(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Februar 2013 (21.02.2013)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/024111 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/21 (2006.01) *C12P 7/62* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/065933

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. August 2012 (15.08.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 110 945.9
15. August 2011 (15.08.2011) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **EVONIK DEGUSSA GMBH** [DE/DE]; Rellinghauser Straße 1-11, 45128 Essen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **SCHAFFER, Steffen** [DE/DE]; Antoniusstrasse 19, 45699 Herten (DE). **GIELEN, Jasmin** [DE/DE]; Hattinger Str. 943, 44879 Bochum (DE). **DECKER, Nicole** [DE/DE]; Schubertstraße 21, 45657 Recklinghausen (DE). **KIRCHNER, Nicole** [DE/DE]; Sachsenstraße 28, 45665 Recklinghausen (DE). **HAAS, Thomas** [DE/DE]; Backenkamp 9, 48161 Münster (DE). **PÖTTER, Markus** [DE/DE]; Gemenweg 45, 48149 Münster (DE). **HÄGER, Harald** [DE/DE]; Am Dorn 11, 59348 Lüdinghausen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

(54) Title: BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS PROCESS OF ORGANIC COMPOUNDS WITH THE AID OF AN ALKL GENE PRODUCT

(54) Bezeichnung : BIOTECHNOLOGISCHES SYNTHESEVERFAHREN VON ORGANISCHEN VERBINDUNGEN MIT ALKL-GENPRODUKT

(57) Abstract: The invention relates to a biotechnological process for the preparation of organic compounds with the aid of at least one alkL gene product.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von organischen Verbindungen unter Zuhilfenahme mindestens eines alkL-Genproduktes.

WO 2013/024111 A1

Biotechnologisches Syntheseverfahren von organischen Verbindungen mit alkL-Genprodukt

Gebiet der Erfindung

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

Stand der Technik

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 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 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 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, in der Entwicklung befinden, sind die erreichten Ausbeuten für eine sinnvolle kommerzielle Nutzung zu gering.

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

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.

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.

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.
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.

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.

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.

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

Undecylensäure, Myristoleinsäure, Palmitoleinsäure, Petroselinsäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Vaccensäure, Gadoleinsäure, Icosensäure, Cetoleinsäure, Erucasäure, Nervonsäure, Pelargonsäure, Linolsäure, α-Linolensäure, γ-Linolensäure, Calendulasäure, Punicinsäure, α-Elaeostearinsäure, β-Elaeostearinsäure, Arachidonsäure, Timnodonsäure, Clupanodonsäure, 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 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 Zusammenhang zu verstehen, dass die Carboxylgruppe der betrachteten Fettsäure durch ein -COH, ein $-CH_2OH$oder ein $-CH_2NH_2$ 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, 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 oder einfachste organische Moleküle wie CO_2, 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, Acetobacter, Acidiphilium, Afipia, Ahrensia, Asticcacaulis, Aurantimonas, Azorhizobium, Azospirillum, Bartonella, tribocorum, Beijerinckia, Bradyrhizobium, Brevundimonas, subvibrioides, Brucella, Caulobacter, Chelativorans, Citreicella, 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, Ochrobactrum, Octadecabacter, Oligotropha, Paracoccus, Parvibaculum, Parvularcula, Pelagibaca, Phaeobacter, Phenylobacterium, Polymorphum, Pseudovibrio, Rhodobacter, Rhodomicrobium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Roseibium, Roseobacter, Roseomonas, Roseovarius, Ruegeria, Sagittula, Silicibacter, Sphingobium, Sphingomonas, Sphingopyxis, Starkeya, Sulfitobacter, Thalassiobium, Xanthobacter, Zymomonas, 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, Alicycliphilus, Aromatoleum, Azoarcus, Comamonas, Dechloromonas, Delftia, Gallionella, Herbaspirillum, Herminiimonas, Hylemonella, Janthinobacterium, Leptothrix, Methylibium, Methylobacillus, Methylophilales, Methyloversatilis, Methylovorus, Nitrosomonas, Nitrosospira, Oxalobacter, Parasutterella, Polaromonas, Polaromonas, Pusillimonas, Rhodoferax, Rubrivivax, Sideroxydans, Sutterella, wadsworthensis, Taylorella, Thauera, Thiobacillus, Thiomonas, Variovorax, Verminephrobacter, Anaeromyxobacter, Bdellovibrio, bacteriovorus, Bilophila, 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, 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, Alteromonadales, Alteromonas, Baumannia, Beggiatoa, Bermanella, Carsonella, Ruthia, Vesicomyosocius, Cardiobacterium, Chromohalobacter, Colwellia, Congregibacter, Coxiella, Dichelobacter, Endoriftia, Enhydrobacter, Ferrimonas, Francisella, Glaciecola, Hahella,

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, 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, 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.

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 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., *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 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 µmol/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.

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 orgaqnische 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_{iib} 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
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.

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 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 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 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.

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 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.
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 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 „.1“, kenntlich gemacht.

Bestimmte Enzyme E_i

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.

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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), 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 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_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 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 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 [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 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 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.

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 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 [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 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 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 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 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 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.

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, 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 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 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 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 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 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 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 [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, 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 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 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 [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 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.

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 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 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.

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 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 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 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 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 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.
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 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, 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 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 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 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].

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 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 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 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, 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, 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 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 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 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, 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 bevorzugte Enzyme E_i und deren Sequenzen, insbesondere in Abschnitt 2.2.
Liu X, Sheng J und Curtiss IIII 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 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.

Bestimmte Enzyme E_{ii}

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

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 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 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 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, 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 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 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, 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 bevorzugte Enzyme E_{ii} und deren Sequenzen, insbesondere in Abschnitt 2.2.
Liu X, Sheng J und Curtiss IIII 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 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.

Bestimmte Enzyme E_{iii}

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

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 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 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}

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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 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_{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 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 bevorzugt 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 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. 2001. 29(5):293-307) beschreiben insbesondere auf S. 296, vorletzter Absatz, bis S. 298, zweiter Absatz, erfindungsgemäß bevorzugt 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 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 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 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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 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_{iib} generell insbesondere die Umsetzung von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu Dodecanoyl-ACP-Thioester verstanden wird.

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

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

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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.

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_v generell insbesondere die Umwandlung von Dodecanoyl-CoA-Thioester und/oder Dodecanoyl-ACP-Thioester mit Methanol zu Dodecanoyl-Methylester verstanden wird.

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, 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 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_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 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 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 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.

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 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_{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

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

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 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 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 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}, $E_{vi}E_{viii}$, $E_{vi}E_{x}E_{iib}$, $E_{viii}E_{xii}$, $E_{viii}E_{xiii}$, $E_{ix}E_{xii}$, $E_{ix}E_{xiii}$, $E_{x}E_{xii}$, $E_{x}E_{xiii}$, $E_{vi}E_{viii}E_{xii}$, $E_{vi}E_{viii}E_{xiii}$, $E_{x}E_{xii}E_{vi}E_{iib}$ sowie $E_{x}E_{xiii}E_{vi}E_{iib}$ umfasst.

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

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 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 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 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 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 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.

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 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 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 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 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 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.

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 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_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 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.
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, 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.
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 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.

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 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 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 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 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.

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:

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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 (kodiert 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, 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,

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, 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, 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
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_{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.

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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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
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, und zwar in einem System, bei dem Pyruvat zu Alanin umgesetzt wird.

Fünfte gentechnische Modifikation zur Unterdrückung des Abbaus von Carbonsäuren und Carbonsäurederivaten

Erfindungsgemäß sind darüber hinaus Mikroorganismen bevorzugt, die eine fünfte 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,

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,

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-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.

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.

