB2_optEc*] / pCDF[MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)]
 - *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[*alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE*] / pCDF[*alkL*][MSMEG_2956(*co_Ec*)-*npt_Noc*(*co_Ec*)]

- 220 -

- *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE] / pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]

Diese Stämme werden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Alkylaminen aus

5 Glucose zu untersuchen. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme werden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Spectinomycin als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgt in M9-Medium. Das

10 Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wird mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM

15 Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium werden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-

20 Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die

25 Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme werden mindestens weitere 24 Stunden bei 30°C und 200 U/min kultiviert. Während der Kultivierung werden Proben entnommen und die Konzentration von Fettaldehyden unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die

30 Stämme *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)], *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-

npt_Noc(co_Ec)] und *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] in der Lage sind, abhängig von der Spezifität des überexprimierten Alkyl-CoA-Thioesterase-Gens, Alkylamine unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge und unterschiedlichen Sättigungsgrades im Vergleich zu den
 5 entsprechenden Stämmen, die das Gen *alkL* nicht überexprimieren, zu bilden. Insbesondere kann *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Alkylamine der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E.coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Alkylamine der
 10 Kettenlänge C8:0 und C10:0 und *E.coli* W3110 Δ fadE pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] mehr Alkylamine der Kettenlänge C12:0 und C14:0 aus Glucose produzieren als die korrespondierenden Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt.

15

Beispiel 26: Herstellung von E. coli-Expressionsvektoren für die Expression verschiedener Acyl-CoA Reduktasen zur Herstellung von Fettalkoholen und Fettaldehyden

20 Das Gen *Maqu_2220* (SEQ ID NO. 137) aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 oder *Maqu_2507* (SEQ ID NO. 139) aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 oder *AtFAR6* (SEQ ID NO. 141) aus *Arabidopsis thaliana* oder *AcrM* (SEQ ID NO. 143) aus *Acinetobacter* sp. M-1 oder *Acr1a* (SEQ ID NO. 145) aus *Acinetobacter* sp. ADP1 oder *Acr1b* (SEQ ID NO. 147) aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (jeweils kodierend für ein Enzym E_x) wurde in ein pJ294-Derivat (DNA2.0 Inc., Menlo
 25 Park, CA, USA) hinter den *P_{lac}*-Promotor (SEQ ID NO. 149) über die Schnittstellen *NdeI* und *NotI* kloniert.

Bei den Genen *Maqu_2220*, *Maqu_2507*, *AtFAR6*, *AcrM* und *Acr1a* handelt es sich um codonoptimierte Sequenzen für *E. coli*. Bei dem Gen *Acr1b* handelt es sich um die Wildtyp-Sequenz. Alle Codonoptimierungen wurden bei der Firma DNA2.0 (DNA2.0 Inc., Menlo Park,
 30 CA, USA) durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden in einem DNA2.0 eigenem Vektor erhalten.

- 222 -

Die Gene *Maqu_2220*, *Maqu_2507*, *AtFAR6* und *AcrM* wurden unter Einbringung der Restriktionsschnittstellen *NdeI* (am 5' Ende des jeweiligen Gens) und *NotI* (am 3' Ende des jeweiligen Gens) wie im folgenden beschrieben mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrizen wurden die Vektoren der Firma DNA2.0 (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA) pJ221[*Maqu_2220*(co_ec)], pJ207[*Maqu_2507*(co_Ec)], pJ201[*AtFAR6*(co_Ec)] und pJ221[*AcrM*(AsM1)] verwendet.

Folgende Oligonukleotide wurden in den PCR-Ansätzen verwendet:

Gen	Primer	Sequenz (5' => 3')	Seq ID Nr.
<i>Maqu_2220</i>	Pr-DesFA-1-FW	TATATACATATGGCAATTCAGCAGGTACATCACG	150
	Pr-DesFA-1-RV	TATATAGCGGCCGCTCATTACGCGGCCTTTTGC	151
<i>Maqu_2507</i>	Pr-DesFA-2-FW	TATATACATATGAACCTATTTCTTACAGCGGTACAGG	152
	Pr-DesFA-2-RV	TATATAGCGGCCGCTTATTACCAGTAAATACCACGCATAATTGC	153
<i>AtFAR6</i>	Pr-DesFA-3-FW	TATATACATATGGCGACGACGAATGTACTGGC	154
	Pr-DesFA-3-RV	TATATAGCGGCCGCTTATTACTCGGTTTTCTTCTTGCTCAGG	155
<i>AcrM</i>	Pr-DesFA-5-FW	TATATACATATGAATGCAAACTCAAAAACTTTTTCAGC	156
	Pr-DesFA-5-RV	TATATAGCGGCCGCTTATTACCAGTGTTTCGCCTGGG	157