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 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. 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 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 Fremd-DNA ist in diesem Zusammenhang jegliche DNA-Sequenz zu verstehe, 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, 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

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

Bestimmte Enzyme E_a

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

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_a generell insbesondere die Synthese von Dodecanoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_b

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, ZP_01135962.1, ZP_03560927.1, ZP_04716612.1, EGB41427.1, EGP48304.1, EFV84045.1, 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, 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, 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,

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, 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, 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,

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, 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, 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, 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,

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, 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, 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 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.

Bestimmte Enzyme E_c

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

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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,

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_c generell insbesondere die Oxidation von Dodecanoyl-CoA-Thioester zu 2-Dodecenoyl-CoA-Thioester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_d und E_e

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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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

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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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

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_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

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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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,

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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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,

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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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 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_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

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 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.

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 gegenenenfalls 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 E_1 aufweisen, ausgewählt aus der Gruppe:

E_{1a} P450 Alkanhydroxylasen, welche bevorzugt die folgenden Reaktionen katalysieren:
reduziertes Häm + Alkansäure(ester) = oxidiertes Häm + ω-Hydroxy-Alkansäure(ester) + H_2O,
2 reduziertes Häm + Alkansäure(ester) = 2 oxidiertes Häm + ω-Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H_2O oder
3 reduziertes Häm + Alkansäure(ester) = Alkanmonoxygenase + 3 oxidiertes Häm + ω-Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H_2O 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 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) + H_2O,
2 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = 2 oxidierte Rubredoxine + ω-Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H_2O oder
3 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanmonoxygenase + 3 oxidierte Rubredoxine + ω-Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H_2O 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 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 + O_2 = Alkan-1-al + H_2O_2 oder
Alkan-1-al + O_2 = Alkansäure + H_2O_2,
E_{1d} AlkJ Alkoholdehydrogenasen der EC 1.1.99.-, welche bevorzugt mindestens eine der folgenden reversiblen Reaktionen katalysieren:
Alkan-1-ol + oxidierter Akzeptor = Alkan-1-al + reduzierter Akzeptor oder
Alkan-1-al + oxidierter Akzeptor = Alkansäure + reduzierter 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
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^+

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, 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 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.

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}

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

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.

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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

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, 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, 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, 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, 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, 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 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_{1a} generell insbesondere die Umsetzung von Laurinsäure und/oder Laurinsäuremethylester zu ω-Hydroxy-Laurinsäure und/oder ω-Hydroxy-Laurinsäuremethylester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_{1b}

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

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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 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 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_{1b} generell insbesondere die Umsetzung von Laurinsäure und/oder Laurinsäuremethylester zu ω-Hydroxy-Laurinsäure und/oder ω-Hydroxy-Laurinsäuremethylester verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_{1c}

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

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,
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_{1c} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-ol zu Dodekan-1-al bzw. Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,

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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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,
und besonders bevorzugt
Q00593.1, Q9WWW2.1, ZP_00957061.1, YP_957894.1, CAC38030.1, YP_694430.1, YP_957725.1, YP_001672216.1.
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_{1d} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-ol zu Dodekan-1-al bzw. Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

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, 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 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_{1e} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

Bestimmte Enzyme E_{1f}

Solche bevorzugten Aldehyddehydrogenasen sind ausgewählt aus Prr, Usg, MhpF, AstD, GdhA, FrmA, Feab, Asd, Sad, PuuE, GabT, YgaW, BetB, PutA, PuuC, FeaB, AldA, Prr, EutA, GabD, AldB, TynA und YneI 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 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_{1f} generell insbesondere die Umsetzung von Dodekan-1-al zu Dodekansäure verstanden wird.

Hilfsenzyme zu E_{1a}

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass, wenn die Aktivität eines Enzyms E_{1a},einer eukaryotischen P450 Alkanhydroxylase vermindert wird, der erfindungsgemäße 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.
NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen der EC 1.6.2.4 katalysieren die folgende Reaktion:
Oxidiertes Cytochrom P450 + $NADPH^+$ = Reduziertes Cytochrom P450 + $NADP^+$ + H^+

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass, wenn die Aktivität eines Enzyms E_{1a},einer prokaryotischen P450 Alkanhydroxylase vermindert wird, der erfindungsgemäße 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.
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 Zusammenhang mit dieser Erfindung beschriebenen Ferredoxins befindet.
Der Begriff „in unmittelbarer Nähe“ bedeutet, dass zwischen den betrachteten Genen maximal drei andere Strukturgene lokalisiert sind.

Ferredoxine katalysieren die folgenden Reaktionen:
Alkanhydroxylase + reduziertes Ferredoxin + Alkansäure(ester) = Alkanmonoxygenase + oxidiertes Ferredoxin + ω-Hydroxy-Alkansäure(ester) + H_2O,
Alkanhydroxylase + 2 reduzierte Ferredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanhydroxylase + 2 oxidierte Ferredoxine + ω-Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H_2O oder
Alkanhydroxylase + 3 reduzierte Ferredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanhydroxylase + 3 oxidierte Ferredoxine + ω-Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H_2O und
werden bevorzugt kodiert durch ein Gen, welches sich in unmittelbarer Nähe eines Genes einer vorgenannten prokaryotischen P450 Alkanhydroxylase des CYP153-Typs oder einer 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.

Hilfsenzyme zu E_{1b}

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass , wenn die Aktivität eines Enzyms E_{1b},einer AlkB 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.
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 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:
Alkanmonoxygenase + reduziertes Rubredoxin + Alkansäure(ester) = Alkanmonoxygenase + oxidiertes Rubredoxin + ω-Hydroxy-Alkansäure(ester) + H_2O, Alkanmonoxygenase + 2 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanmonoxygenase + 2 oxidierte Rubredoxine + ω-Oxo-Alkansäure(ester) + 2 H_2O oder
Alkanmonoxygenase + 3 reduzierte Rubredoxine + Alkansäure(ester) = Alkanmonoxygenase + 3 oxidierte Rubredoxine + ω-Carboxy-Alkansäure(ester) + 3 H_2O 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 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 der AlkT Rubredoxin-NAD(P)$^+$-Reduktase und des Rubredoxins AlkG auf.

Bestimmte Ausführungen bevorzugter Mikroorganismen und Enzyme

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,
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,
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 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,
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 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 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,
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 Modifikation im Sinne der Erfindung
aufweisen.

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, 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 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 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:

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

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 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:
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.

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 zusätzlich vorteilhaft kombiniert sein können mit einer verglichen zum Wildtyp des Mikroorganismus erhöhten Enzymaktivität, welche beschrieben ist für die 3-Ketoacyl-ACP (Acyl Carrrier 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, ThlA, ThlB, 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	
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 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 Carrrier 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_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