Folgende Parameter wurden für die PCRs eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98 °C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98 °C, 0:30 min, Annealing, 50°C (*Maqu_2220*) / 60°C (*Maqu_2507*, *AcrM*, *AtFAR6*), 0:20 min; Elongation, 72 °C, 0:35 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 5 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1,0 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarosegel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in der dem Fachmann bekannten Art und Weise.

Die Gene *Acr1a* und *Acr1b* aus *Acinetobacter* sp. ADP1 wurden über in-vitro Klonierung mit dem „GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit“ (Cat.No. A13288, Life Technologies GmbH, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers kloniert. Hierfür wurden beide Gene unter Einbringung homologer Bereiche zur Rekombinationsklonierung mittels PCR amplifiziert. Als Matrizen wurde der DNA2.0-Vektor pJ221[*Acr1a*_AsADP1(co_Ec)] und der Vektor pCDF{Ptac}[*fadD_Ec-acr1b*_AsADP1] (SEQ ID Nr. 109) verwendet.

Folgende Oligonukleotide wurden in den PCR-Ansätzen verwendet:

Gen	Primer	Sequenz (5' => 3')	Seq ID Nr.
-----	--------	--------------------	------------

<i>Acr1a</i>	Pr-FA_4.1-FW	AACAGGAGGTAAAACATTGATCTCGATCCGTGAAAAACGT	158
	Pr-FA_4.1-RV	TGAAGTGGGGGCGGCCTTATCACCAGTGCTCACCCGGGAA	159
<i>Acr1b</i>	Pr-DesFA_4.2-FW	AACAGGAGGTAAAACAGTGAACAAAAAACTTGAAGCTCTC	160
	Pr-DesFA_4.2-RV	TGAAGTGGGGGCGGCCTTATTACCAGTGTTGCCTGGGAA	161

Folgende Parameter wurden für die PCRs eingesetzt: 1 x: initiale Denaturierung, 98 °C, 0:30 min; 35 x: Denaturierung, 98 °C, 0:30 min, Annealing, 64 °C, 0:20 min; Elongation, 72 °C, 0:15 min; 1 x: terminale Elongation, 72 °C, 5 min. Für die Amplifikation wurde der Phusion™

5 High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarosegel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in der dem Fachmann bekannten Art und Weise.

10 In allen Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden. Diese betrugen für *Maqu_2220* 1568 Basenpaare (bp), für *Maqu_2507* 2012bp, für *AtFAR6* 1673bp, für *AcrM* 914bp, für *Acr1a* 947bp und für *Acr1b* 923 Basenpaare.

Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem „Quick Gel Extraktion Kit“ von Qiagen (Hilden) aufgereinigt.

15 Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte von *Maqu_2220*, *Maqu_2507*, *AtFAR6* und *AcrM* ebenso wie das pJ294-Derivat (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA) mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *NotI* (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers geschnitten. Der geschnittene Vektor wurde anschließend auf ein 1% iges

20 Agarosegel aufgetragen. Die Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte in der dem Fachmann bekannten Art und Weise. Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wurde die

- 224 -

Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem „Quick Gel Extraktion Kit“ von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die *NdeI*-*NotI* geschnittenen PCR-Amplifikate *Maqu_2220*, *Maqu_2507*, *AtFAR6* und *AcrM* jeweils mit dem *NdeI*-*NotI* geschnittenen Vektor über die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers unter Erhalt der resultierenden Vektoren ligiert.

Die PCR-Produkte von *Acr1a* und *Acr1b* aus *Acinetobacter* sp. ADP1 wurden zusammen mit dem *NdeI*-*NotI*-geschnittenen pJ294-Derivat mittels *in-vitro* Klonierung unter Verwendung des „GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit“ (Cat.No. A13288, Life Technologies GmbH, Darmstadt) unter Erhalt der resultierenden Vektoren rekombiniert. Die Verwendung entsprach den Empfehlungen des Herstellers.

Der Vektor pJ294 ist ein *E. coli*-Expressionsvektor, der dem Organismus eine Ampicillin-Resistenz vermittelt sowie einen p15A-Replikationsursprung trägt. Stromaufwärts der Schnittstelle *NdeI* befindet sich ein *P_{lac}*-Promotor. Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte in der dem Fachmann bekannten Art und Weise.

Die Richtigkeit des jeweiligen Plasmids wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *NruI* kontrolliert. Die Authentizität der inserierten Fragmente wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Die fertiggestellten *E. coli*-Expressionsvektoren wurden wie folgt bezeichnet:

Vektorbezeichnung	Vektor	Gen	SEQ ID NO.
pHg-12-58	pJ294	<i>Maqu_2220</i>	162
pHg-12-59	pJ294	<i>Maqu_2507</i>	163
pHg-12-60	pJ294	<i>AtFAR6</i>	164
pHg-12-61	pJ294	<i>AcrM</i>	165
pHg-12-62	pJ294	<i>Acr1a</i>	166
pHg-12-63	pJ294	<i>Acr1b</i>	167

Beispiel 27: Produktion von Fettalkoholen und Fettaldehyden durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE und Expressionsvektoren für die Gene Maqu_2220 aus Marinobacter aquaeolei VT8, Maqu_2507 aus Marinobacter aquaeolei VT8, AtFAR6 aus Arabidopsis thaliana, AcrM aus Acinetobacter sp. M-1, Acr1 aus Acinetobacter sp. ADP1 oder Acr1 aus Acinetobacter

calcoaceticus in Kombination mit einem Expressionsvektor für das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida*.

Zunächst wird ein *E.coli* W3110-Stamm mit Deletion im Gen *fadE* wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt.

Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit dem Expressionsvektor für das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 in Kombination mit dem Expressionsvektor für das Gen *Maqu_2220* aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 oder *Maqu_2507* aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 oder *AtFAR6* aus *Arabidopsis thaliana* oder *AcrM* aus *Acinetobacter sp.* M-1 oder *Acr1* aus *Acinetobacter sp.* ADP1 oder *Acr1* aus *Acinetobacter calcoaceticus* werden elektrokompente Zellen von *E. coli* W3110 Δ *fadE* und *E. coli* JW5020-1 Kan^S hergestellt. Dies geschieht in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Der Wirtsstamm *E. coli* JW5020-1 Kan^S ist ein Abkömmling des *E. coli* JW5020-1 (CSGC, The coli genetic stock center, Yale University, New Haven, USA) und ist ein *E. coli* BW25113-Derivat, der eine Deletion des Gens *fadE* trägt. Das Gen *fadE* wurde durch eine Kanamycinkassette ausgetauscht. Diese wurde vor der Ausstattung des Stammes mit den Expressionsvektoren mit Hilfe eines Helferplasmides, welches für die FLP-Rekombinase codiert, in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise entfernt (siehe Datsenko K.A. and Wanner B.L. (2000) PNAS 97(12):6640-6645), resultierend in Stamm *E. coli* JW5020-1 Kan^S.

Die kompetenten Zellen wurden mit den Plasmiden pCDFDuet-1 oder pCDF[*alkL*] in Kombination mit pHg-12-58 oder pHg-12-59 oder pHg-12-60 oder pHg-12-61 oder pHg-12-62 oder pHg-12-63 transformiert und auf LB-Platten mit Spectinomycin (100 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft.

So wurden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[*alkL*] / pHg-12-58
- *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[*alkL*] / pHg-12-59
- *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[*alkL*] / pHg-12-60
- *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[*alkL*] / pHg-12-61
- *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[*alkL*] / pHg-12-62
- *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[*alkL*] / pHg-12-63

- 226 -

- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-58
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-59
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-60
- 5 • *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-61
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-62
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-63

- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL] / pHg-12-58
- 10 • *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL] / pHg-12-59
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL] / pHg-12-60
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL] / pHg-12-61
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL] / pHg-12-62
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL] / pHg-12-63

- 15 • *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-58
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-59
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-60
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-61
- 20 • *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-62
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDFDuet-1 / pHg-12-63

Diese Stämme werden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Fettalkoholen und Fettaldehyden aus Glucose zu untersuchen. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

- 25 Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme werden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgt in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM

Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wird mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat,

5 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium werden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane

10 vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min

15 in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme werden weitere 48 Stunden bei 30°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler kultiviert. Während der Kultivierung werden Proben von 1 ml entnommen und die Konzentration von Fettalkoholen und Fettaldehyden unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen mit der in Beispiel 18 beschriebenen