28	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_v	E_f
35	$AlkLE_{iii}$	E_v	E_f
36	$AlkLE_{iv}$	E_v	E_f
37	AlkL	E_vE_{vi}	
38	$AlkLE_i$	E_vE_{vi}	
39	$AlkLE_{ii}$	E_vE_{vi}	
40	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_vE_{vi}	
41	$AlkLE_{iii}$	E_vE_{vi}	
42	$AlkLE_{iv}$	E_vE_{vi}	
43	AlkL	E_vE_{vi}	E_a
44	$AlkLE_i$	E_vE_{vi}	E_a
45	$AlkLE_{ii}$	E_vE_{vi}	E_a
46	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_vE_{vi}	E_a
47	$AlkLE_{iii}$	E_vE_{vi}	E_a
48	$AlkLE_{iv}$	E_vE_{vi}	E_a
49	AlkL	E_vE_{vi}	E_b
50	$AlkLE_i$	E_vE_{vi}	E_b
51	$AlkLE_{ii}$	E_vE_{vi}	E_b
52	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_vE_{vi}	E_b
53	$AlkLE_{iii}$	E_vE_{vi}	E_b
54	$AlkLE_{iv}$	E_vE_{vi}	E_b
55	AlkL	E_vE_{vi}	E_d
56	$AlkLE_i$	E_vE_{vi}	E_d
57	$AlkLE_{ii}$	E_vE_{vi}	E_d
58	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_vE_{vi}	E_d
59	$AlkLE_{iii}$	E_vE_{vi}	E_d
60	$AlkLE_{iv}$	E_vE_{vi}	E_d
61	AlkL	E_vE_{vi}	E_e
62	$AlkLE_i$	E_vE_{vi}	E_e
63	$AlkLE_{ii}$	E_vE_{vi}	E_e
64	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_vE_{vi}	E_e
65	$AlkLE_{iii}$	E_vE_{vi}	E_e
66	$AlkLE_{iv}$	E_vE_{vi}	E_e
67	AlkL	E_vE_{vi}	E_f
68	$AlkLE_i$	E_vE_{vi}	E_f
69	$AlkLE_{ii}$	E_vE_{vi}	E_f
70	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_vE_{vi}	E_f

71	$AlkLE_{iii}$	E_vE_{vi}	E_f
72	$AlkLE_{iv}$	E_vE_{vi}	E_f
73	AlkL	E_{vii}	
74	$AlkLE_i$	E_{vii}	
75	$AlkLE_{ii}$	E_{vii}	
76	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$	
113	$AlkLE_{iii}$	$E_{vi}E_{vii}$	

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$_{1}$

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}

286	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$		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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{vii}$		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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{vii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{vii}$	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 Carrrier 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, ThlA, ThlB, 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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{e}
29	$AlkLE_{iii}$	E_{viii}	E_{e}

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

116	$AlkLE_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_{a}
117	$AlkLE_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_{a}
118	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	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	$AlkLE_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}	
160	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	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}

202	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_d	E_1
203	$AlkLE_{iii}$	E_{viii}	E_d	E_1
204	$AlkLE_{iv}$	E_{viii}	E_d	E_1
205	AlkL	E_{viii}	E_e	E_1
206	$AlkLE_i$	E_{viii}	E_e	E_1
207	$AlkLE_{ii}$	E_{viii}	E_e	E_1
208	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_e	E_1
209	$AlkLE_{iii}$	E_{viii}	E_e	E_1
210	$AlkLE_{iv}$	E_{viii}	E_e	E_1
211	AlkL	E_{viii}	E_f	E_1
212	$AlkLE_i$	E_{viii}	E_f	E_1
213	$AlkLE_{ii}$	E_{viii}	E_f	E_1
214	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_f	E_1
215	$AlkLE_{iii}$	E_{viii}	E_f	E_1
216	$AlkLE_{iv}$	E_{viii}	E_f	E_1
217	AlkL	E_{ix}		E_1
218	$AlkLE_i$	E_{ix}		E_1
219	$AlkLE_{ii}$	E_{ix}		E_1
220	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{ix}		E_1
221	$AlkLE_{iii}$	E_{ix}		E_1
222	$AlkLE_{iv}$	E_{ix}		E_1
223	AlkL	E_{ix}	E_a	E_1
224	$AlkLE_i$	E_{ix}	E_a	E_1
225	$AlkLE_{ii}$	E_{ix}	E_a	E_1
226	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_a	E_1
227	$AlkLE_{iii}$	E_{ix}	E_a	E_1
228	$AlkLE_{iv}$	E_{ix}	E_a	E_1
229	AlkL	E_{ix}	E_b	E_1
230	$AlkLE_i$	E_{ix}	E_b	E_1
231	$AlkLE_{ii}$	E_{ix}	E_b	E_1
232	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_b	E_1
233	$AlkLE_{iii}$	E_{ix}	E_b	E_1
234	$AlkLE_{iv}$	E_{ix}	E_b	E_1
235	AlkL	E_{ix}	E_d	E_1
236	$AlkLE_i$	E_{ix}	E_d	E_1
237	$AlkLE_{ii}$	E_{ix}	E_d	E_1
238	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_d	E_1
239	$AlkLE_{iii}$	E_{ix}	E_d	E_1
240	$AlkLE_{iv}$	E_{ix}	E_d	E_1
241	AlkL	E_{ix}	E_e	E_1
242	$AlkLE_i$	E_{ix}	E_e	E_1
243	$AlkLE_{ii}$	E_{ix}	E_e	E_1
244	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_e	E_1

245	$AlkLE_{iii}$	E_{ix}	E_e	E_1
246	$AlkLE_{iv}$	E_{ix}	E_e	E_1
247	AlkL	E_{ix}	E_f	E_1
248	$AlkLE_i$	E_{ix}	E_f	E_1
249	$AlkLE_{ii}$	E_{ix}	E_f	E_1
250	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_f	E_1
251	$AlkLE_{iii}$	E_{ix}	E_f	E_1
252	$AlkLE_{iv}$	E_{ix}	E_f	E_1
253	AlkL	E_x		E_1
254	$AlkLE_i$	E_x		E_1
255	$AlkLE_{ii}$	E_x		E_1
256	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_x		E_1
257	$AlkLE_{iii}$	E_x		E_1
258	$AlkLE_{iv}$	E_x		E_1
259	AlkL	E_x	E_a	E_1
260	$AlkLE_i$	E_x	E_a	E_1
261	$AlkLE_{ii}$	E_x	E_a	E_1
262	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_x	E_a	E_1
263	$AlkLE_{iii}$	E_x	E_a	E_1
264	$AlkLE_{iv}$	E_x	E_a	E_1
265	AlkL	E_x	E_b	E_1
266	$AlkLE_i$	E_x	E_b	E_1
267	$AlkLE_{ii}$	E_x	E_b	E_1
268	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_x	E_b	E_1
269	$AlkLE_{iii}$	E_x	E_b	E_1
270	$AlkLE_{iv}$	E_x	E_b	E_1
271	AlkL	E_x	E_d	E_1
272	$AlkLE_i$	E_x	E_d	E_1
273	$AlkLE_{ii}$	E_x	E_d	E_1
274	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_x	E_d	E_1
275	$AlkLE_{iii}$	E_x	E_d	E_1
276	$AlkLE_{iv}$	E_x	E_d	E_1
277	AlkL	E_x	E_e	E_1
278	$AlkLE_i$	E_x	E_e	E_1
279	$AlkLE_{ii}$	E_x	E_e	E_1
280	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_x	E_e	E_1
281	$AlkLE_{iii}$	E_x	E_e	E_1
282	$AlkLE_{iv}$	E_x	E_e	E_1
283	AlkL	E_x	E_f	E_1
284	$AlkLE_i$	E_x	E_f	E_1
285	$AlkLE_{ii}$	E_x	E_f	E_1
286	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	E_x	E_f	E_1
287	$AlkLE_{iii}$	E_x	E_f	E_1

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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$		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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$		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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	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	$AlkLE_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	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

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 Carrrier 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	$AlkLE_{xii}$	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}

32	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{viii}	E_{f}
33	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}	E_{f}
34	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{f}
35	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}	E_{f}
36	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}	E_{f}
37	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	
38	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{ix}	
39	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	
40	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	
41	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	
42	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	
43	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_{a}
44	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{ix}	E_{a}
45	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_{a}
46	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_{a}
47	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_{a}
48	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_{a}
49	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_{b}
50	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{ix}	E_{b}
51	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_{b}
52	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_{b}
53	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_{b}
54	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_{b}
55	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_{d}
56	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{ix}	E_{d}
57	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_{d}
58	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_{d}
59	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_{d}
60	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_{d}
61	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_{e}
62	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{ix}	E_{e}
63	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_{e}
64	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_{e}
65	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_{e}
66	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_{e}
67	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_{f}
68	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{ix}	E_{f}
69	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_{f}
70	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_{f}
71	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_{f}
72	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_{f}
73	$AlkLE_{xii}$	E_{x}	
74	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{x}	

75	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{x}	
76	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{x}	
77	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{x}	
78	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{x}	
79	$AlkLE_{xii}$	E_{x}	E_{a}
80	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{x}	E_{a}
81	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{x}	E_{a}
82	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{x}	E_{a}
83	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{x}	E_{a}
84	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{x}	E_{a}
85	$AlkLE_{xii}$	E_{x}	E_{b}
86	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{x}	E_{b}
87	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{x}	E_{b}
88	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{x}	E_{b}
89	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{x}	E_{b}
90	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{x}	E_{b}
91	$AlkLE_{xii}$	E_{x}	E_{d}
92	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{x}	E_{d}
93	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{x}	E_{d}
94	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{x}	E_{d}
95	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{x}	E_{d}
96	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{x}	E_{d}
97	$AlkLE_{xii}$	E_{x}	E_{e}
98	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{x}	E_{e}
99	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{x}	E_{e}
100	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{x}	E_{e}
101	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{x}	E_{e}
102	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{x}	E_{e}
103	$AlkLE_{xii}$	E_{x}	E_{f}
104	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{x}	E_{f}
105	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{x}	E_{f}
106	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{x}	E_{f}
107	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{x}	E_{f}
108	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{x}	E_{f}
109	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
110	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	
111	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
112	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	
113	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
114	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	
115	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_{a}
116	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_{a}
117	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_{a}

118	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
119	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
120	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
121	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
122	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
123	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
124	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
125	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
126	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
127	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
128	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
129	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
130	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
131	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
132	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
133	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
134	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
135	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
136	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
137	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
138	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
139	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
140	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
141	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
142	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
143	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
144	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
145	$AlkLE_{xii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
146	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
147	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
148	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
149	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
150	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
151	$AlkLE_{xii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
152	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
153	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
154	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
155	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
156	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
157	$AlkLE_{xii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
158	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
159	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
160	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b

161	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	
162	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	
163	$AlkLE_{xii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	
164	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	
165	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	
166	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	
167	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	
168	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	
169	$AlkLE_{xii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	
170	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	
171	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	
172	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	
173	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	
174	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	
175	$AlkLE_{xii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
176	$AlkLE_{xii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
177	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
178	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
179	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
180	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
181	$AlkLE_{xii}$	E_{viii}		E_1
182	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{viii}		E_1
183	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}		E_1
184	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}		E_1
185	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}		E_1
186	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}		E_1
187	$AlkLE_{xii}$	E_{viii}	E_a	E_1
188	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{viii}	E_a	E_1
189	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}	E_a	E_1
190	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_a	E_1
191	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}	E_a	E_1
192	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}	E_a	E_1
193	$AlkLE_{xii}$	E_{viii}	E_b	E_1
194	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{viii}	E_b	E_1
195	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}	E_b	E_1
196	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_b	E_1
197	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}	E_b	E_1
198	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}	E_b	E_1
199	$AlkLE_{xii}$	E_{viii}	E_d	E_1
200	$AlkLE_{xii}E_{i}$	E_{viii}	E_d	E_1
201	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}	E_d	E_1
202	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_d	E_1
203	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}	E_d	E_1

204	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}	E_d	E_1
205	$AlkLE_{xii}$	E_{viii}	E_e	E_1
206	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{viii}	E_e	E_1
207	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}	E_e	E_1
208	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_e	E_1
209	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}	E_e	E_1
210	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}	E_e	E_1
211	$AlkLE_{xii}$	E_{viii}	E_f	E_1
212	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{viii}	E_f	E_1
213	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{viii}	E_f	E_1
214	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_f	E_1
215	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{viii}	E_f	E_1
216	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{viii}	E_f	E_1
217	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}		E_1
218	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{ix}		E_1
219	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}		E_1
220	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}		E_1
221	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}		E_1
222	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}		E_1
223	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_a	E_1
224	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{ix}	E_a	E_1
225	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_a	E_1
226	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_a	E_1
227	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_a	E_1
228	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_a	E_1
229	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_b	E_1
230	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{ix}	E_b	E_1
231	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_b	E_1
232	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_b	E_1
233	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_b	E_1
234	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_b	E_1
235	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_d	E_1
236	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{ix}	E_d	E_1
237	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_d	E_1
238	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_d	E_1
239	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_d	E_1
240	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_d	E_1
241	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_e	E_1
242	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{ix}	E_e	E_1
243	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_e	E_1
244	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_e	E_1
245	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_e	E_1
246	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_e	E_1

247	$AlkLE_{xii}$	E_{ix}	E_f	E_1
248	$AlkLE_{xii}E_i$	E_{ix}	E_f	E_1
249	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_{ix}	E_f	E_1
250	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_f	E_1
251	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_{ix}	E_f	E_1
252	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_{ix}	E_f	E_1
253	$AlkLE_{xii}$	E_x		E_1
254	$AlkLE_{xii}E_i$	E_x		E_1
255	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_x		E_1
256	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_x		E_1
257	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_x		E_1
258	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_x		E_1
259	$AlkLE_{xii}$	E_x	E_a	E_1
260	$AlkLE_{xii}E_i$	E_x	E_a	E_1
261	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_x	E_a	E_1
262	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_a	E_1
263	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_x	E_a	E_1
264	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_x	E_a	E_1
265	$AlkLE_{xii}$	E_x	E_b	E_1
266	$AlkLE_{xii}E_i$	E_x	E_b	E_1
267	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_x	E_b	E_1
268	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_b	E_1
269	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_x	E_b	E_1
270	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_x	E_b	E_1
271	$AlkLE_{xii}$	E_x	E_d	E_1
272	$AlkLE_{xii}E_i$	E_x	E_d	E_1
273	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_x	E_d	E_1
274	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_d	E_1
275	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_x	E_d	E_1
276	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_x	E_d	E_1
277	$AlkLE_{xii}$	E_x	E_e	E_1
278	$AlkLE_{xii}E_i$	E_x	E_e	E_1
279	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_x	E_e	E_1
280	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_e	E_1
281	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_x	E_e	E_1
282	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_x	E_e	E_1
283	$AlkLE_{xii}$	E_x	E_f	E_1
284	$AlkLE_{xii}E_i$	E_x	E_f	E_1
285	$AlkLE_{xii}E_{ii}$	E_x	E_f	E_1
286	$AlkLE_{xii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_f	E_1
287	$AlkLE_{xii}E_{iii}$	E_x	E_f	E_1
288	$AlkLE_{xii}E_{iv}$	E_x	E_f	E_1
289	$AlkLE_{xii}$	$E_{vi}E_{viii}$		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}

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 Carrrier 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, ThlA, ThlB, 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}

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 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 Carrrier 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, ThlA, ThlB, 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 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}

71	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_f
72	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_f
73	$AlkLE_{vii}$	E_x	
74	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	
75	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	
76	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	
77	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	
78	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	
79	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_a
80	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_a
81	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_a
82	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_a
83	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_a
84	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_a
85	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_b
86	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_b
87	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_b
88	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_b
89	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_b
90	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_b
91	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_d
92	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_d
93	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_d
94	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_d
95	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_d
96	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_d
97	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_e
98	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_e
99	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_e
100	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_e
101	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_e
102	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_e
103	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_f
104	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_f
105	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_f
106	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_f
107	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_f
108	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_f
109	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
110	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	
111	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
112	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	
113	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	