20 Methode quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-58, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-61, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-62, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-63 sowie die Stämme *E. coli* JW5020-1 Kan^s Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-58, *E. coli* JW5020-1 Kan^s Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59, *E. coli* JW5020-1 Kan^s Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60, *E. coli* JW5020-1 Kan^s Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-61, *E. coli* JW5020-1 Kan^s Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-62 und *E. coli* JW5020-1 Kan^s Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-63 höhere Titer an Fettalkoholen und Fettaldehyden unterschiedlicher Kettenlänge aus Glucose produzieren können, als die Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt. Insbesondere kann *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-

30 58 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E.coli* W3110 Δ *fadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60 mehr Fettalkohole und

Fettaldehyde der Kettenlänge C16:0 und C16:1, *E. coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-61 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C8:0 und C10:0, *E. coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-62 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0, *E. coli* W3110 $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-63 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0, *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-58 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-59 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-60 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-61 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C8:0 und C10:0, *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-62 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0 und *E. coli* JW5020-1 Kan^s $\Delta fadE$ pCDF[alkL]/pHg-12-63 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0 aus Glucose produzieren als die korrespondierenden Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt.

15

Beispiel 28: Herstellung von E. coli-Expressionsvektoren für das Gen oleT_{JE} aus Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456 zur Herstellung von Alkenen

Zur Herstellung von Expressionsvektoren wurde die Sequenz des Gens *oleT_{JE}* (SEQ ID NO. 168) aus *Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456* (kodierend für ein Enzym E_{xi}) für die Expression in *E. coli* bei DNA2.0 (DNA2.0 Inc., Menlo Park, CA, USA) codonoptimiert und in Kombination mit dem *P_{lac}*-Promotor (SEQ ID NO. 149) oder dem *P_{lac}*-Promotor und dem Gen *alkL* (SEQ ID NO. 1) synthetisiert. Die Klonierung der Konstrukte *P_{lac}-oleT_{JE}* (SEQ ID NO. 170) und *P_{lac}-oleT_{JE}-alkL* (SEQ ID NO. 171) erfolgte in DNA2.0 eigene Vektoren. Beide Konstrukte werden durch eine Terminatorsequenz (SEQ ID NO. 172) terminiert. Zusätzlich wurde stromaufwärts des *P_{lac}*-Promotors sowie stromabwärts des Terminators jeweils eine Schnittstelle (*Eco*NI bzw. *Not*I) eingefügt.

Die synthetisierten DNA-Fragmente *P_{lac}-oleT_{JE}* und *P_{lac}-oleT_{JE}-alkL* sowie der Vektor pCDFDuet-1 (Merck, Darmstadt) (SEQ ID NO 53) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*NI und *Not*I (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers geschnitten. Die *Nde*I-*Not*I-geschnittenen Konstrukte und der geschnittene Vektor wurden anschließend auf

30

ein 1% iges Agarosegel aufgetragen. Die Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte in der dem Fachmann bekannten Art und Weise. Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wurde die Ziel-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem „Quick Gel Extraktion
 5 Kit“ von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Anschließend wurde das Fragment $P_{lac-oleT_{JE}}$ oder $P_{lac-oleT_{JE}}-alkL$ in den Vektor pCDFDuet-1 Vektor über die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers unter Erhalt der resultierenden Vektoren ligiert.

10 Der Vektor pCDFDuet-1 ist ein *E. coli*-Vektor, der dem Organismus eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz vermittelt sowie einen ColDF13 Replikationsursprung trägt. Die Transformationen chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgten in der dem Fachmann bekannten Art und Weise.

Die Richtigkeit des jeweiligen Plasmids wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *EcoRV*
 15 kontrolliert. Die Authentizität der inserierten Fragmente wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Die fertiggestellten *E.coli*-Expressionsvektoren wurden als pHg-12-66 (pCDF[$P_{lac-oleT_{JE}}$]; SEQ ID NO 173) und pHg-12-67 (pCDF[$P_{lac-oleT_{JE}}-alkL$]; SEQ ID NO 174) bezeichnet.

20

Beispiel 29: Produktion von Alkenen durch E.coli-Stämme mit Deletion im Gen fadE und Expressionsvektoren für die Gene fatB1 aus Cuphea hookeriana, fatB2 aus Cuphea hookeriana, fatB3 aus Cocos nucifera, synUcTE aus Umbellularia californica in Kombination mit Expressionsvektoren für das Gen oleT_{JE} aus Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456 und alkL aus
 25 *Pseudomonas putida.*

Zunächst wird ein *E.coli* W3110-Stamm mit Deletion im Gen *fadE* wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt.