114	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	
115	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
116	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
117	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
118	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
119	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
120	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
121	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
122	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
123	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
124	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
125	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
126	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
127	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
128	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
129	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
130	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
131	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
132	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
133	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
134	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
135	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
136	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
137	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
138	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
139	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
140	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
141	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
142	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
143	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
144	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
145	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
146	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
147	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
148	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
149	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
150	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
151	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
152	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
153	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
154	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
155	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	
156	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_x$	

157	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{a}
158	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{a}
159	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{a}
160	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{a}
161	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{a}
162	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{a}
163	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}
164	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}
165	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}
166	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}
167	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}
168	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{b}
169	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{d}
170	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{d}
171	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{d}
172	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{d}
173	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{d}
174	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{d}
175	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{e}
176	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{e}
177	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{e}
178	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{e}
179	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{e}
180	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{e}
181	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{f}
182	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{f}
183	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{f}
184	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{f}
185	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{f}
186	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_{f}
187	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
188	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
189	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
190	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
191	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
192	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
193	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	
194	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	
195	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	
196	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	
197	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	
198	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	
199	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_{a}

200	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_{a}
201	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_{a}
202	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{a}
203	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_{a}
204	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_{a}
205	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_{b}
206	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_{b}
207	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_{b}
208	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{b}
209	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_{b}
210	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_{b}
211	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_{d}
212	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_{d}
213	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_{d}
214	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{d}
215	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_{d}
216	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_{d}
217	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_{e}
218	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_{e}
219	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_{e}
220	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{e}
221	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_{e}
222	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_{e}
223	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_{f}
224	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_{f}
225	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_{f}
226	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_{f}
227	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_{f}
228	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_{f}
229	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	
230	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	
231	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	
232	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	
233	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	
234	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	
235	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_{a}
236	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_{a}
237	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_{a}
238	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_{a}
239	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_{a}
240	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_{a}
241	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_{b}
242	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_{b}

243	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_b
244	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_b
245	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_b
246	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_b
247	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_d
248	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_d
249	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_d
250	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_d
251	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_d
252	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_d
253	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_e
254	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_e
255	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_e
256	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_e
257	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_e
258	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_e
259	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_f
260	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_f
261	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_f
262	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_f
263	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_f
264	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_f
265	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	
266	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	
267	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	
268	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	
269	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	
270	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	
271	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_a
272	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_a
273	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_a
274	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_a
275	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_a
276	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_a
277	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_b
278	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_b
279	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_b
280	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_b
281	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_b
282	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_b
283	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_d
284	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_d
285	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_d

286	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_d
287	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_d
288	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_d
289	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_e
290	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_e
291	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_e
292	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_e
293	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_e
294	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_e
295	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_f
296	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_f
297	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_f
298	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_f
299	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_f
300	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_f
301	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
302	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	
303	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
304	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	
305	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	
306	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	
307	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
308	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
309	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
310	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
311	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
312	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a
313	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
314	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
315	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
316	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
317	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
318	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b
319	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
320	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
321	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
322	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
323	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
324	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d
325	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
326	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
327	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
328	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e

329	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
330	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e
331	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
332	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
333	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
334	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
335	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
336	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f
337	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
338	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
339	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
340	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
341	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
342	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	
343	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
344	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
345	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
346	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
347	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
348	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a
349	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
350	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
351	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
352	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
353	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
354	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b
355	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d
356	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d
357	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d
358	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d
359	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d
360	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d
361	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e
362	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e
363	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e
364	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e
365	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e
366	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e
367	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f
368	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f
369	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f
370	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f
371	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f

372	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	
373	$AlkLE_{vii}$	E_{viii}		E_1
374	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{viii}		E_1
375	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{viii}		E_1
376	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}		E_1
377	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{viii}		E_1
378	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{viii}		E_1
379	$AlkLE_{vii}$	E_{viii}	E_a	E_1
380	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_a	E_1
381	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_a	E_1
382	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_a	E_1
383	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_a	E_1
384	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_a	E_1
385	$AlkLE_{vii}$	E_{viii}	E_b	E_1
386	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_b	E_1
387	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_b	E_1
388	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_b	E_1
389	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_b	E_1
390	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_b	E_1
391	$AlkLE_{vii}$	E_{viii}	E_d	E_1
392	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_d	E_1
393	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_d	E_1
394	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_d	E_1
395	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_d	E_1
396	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_d	E_1
397	$AlkLE_{vii}$	E_{viii}	E_e	E_1
398	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_e	E_1
399	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_e	E_1
400	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_e	E_1
401	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_e	E_1
402	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_e	E_1
403	$AlkLE_{vii}$	E_{viii}	E_f	E_1
404	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_f	E_1
405	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_f	E_1
406	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_f	E_1
407	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_f	E_1
408	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_f	E_1
409	$AlkLE_{vii}$	E_{ix}		E_1
410	$AlkLE_{vii}E_{i}$	E_{ix}		E_1
411	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{ix}		E_1
412	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}		E_1
413	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}		E_1
414	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}		E_1

415	$AlkLE_{vii}$	E_{ix}	E_a	E_1
416	$AlkLE_{vii}E_i$	E_{ix}	E_a	E_1
417	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_a	E_1
418	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_a	E_1
419	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_a	E_1
420	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_a	E_1
421	$AlkLE_{vii}$	E_{ix}	E_b	E_1
422	$AlkLE_{vii}E_i$	E_{ix}	E_b	E_1
423	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_b	E_1
424	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_b	E_1
425	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_b	E_1
426	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_b	E_1
427	$AlkLE_{vii}$	E_{ix}	E_d	E_1
428	$AlkLE_{vii}E_i$	E_{ix}	E_d	E_1
429	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_d	E_1
430	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_d	E_1
431	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_d	E_1
432	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_d	E_1
433	$AlkLE_{vii}$	E_{ix}	E_e	E_1
434	$AlkLE_{vii}E_i$	E_{ix}	E_e	E_1
435	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_e	E_1
436	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_e	E_1
437	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_e	E_1
438	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_e	E_1
439	$AlkLE_{vii}$	E_{ix}	E_f	E_1
440	$AlkLE_{vii}E_i$	E_{ix}	E_f	E_1
441	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_f	E_1
442	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_f	E_1
443	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_f	E_1
444	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_f	E_1
445	$AlkLE_{vii}$	E_x		E_1
446	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x		E_1
447	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x		E_1
448	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x		E_1
449	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x		E_1
450	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x		E_1
451	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_a	E_1
452	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_a	E_1
453	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_a	E_1
454	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_a	E_1
455	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_a	E_1
456	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_a	E_1
457	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_b	E_1

458	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_b	E_1
459	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_b	E_1
460	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_b	E_1
461	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_b	E_1
462	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_b	E_1
463	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_d	E_1
464	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_d	E_1
465	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_d	E_1
466	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_d	E_1
467	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_d	E_1
468	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_d	E_1
469	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_e	E_1
470	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_e	E_1
471	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_e	E_1
472	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_e	E_1
473	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_e	E_1
474	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_e	E_1
475	$AlkLE_{vii}$	E_x	E_f	E_1
476	$AlkLE_{vii}E_i$	E_x	E_f	E_1
477	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	E_x	E_f	E_1
478	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_f	E_1
479	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	E_x	E_f	E_1
480	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	E_x	E_f	E_1
481	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
482	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
483	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
484	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
485	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
486	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
487	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
488	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
489	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
490	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
491	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
492	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
493	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
494	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
495	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
496	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
497	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
498	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
499	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
500	$AlkLE_{vii}E_i$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1

501	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
502	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
503	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
504	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
505	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
506	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
507	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
508	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
509	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
510	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
511	$AlkLE_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
512	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
513	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
514	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
515	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
516	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
517	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
518	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
519	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
520	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
521	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
522	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
523	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
524	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
525	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
526	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
527	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
528	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
529	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
530	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
531	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
532	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
533	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
534	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
535	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
536	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
537	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
538	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
539	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
540	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
541	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
542	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
543	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1

544	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
545	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
546	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
547	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
548	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
549	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
550	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
551	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
552	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
553	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
554	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
555	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
556	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
557	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
558	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
559	$AlkLE_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
560	$AlkLE_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
561	$AlkLE_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
562	$AlkLE_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
563	$AlkLE_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
564	$AlkLE_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
565	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}		E_1
566	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}		E_1
567	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}		E_1
568	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}		E_1
569	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}		E_1
570	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}		E_1
571	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_a	E_1
572	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_a	E_1
573	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_a	E_1
574	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_a	E_1
575	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_a	E_1
576	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_a	E_1
577	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_b	E_1
578	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_b	E_1
579	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_b	E_1
580	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_b	E_1
581	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_b	E_1
582	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_b	E_1
583	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_d	E_1
584	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_d	E_1
585	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_d	E_1
586	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_d	E_1

587	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_d E_1
588	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_d E_1
589	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_e E_1
590	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_e E_1
591	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_e E_1
592	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_e E_1
593	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_e E_1
594	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_e E_1
595	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{viii}	E_f E_1
596	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{viii}	E_f E_1
597	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{viii}	E_f E_1
598	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{viii}	E_f E_1
599	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{viii}	E_f E_1
600	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{viii}	E_f E_1
601	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_1
602	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_1
603	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_1
604	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_1
605	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_1
606	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_1
607	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_a E_1
608	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_a E_1
609	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_a E_1
610	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_a E_1
611	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_a E_1
612	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_a E_1
613	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_b E_1
614	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_b E_1
615	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_b E_1
616	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_b E_1
617	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_b E_1
618	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_b E_1
619	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_d E_1
620	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_d E_1
621	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_d E_1
622	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_d E_1
623	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_d E_1
624	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_d E_1
625	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_e E_1
626	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_e E_1
627	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_e E_1
628	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_e E_1
629	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_e E_1

630	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_e E_1
631	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_{ix}	E_f E_1
632	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_{ix}	E_f E_1
633	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_{ix}	E_f E_1
634	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_{ix}	E_f E_1
635	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_{ix}	E_f E_1
636	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_{ix}	E_f E_1
637	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_1
638	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_1
639	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_1
640	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_1
641	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_1
642	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_1
643	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_a E_1
644	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_a E_1
645	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_a E_1
646	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_a E_1
647	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_a E_1
648	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_a E_1
649	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_b E_1
650	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_b E_1
651	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_b E_1
652	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_b E_1
653	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_b E_1
654	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_b E_1
655	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_d E_1
656	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_d E_1
657	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_d E_1
658	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_d E_1
659	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_d E_1
660	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_d E_1
661	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_e E_1
662	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_e E_1
663	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_e E_1
664	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_e E_1
665	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_e E_1
666	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_e E_1
667	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	E_x	E_f E_1
668	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	E_x	E_f E_1
669	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	E_x	E_f E_1
670	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	E_x	E_f E_1
671	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	E_x	E_f E_1
672	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	E_x	E_f E_1

673	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
674	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
675	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
676	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
677	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
678	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$		E_1
679	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
680	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
681	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
682	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
683	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
684	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_a	E_1
685	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
686	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
687	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
688	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
689	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
690	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_b	E_1
691	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
692	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
693	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
694	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
695	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
696	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_d	E_1
697	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
698	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
699	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
700	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
701	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
702	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_e	E_1
703	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
704	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
705	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
706	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
707	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
708	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{vi}E_{viii}$	E_f	E_1
709	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
710	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
711	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
712	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
713	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
714	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$		E_1
715	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
716	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
717	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
718	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
719	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
720	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_a	E_1
721	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
722	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
723	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
724	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
725	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
726	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_b	E_1
727	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
728	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
729	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
730	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
731	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
732	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_d	E_1
733	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
734	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
735	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
736	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
737	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
738	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_e	E_1
739	$AlkLE_{xiii}E_{vii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
740	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{i}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
741	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
742	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{ii}E_{iib}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
743	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iii}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1
744	$AlkLE_{xiii}E_{vii}E_{iv}$	$E_{iib}E_{vi}E_{x}$	E_f	E_1

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 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
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_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 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 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 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 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 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 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

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_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 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 (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%, 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_v generell insbesondere die Umwandlung von Dodecanoyl-CoA-Thioester mit Methanol zu Dodecanoyl-Methylester verstanden wird,
und E_{vi} ausgewählt ist aus 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.

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.

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 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 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 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.
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 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)
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_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 Enzymes E_{vi} aufweist,
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 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
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.

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%, 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 vierte gentechnische Modifikation aufweist, die eine verglichen mit der 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 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.
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 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), 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_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

er eine vierte gentechnische Modifikation auf, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines Enyzmes 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_b 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

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
er eine vierte gentechnische Modifikation auf, die eine verglichen mit der enzymatischen Aktivität des Wildtypes des Mikroorganismus gesteigerte Aktivität mindestens eines Enyzmes 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 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.
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),
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.

Verwendung der erfindungsgemäßen Mikroorganismen

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der vorgenannten Mikroorganismen 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 gegebenenfalls eine 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 verwendet werden, ist im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Mikroorganismen bereits hervorgehoben.

Verfahren zur Herstellung einer organischen Substanz aus einer einfachen Kohlenstoffquelle

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer organischen Substanz, 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 gegebenenfalls eine weitere Doppelbindung aufweisen können, aus einer einfachen Kohlenstoffquelle umfassend die Verfahrensschritte

I) in Kontakt Bringen eines erfindungsgemäßen Mikroorganismus mit einem Medium beinhaltend die einfache Kohlenstoffquelle,

II) Kultivieren des Mikroorganismus unter Bedingungen, die es dem Mikroorganismus ermöglichen aus der einfachen Kohlenstoffquelle die organische Substanz zu bilden und

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) 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 („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.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugte erfindungsgemäße Mikoorganismen 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, 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.

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 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 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 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,

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 dieses Weise ist es möglich, die gebildete organische Substanz *in situ* zu extrahieren.

Bevorzugte organische Substanzen, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden, sind die oben als bevorzugt genannten Substanzen, insbesondere die Fettsäuren und Fettsäurederivate.

In den nachfolgend aufgeführten Beispielen wird die vorliegende Erfindung beispielhaft 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 den erfindungsgemäßen Mikroorganismen bereits hervorgehoben.

Beispiele:

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

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:

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)
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)

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.

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.

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.

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 durch DNA-Sequenzierung überprüft. Der fertiggestellte *E. coli*-Expressionsvektor wurden als pCDF[alkL] (SEQ ID NR:07) bezeichnet.

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) 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 *BamH*I und *Not*I verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pJ294 (DNA 2.0 Inc.; Menlo Park, CA, USA) ligiert. Die fertiggestellten *E.coli*-Expressionsvektoren wurden als pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] (SEQ ID NR. 11), pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] (SEQ ID NR. 13) und pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] (SEQ ID NR. 12) bezeichnet.