Zur Erzeugung von *E.coli*-Stämmen mit den Expressionsvektoren für die Gene *fatB1* aus
 30 *Cuphea palustris* oder *fatB2* aus *Cuphea palustris* oder *fatB3* aus *Cocos nucifera* oder *synUcTE* aus *Umbellularia californica* in Kombination mit den Expressionsvektoren für das Gen *oleT_{JE}* aus *Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456 oder die Gene *oleT_{JE}* aus *Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456 und

- 230 -

alkL aus *Pseudomonas putida* werden elektrokompetente Zellen von *E. coli* W3110 $\Delta fadE$ und *E. coli* JW5020-1 Kan^s hergestellt. Dies geschieht in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Der Wirtstamm *E. coli* JW5020-1 Kan^s ist ein Abkömmling des *E. coli* JW5020-1 (CSGC, The coli genetic stock center, Yale University, New Haven, USA) und ist ein *E. coli* BW25113-Derivat, der eine Deletion des Gens *fadE* trägt. Das Gen *fadE* wurde durch eine Kanamycinkassette ausgetauscht. Diese wurde vor der Ausstattung des Stammes mit den Expressionsvektoren mit Hilfe eines Helferplasmides, welches für die Flp-Rekombinase codiert, in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise entfernt (siehe Datsenko K.A. and Wanner B.L. (2000) PNAS 97(12):6640-6645), resultierend in Stamm *E. coli* JW5020-1 Kan^s.

- 10 Die kompetenten Zellen wurden mit den Plasmiden pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] oder pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] oder pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] oder pJ294[Ptac-synUcTE] in Kombination mit pHg-12-66 oder pHg-12-67 transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) und Spectinomycin (100 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten
- 15 Plasmide überprüft.

So wurden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-66
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-67
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-66
- 20 • *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-67
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pHg-12-66
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pHg-12-67
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-CnFATB3_optEc] / pHg-12-66
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-CnFATB3_optEc] / pHg-12-67
- 25 • *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pJ294[Ptac-synUcTE] / pHg-12-66
- *E.coli* W3110 $\Delta fadE$ pJ294[Ptac-synUcTE] / pHg-12-67

Diese Stämme werden verwendet, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Alkenen über die Herstellung von Fettsäuren aus Glucose zu untersuchen. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Die Stämme werden einem mehrstufigen aeroben Kultivierungsprozess unterzogen. Die zu untersuchenden Stämme werden zunächst in Luria-Bertani Bouillon nach Miller (Merck, Darmstadt) als 5 ml-Vorkultur aus je einer Einzelkolonie angezogen. Der nächste Kultivierungsschritt erfolgt in M9-Medium. Das Medium, bestehend aus 38 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 22 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8,6 mM Natriumchlorid, 37 mM Ammoniumchlorid, 2% (w/v) Glucose, 2 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) und 0,1% (v/v) Spurenelemente-Lösung, wird mit 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die zugegebene Spurenelemente-Lösung bestehend aus 9,7 mM Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat, 6,5 mM Zinksulfat-Heptahydrat, 2,5 mM Natrium-EDTA (Titriplex III), 4,9 mM Borsäure, 1 mM Natriummolybdat-Dihydrat, 32 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 64 mM Eisen(II)sulfat-Heptahydrat und 0,9 mM Kupfer(II)chlorid-Dihydrat gelöst in 1M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltriert. 10 ml M9-Medium werden mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit 0,5 ml aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden werden 50 ml M9-Medium mit 100 µg/ml Spectinomycin und 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt und mit der 10 ml-Kultur inokuliert, so dass eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 erreicht wird. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler. Bei Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,6 bis 0,8 wird die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Stämme werden weitere 48 Stunden bei 30°C und 200 U/min in einem Inkubationsschüttler kultiviert. Während der Kultivierung werden Proben von 1 ml entnommen und die Konzentration von freien Fettsäuren und Alkenen unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen mit der in Beispiel 30 beschriebenen Methode quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 Δ *fadE* pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]/pHg-12-67, *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]/pHg-12-67, *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]/pHg-12-67, *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-CnFATB3_optEc]/pHg-12-67 und *E.coli* W3110 Δ *fadE* pJ294[Ptac-synUcTE]/pHg-12-67 höhere Titer an Alkenen unterschiedlicher Kettenlänge aus Glucose produzieren können, als die Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt. Insbesondere kann *E.coli* W3110 Δ *fadE* pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]/pHg-12-67 mehr 1-Alkene der Kettenlänge C13 und C15 sowie 1,8-Diene der Kettenlänge C15, *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-