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 Zugabe von 1 ml Aceton und 2 ml Wasser 50 µl Heptadecansäure (10 g/l gelöst in Ethanol) als interne Referenzsubstanz zugesetzt. Die Proben wurden mit 200 µl 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 Zugabe von 1 ml n-Heptan und 15sekündiges kräftiges Durchmischen. Die Heptanphase wurde mittels Gaschromatografie vermessen. Für die Trennung von Fettsäuremethylestern wurde die Kapillarsäule SP™-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). Heptadecansäure (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 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 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 Δ*fadE* (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 *Not*I am 5'- und 3'-Ende. Die Sequenz

Δ*fadE* wurde mit der Restriktionsendonuclease *Not*I verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pKO3 ligiert. Die Konstruktion des Stammes *E.coli* W3110 Δ*fadE* erfolgte mit Hilfe des pKO3-Δ*fadE* 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 elektrokompetente Zellen von *E. coli* W3110 Δ*fadE* 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 sterilfiltiert. 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 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 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. 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 Δ*fadE*, der *fatB2* aus *C.hookeriana* 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]
E.coli W3110 Δ*fadE* pCDFDuet-1/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]	30,1	2,4	1,9	13,6	17,3	3,6	1,9
E.coli W3110 Δ*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, 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.

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 *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 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 einem pJ294-Derivat kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

P_{tac}:

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

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

fadD [*E.coli*]:

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

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

atfA [*Acinetobacter* sp. ADP1]:

atfA-fw: 5'-GTTAAGTCTGAGGAGATCCACGCTATGCGCCC-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 *EcoN*I/*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, 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.
Das aufgereinigte Restriktionsfragment wird anschließend mit dem ebenfalls mit *Fse*I und *Xho*I geschnittenen Vektor-Fragment (7290 bp) von pCDF[fadD-atfA] (SEQ ID NR: 27) ligiert. Ligation des DNA-Fragments und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgen in dem Fachmann bekannter Art und Weise.
Die Richtigkeit der entstandenen Plasmide wird durch eine Restriktionsanalyse mit *Fse*I und *Xho*I kontrolliert. Die Authentizität der inserierten Fragmente wird mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Der fertig gestellte *E. coli*-Expressionsvektor wird als pCDF[fadD-atfA]-[alkL] (SEQ ID NR: 28),bezeichnet.

Beispiel 7: Chromatografische Quantifizierung von Produkten

Die Quantifizierung von Fettsäureestern erfolgt mittels Gaschromatografie. Zu den Proben, bestehend aus 1 ml Kulturbrühe, werden nach Zugabe von 100 µl 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 Gaschromatografie vermessen. Für die Trennung von Fettsäuremestern wird die Kapillarsäule SP™-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 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 und erhöht auf 240°C mit einer Rate von 4°C/min und gehalten für 15 min. Das Injektionsvolumen beträgt 1 µl, 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 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, 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.

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.*

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 elektrokompetente Zellen von *E. coli* W3110 Δ*fadE* (siehe Beispiel 4) hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Diese 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 Restriktionsanalyse bezüglich der Präsenz der korrekten Plasmide überprüft.
So werden folgende *E. coli* -Stämme erzeugt:

- *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]

- *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[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 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 37%iger Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt), wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltiert. 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 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 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 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 ΔfadE 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 Palmitinsäureethylester, C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester und C18:1-Et Ölsäureeethylester (bei Zugabe von Ethanol) zu bilden.

Weiterhin wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] vor allem in der Lage sind, C12:0-Me Laurinsäuremethylester, 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. C12:0-Et Laurinsäureethylester, C14:0-Et Myristinsäureethylester, C16:0-Et Palmitinsäureethylester, C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester und C18:1-Et Ölsäureeethylester (bei Zugabe von Ethanol) zu bilden.

Weiterhin wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] und *E.coli* W3110 ΔfadE 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. C14:0-Et Myristinsäureethylester, C16:0-Et Palmitinsäureethylester, C16:1-Et Palmitoleinsäureethylester und C18:1-Et Ölsäureeethylester (bei Zugabe von Ethanol) zu bilden.

Schließlich wird gezeigt, dass die in diesem Beispiel benannten Stämme *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc], *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]-[alkL]/pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc]t, wesentlich mehr der jeweiligen Fettsäuremethylester (bei Zugabe von Methanol) bzw. Fettsäureethylester (bei Zugabe von Ethanol bilden), als die

Stämme *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc], *E.coli* W3110 ΔfadE pCDF[fadD-atfA]/pJ294[Ptac-CpFATB2_optEc] und *E.coli* W3110 ΔfadE 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.

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 *BamH*I 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.

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

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.
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 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_{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 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[Ptac-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 entstandenen pJ294-Derivaten pJ294{Ptac}[ChFATB2(co_Ec){Placuv5}[alkL_Oa] (SEQ ID Nr. 50), pJ294{Ptac}[ChFATB2(co_Ec){Placuv5}[alkL_Ma] (SEQ ID Nr. 51) und pJ294{Ptac}[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 entprechend 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.

Beispiel 11: HPLC/ESI-basierte Quantifizierung von Fettsäuren

Die Quantifizierung von Octansäure, 3-Hydroxydecansäure, Decansäure, Laurinsäure, 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, 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 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)

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.
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

A (Wasser + 10 mMol Ammoniumacetat mit Ammonik 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

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
- 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:

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.

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 elektrokompetente 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 Austattung 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 ΔfadE 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 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDFDuet-1
- *E.coli* W3110 ΔfadE 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 sterilfiltiert. 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.

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.

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/l/OD]	$c_{Caprinsäure}$ [mg/l/OD]	$c_{Palmitoleinsäure}$ [mg/l/OD]	$c_{Vaccensäure}$ [mg/l/OD]
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDFDuet-1	21,0	1,8	0,1	1,3
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL_Oa]	27,5	6,3	5,9	2,3
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF[alkL_CspK31]	38,6	4,7		

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

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/l/OD]	$c_{Palmitoleinsäure}$ [mg/l/OD]
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDFDuet-1	38,2	0,1
E.coli 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/l/OD]	$c_{Myristinsäure}$ [mg/l/OD]
E.coli W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDFDuet-1	0,1	0,1
E.coli 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

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.

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)
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)
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

(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 *BamH*I linearisiert wurden, mittels Rekombination unter Verwendung des Geneart® 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 chemisch kompetenter *E.coli* DH5α 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.

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_{vi}) und *wax-dgaT* (*atfA* in Beispiel 5) (SEQ ID Nr. 65) aus *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 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)
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 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_AsAPD1(co_Ec)-fadD_Ec] (SEQ ID Nr. 75) und pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec] (SEQ ID Nr. 76) bezeichnet.

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 SP™-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 elektrokompetente 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 wurde mit den Vektoren pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[ChFATB2(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 62) oder 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 ΔfadE 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]
- *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)] / pCDF[atfA1_Ab(co_Ec)-fadD_Ec]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pCDF[wax-dgaT_AsAPD1(co_Ec)-fadD_Ec]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Placuv5}[alkL]{Ptac}[synUcTE] / pCDF[wax-dgaT_AsAPD1(co_Ec)-fadD_Ec]

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 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 sterilfiltiert. 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. Eine 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.

Produktion von Fettsäuremethylestern mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 ΔfadE, 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):

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

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

Zur Herstellung von Expressionsvektoren für die Coexpression von *fadD* (SEQ ID Nr. 57) aus *Escherichia coli* (kodierend für ein Enzym E_{vi}) 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 *Photorhabdus 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 Olikonukleotide 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)

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)

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*]:
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)
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)

acrM [*Acinetobacter sp. M1*]:
NP-FA-P6: 5'-CCTGAGCTGAAGGAGTTACAGTATGAATG-3' (SEQ ID Nr. 94)
NP-FA-P7: 5'-GTTTCTTTACCAGACTTATTACCAGTGTTCG-3' (SEQ ID Nr. 95)

Maqu_2220 [*Marinobacterium aquaeolei* VT8]:
NP-FA-P9: 5'-CCTGAGCGAGAAGGAGTTCTATCATGG-3' (SEQ ID Nr. 96)
NP-FA-P10: 5'-GTTTCTTTACCAGACTCATTACGCGGCCTTTTTGC-3' (SEQ ID Nr. 97)

acr1b [*Acinetobacter sp.* ADP1]:
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'-GTAAAACTAGGAGGTAAAAAAAATGACG-3' (SEQ ID Nr. 100)
NP-FA-P13: 5'-GTTTCTTTACCAGACTTAGCTATCGAACGAACGCCTCG-3' (SEQ ID Nr. 101)

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 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 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.
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 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:

- 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)

- pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 105)
- pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_Pl(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 *Photorhabdus 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_Pl(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'-GTTTCTTTACCAGACGCGTTCAAATTTCGCAGCAG-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.