ChFATB1_optEc]/pHg-12-67 mehr 1-Alkene der Kettenlänge C13 und C15 sowie 1,8-Diene der Kettenlänge C15, *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]/pHg-12-67 mehr 1-Alkene der Kettenlänge C7 und C9, *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-CnFATB3_optEc]/pHg-12-67 mehr 1-Alkene der Kettenlänge C11 und C13 sowie 1,8-Diene der Kettenlänge C15 und
5 *E. coli* W3110 Δ fadE pJ294[Ptac-synUcTE]/pHg-12-67 mehr 1-Alkene der Kettenlänge C11 und C13 aus Glucose produzieren als die korrespondierenden Stämme, denen das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida* GPo1 fehlt.

10 *Beispiel 30: Chromatografische Quantifizierung von Alkenen*

Die Quantifizierung von Alkenen erfolgt mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS).

Zur Extraktion der Proben werden diese, bestehend aus 1 ml Kulturbrühe, mit 500 µl
15 Ethylacetat (Chromasolv®Plus 99,9%, Sigma Nr. 650528-1L) versetzt, 10 min bei 12 Hz geschüttelt und 5 min bei 13200 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) sedimentiert. Die organische Phase (Essigsäureethylester) wird in HPLC-Vials mit Insert überführt und mittels GC/MS-Kopplung auf Alkene unterschiedlicher Kettenlänge (C8-C18) analysiert.

20 Für die Trennung von Alkenen wird die Kapillarsäule ZB-50 mit den Maßen 30 m x 320 µm und einer Filmdicke von 0,5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg) als stationäre Phase eingesetzt. Als Trägergas wird Helium mit einer konstanten Flussrate von 1,5 ml/min verwendet. Die Trennung erfolgt innerhalb von 45 min mit einer Injektortemperatur von 250°C und einer Detektortemperatur von 250°C. Die Säulentemperatur beträgt zu Beginn 40°C und wird für 2
25 min gehalten. Im Folgenden wird die Säulentemperatur mit 7°C/min auf 150 °C, anschließend mit 15°C/min auf 320°C erhöht und für 10 min gehalten. Das Injektionsvolumen beträgt 1 µl splitlos. Die Detektion erfolgt mittels MS (DSQ II)-Detektor (Thermo Fisher Scientific) mit einem Massenbereich von 12-800m/z (0-8min SIM auf m/z 55,97). Als Referenzsubstanz für die Alkene wird ein Standardgemisch, bestehend aus je 10µg/ml 1-Octen (Sigma-Aldrich), 1-Decen
30 (94%, Sigma-Aldrich), 1-Dodecen (>99%, Sigma-Aldrich), 1-Tetradecen (>97%, Sigma-Aldrich), 1-Hexadecen (99,9%, Sigma-Aldrich), 1-Octadecen (Sigma-Aldrich) zur Kalibrierung verwendet. Es wird eine relative Quantifizierung der Proben über die Peakflächen vorgenommen.

Ansprüche

1. Mikroorganismus, der eine erste gentechnische Modifikation aufweist, so dass er
verglichen zu seinem Wildtyp mehr organische Substanz aus mindestens einer einfachen
Kohlenstoffquelle zu bilden vermag,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Mikroorganismus eine zweite gentechnische Modifikation aufweist, so dass er
verglichen zu seinem Wildtyp mehr alkL-Genprodukt bildet.
2. Mikroorganismus gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die organische
Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend
Carbonsäuren, insbesondere mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen
Carbonsäureester, insbesondere mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen im Carbonsäureanteil,
bei denen die Alkoholkomponente sich ableitet von Methanol, Ethanol oder anderen
primären Alkoholen mit 3 – 18 Kohlenstoffatomen,
Alkane mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen,
Alkene mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen,
einwertige Alkohole mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen,
Aldehyde mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen,
einwertige Amine mit 3 bis 34 Kohlenstoffatomen,
sowie substituierte Verbindungen der vorgenannten Gruppenmitglieder, die insbesondere
als weitere Substituenten einen oder mehrer Hydroxy-, Amin-, Keto-, Carboxyl-, Methyl-,
Ethyl-, Cyclopropyl- oder Epoxy-Funktionen tragen.
3. Mikroorganismus gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die
organische Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe der Fettsäuren, Fettsäureester,
Alkan-1-ale, Alkan-1-ole und Alkan-1-amine, Alkane und Alkene, insbesondere 1-Alkene.
4. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, dass das alkL-Genprodukt kodiert wird von alkL-Genen aus gram-
negativen Bakterien, insbesondere der Gruppe enthaltend, bevorzugt bestehend aus
Pseudomonas sp., *Azotobacter* sp., *Desulfibacterium* sp., *Burkholderia* sp., bevorzugt

- 234 -

Burkholderia cepacia, *Xanthomonas* sp., *Rhodobacter* sp., *Ralstonia* sp., *Delftia* sp. und *Rickettsia* sp., *Oceanicaulis* sp., *Caulobacter* sp., *Marinobacter* sp. und *Rhodopseudomonas* sp., bevorzugt *Pseudomonas putida*, *Oceanicaulis alexandrii*, *Marinobacter aquaeolei*, insbesondere *Pseudomonas putida* GPo1 und P1, *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633, *Caulobacter* sp. K31 und *Marinobacter aquaeolei* VT8.

5. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das alkL-Genprodukt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteine kodiert durch SEQ ID NR. 1 und SEQ ID NR. 3 und Proteine mit Polypeptidsequenz SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 30, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 und SEQ ID NR. 33 und Proteine mit einer Polypeptidsequenz bei der bis zu 60% der Aminosäurereste gegenüber SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 30, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 durch Deletion, Insertion, Substitution oder eine Kombination davon verändert sind und die noch mindestens 50% der Aktivität des Proteins mit der jeweiligen Bezugssequenz SEQ ID NR. 2, Nr. 30, SEQ ID NR. 31, SEQ ID NR. 32 oder SEQ ID NR. 33 besitzen.
6. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er ausgewählt ist aus der Gruppe der gram-negativen Bakterien.
7. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ersten gentechnischen Modifikation um eine verglichen zu der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme handelt, ausgewählt aus der Gruppe
 - E_i Acyl-ACP-Thioesterase, bevorzugt der EC 3.1.2.14 oder EC 3.1.2.22,
 - E_{ii} Acyl-CoA-Thioesterase, bevorzugt der EC 3.1.2.2, EC 3.1.2.18, EC 3.1.2.19, EC 3.1.2.20 oder EC 3.1.2.22,
 - E_{iib} Acyl-CoA:ACP-Transacylase,
 - E_{iii} Polyketidsynthase, welche eine Reaktion katalysiert, die an der Synthese von Carbonsäuren und Carbonsäure-Estern mitwirkt, und
 - E_{iv} Hexansäuresynthase.

8. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er eine dritte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_{iib} , E_v , E_{vi} oder E_{vii} ausgewählt aus der

Gruppe

E_{iib} Acyl-CoA:ACP-Transacylase,

E_v Wachsester-Synthase oder Alkohol-O-Acyltransferase, bevorzugt der EC 2.3.1.75 oder EC 2.3.1.84,

E_{va} Fettsäure-O-Methyltransferase, bevorzugt der EC 2.1.1.15, welche die Synthese eines Fettsäuremethylesters aus einer Fettsäure und S-Adenosylmethionin katalysiert,

E_{vi} Acyl-CoA-Synthetase, bevorzugt der EC 6.2.1.3, und

E_{vii} Acyl-Thioesterase, bevorzugt der EC 3.1.2.2, EC 3.1.2.4, EC 3.1.2.18, EC 3.1.2.19, EC 3.1.2.20 oder EC 3.1.2.22,

umfasst.

9. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er eine vierte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines der Enzyme E_{iib} , E_v , E_{vi} oder E_{vii} ausgewählt aus der Gruppe

E_{iib} Acyl-CoA:ACP-Transacylase,

E_{vi} Acyl-CoA-Synthetase, bevorzugt der EC 6.2.1.3,

E_{viii} Acyl-CoA-Reduktase, bevorzugt der EC 1.2.1.42 oder EC 1.2.1.50,

E_{ix} Fettsäurereduktase, bevorzugt der EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.20 oder EC 1.2.1.48,

E_x Acyl-ACP-Reduktase, bevorzugt der EC 1.2.1.80,

E_{xi} Cytochrom P450 Fettsäuredecarboxylase, welche die Umsetzung einer Alkansäure mit n Kohlenstoffatomen zu einem entsprechenden terminalen Olefin mit n-1 Kohlenstoffatomen, insbesondere von Dodecansäure zu Undec-10-en-Säure katalysiert,

E_{xii} Alkan-1-al-Decarbonylase, welche die Umsetzung eines Alkan-1-als (n Kohlenstoffatome) zu einem entsprechenden Alkan (n-1 Kohlenstoffatome) bzw. terminalen Olefin (n-1 Kohlenstoffatome) katalysiert, und

E_{xiii} Alkan-1-al-Transaminase, welche die Umsetzung eines Alkan-1-als zu einem entsprechenden Alkan-1-amin katalysiert.
umfasst.

10. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er neben der ersten und zweiten gentechnischen Modifikation eine fünfte gentechnische Modifikation enthält, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtyps des Mikroorganismus verminderten Aktivität mindestens eines der Enzyme, ausgewählt aus der Gruppe

E_a Acyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.3), welche die Synthese eines Acyl-Coenzym A-Thioesters katalysiert,

E_b Acyl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.3.99.-, EC 1.3.99.3, EC 1.3.99.13), welche die Oxidation eines Acyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden Enoyl-Coenzym A-Thioester katalysiert,

E_c Acyl-CoA-Oxidase (EC 1.3.3.6), welche die Oxidation eines Acyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden Enoyl-Coenzym A-Thioester katalysiert,

E_d Enoyl-CoA-Hydratase (EC 4.2.1.17, EC 4.2.1.74), welche die Hydratisierung eines Enoyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden 3-Hydroxyacyl-Coenzym A-Thioester katalysiert,

E_f 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.1.1.35, EC 1.1.1.211), welche die Oxidation eines 3-Hydroxyacyl-Coenzym A-Thioesters zum entsprechenden 3-Oxoacyl-Coenzym A-Thioester katalysiert und

E_g Acetyl-CoA-Acyltransferase (EC 2.3.1.16), welche den Transfer eines Acetylrestes von einem 3-Oxoacyl-Coenzym A-Thioester auf Coenzyme A katalysiert und somit ein um zwei Kohlenstoffatome verkürzten Acyl-Coenzym A-Thioester erzeugt, aufweist.

11. Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er eine siebte gentechnische Veränderung umfassend eine

- 237 -

verglichen zu seinem Wildtyp verminderte Aktivität mindestens eines Enzyms E₁, ausgewählt aus der Gruppe

E₁ P450 Alkanhydroxylasen,

E_{1b} AlkB Alkanhydroxylasen der EC 1.14.15.3,

5 E_{1c} Fettalkoholoxidasen der EC 1.1.3.20,

E_{1d} AlkJ Alkoholdehydrogenasen der EC 1.1.99.-,

E_{1e} Alkoholdehydrogenase der EC 1.1.1.1 oder EC 1.1.1.2 und

E_{1f} Aldehyddehydrogenasen der EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 oder EC 1.2.1.5 aufweist.

10

12. Verwendung eines Mikroorganismus gemäß mindestens einem der vorherigen Ansprüche zur Herstellung von organischen Substanzen, insbesondere von Fettsäuren, Fettsäureestern, Alkan-1-alen, Alkan-1-olen und Alkan-1-aminen, Alken-1-alen, Alken-1-olen, Alken-1-aminen, Alkanen und Alkenen, insbesondere 1-Alkenen, welche
15 gegebenenfalls eine weitere Doppelbindung aufweisen können.

15

13. Verfahren zur Herstellung einer organischen Substanz, bevorzugt Fettsäuren, Fettsäureestern, Alkan-1-alen, Alkan-1-olen und Alkan-1-aminen, Alken-1-alen, Alken-1-olen, Alken-1-aminen, Alkanen und Alkenen, insbesondere 1-Alkenen, welche
20 gegebenenfalls eine weitere Doppelbindung aufweisen können, aus einer einfachen Kohlenstoffquelle umfassend die Verfahrensschritte
- I) in Kontakt Bringen eines Mikroorganismus gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einem Medium beinhaltend die einfache Kohlenstoffquelle,
- II) Kultivieren des Mikroorganismus unter Bedingungen, die es dem Mikroorganismus
25 ermöglichen aus der einfachen Kohlenstoffquelle die organischen Substanz zu bilden und
- III) gegebenenfalls Isolierung der gebildeten organischen Substanz.

20

25