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* 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 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)
- pCDF{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 112)
- pCDF{Ptac}[luxCDE_Pl(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 113)

Beispiel 18: Chromatografische Quantifizierung von Fettalkoholen und Fettaldehyden

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 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 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 elektrokompetente 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 Austattung 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-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 pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 105) sowie *E.coli* W3110 ΔfadE 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), pCDF{Ptac}[luxCDE_Pl(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 113) oder pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_Pl(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.

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)]
- *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 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acrM_AsM1]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[alkL][fadD_Ec-acrM_AsM1]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1]

- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[luxCDE_PI(co_Ec)]
- *E.coli* W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_PI(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 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 sterilfiltiert. 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 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 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.

Produktion von Fettalkoholen mit *E.coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 ΔfadE, 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]
E.coli W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acrM_AsM1(co_Ec)]	n.n.	2,53E+06	9,74E+06	1,39E+07
E.coli W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acrM_AsM1(co_Ec)]	n.n.	1,15E+07	2,90E+07	3,01E+07
E.coli W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[luxCDE_Pl(co_Ec)]	n.n.	1,42E+06	6,91E+06	n.n.
E.coli W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[luxCDE_Pl(co_Ec)]	n.n.	3,78E+06	1,77E+07	n.n.
E.coli W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1)]	n.n.	2,43E+04	1,59E+06	n.n.
E.coli W3110 ΔfadE pJ294{Ptac}[CnFATB3(co_Ec)] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acr1b_AsADP1)]	n.n.	8,65E+05	2,44E+06	n.n.
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294{Ptac}[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-acr1a_AsADP1(co_Ec)]	4,65E+06	n.n.	3,49E+06	5,63E+06
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Placuv5}[alkL]{Ptac}[fadD_Ec-acr1a_AsADP1(co_Ec)]	1,61E+07	n.n.	4,23E+07	3,45E+07
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Ptac}[fadD_Ec-Maqu2220_Ma(co_Ec)]	n.n.	n.n.	5,66E+04.	7,12E+04.
E.coli JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB2_optEc] / pCDF{Placuv5}[alkL]{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.

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

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}) urde unter Einbringung einer *NdeI*-Schnittstelle stromaufwärts und einer *XbaI*-Schnittstelle stromabwärts amplifiziert. Die Restriktionsschnittstellen wurden über die eingesetzten Oligonukleotide eingebracht.

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; 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-GelElektrophorese, 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 Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Das aufgereinigten PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Xba*I 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* 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. Der fertiggestellte *E.coli*-Expressionsvektor wurde als 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 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* aus *Mycobacterium marinum* sowie einem Expressionsvektor für das Gen *alkL* aus *Pseudomonas putida GPo1* werden elektrokompetente Zellen von *E. coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 ΔfadE 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 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 µg/ml), Kanamycin (50 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[Ptac-ChFATB1_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL]
- *E. coli* JW5020-1 Kan^S pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDFDuet-1

- *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
- *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
- *E. coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDF[alkL]
- *E. coli* W3110 ΔfadE pJ294[Ptac-synUcTE] / pJ281{Placuv5}[Mmar_3356(co_Ec)] / pCDFDuet-1

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 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 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltiert. 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 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 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)] / 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 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)] / 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) 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 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)
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)

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 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 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 pCDF[MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)] (SEQ ID Nr. 125) erzeugt. Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH10β 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.

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.

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 *Pseudomonas putida GPo1* werden elektrokompetente Zellen von *E. coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 ΔfadE 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)-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 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[Ptac-ChFATB1_optEc] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]

- *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)]
- *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)]
- *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)]
- *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)]

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 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 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltiert. 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

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 ΔfadE 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 ΔfadE 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.

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 *BamH*I 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.

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

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 elektrokompetente Zellen von *E. coli* JW5020-1 Kan^S und *E.coli* W3110 ΔfadE 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 ΔfadE pJ294[alaDH_B.s._TA_C.v.(Ct)_Ptac-synUcTE] / pCDF[alkL][MSMEG_2956(co_Ec)-npt_Noc(co_Ec)]

- *E.coli* W3110 ΔfadE 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 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 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 1 M Salzsäure (alle Substanzen von Merck, Darmstadt) wird vor Zugabe in das M9-Medium sterilfiltiert. 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 Fettaldehyden unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die 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 ΔfadE 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 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 Kettenlänge C8:0 und C10:0 und *E.coli* W3110 ΔfadE 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.

Beispiel 26: Herstellung von E. coli-Expressionsvektoren für die Expression verschiedener Acyl-CoA Reduktasen zur Herstellung von Fettalkoholen und Fettaldehyden

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 Park, CA, USA) hinter den P_{lac}-Promotor (SEQ ID NO. 149) über die Schnittstellen *Nde*I und *Not*I 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, CA, USA) durchgeführt. Die DNA-Sequenzen wurden in einem DNA2.0 eigenem Vektor erhalten.

Die Gene *Maqu_2220*, *Maqu_2507*, *AtFAR6* und *AcrM* wurden unter Einbringung der Restriktionsschnittstellen *Nde*I (am 5' Ende des jeweiligen Gens) und *Not*I (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.
Maqu_2220	Pr-DesFA-1-FW	TATATACATATGGCAATTCAGCAGGTACATCACG	*150*
	Pr-DesFA-1-RV	TATATAGCGGCCGCTCATTACGCGGCCTTTTTGC	*151*
Maqu_2507	Pr-DesFA-2-FW	TATATACATATGAACTATTTTCTTACAGGCGGTACAGG	*152*
	Pr-DesFA-2-RV	TATATAGCGGCCGCTTATTACCAGTAAATACCACGCATAATTGC	*153*
AtFAR6	Pr-DesFA-3-FW	TATATACATATGGCGACGACGAATGTACTGGC	*154*
	Pr-DesFA-3-RV	TATATAGCGGCCGCTTATTACTCGGTTTTCTTCTTGCTCAGG	*155*
AcrM	Pr-DesFA-5-FW	TATATACATATGAATGCAAAACTCAAAAAACTTTTTCAGC	*156*
	Pr-DesFA-5-RV	TATATAGCGGCCGCTTATTACCAGTGTTCGCCTGGG	*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.

Acr1a	Pr-FA_4.1-FW	AACAGGAGGTAAAACATTGATCTCGATCCGTGAAAAACGT	158
	Pr-FA_4.1-RV	TGAAGTGGGGGCGGCCTTATCACCAGTGCTCACCCGGGAA	159
Acr1b	Pr-DesFA_4.2-FW	AACAGGAGGTAAAACAGTGAACAAAAAACTTGAAGCTCTC	160
	Pr-DesFA_4.2-RV	TGAAGTGGGGGCGGCCTTATTACCAGTGTTCGCCTGGGAA	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™ 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.

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. 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 *Nde*I und *Not*I (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers geschnitten. Der geschnittene Vektor wurde anschließend auf 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 Kit“ von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die *Nde*I-*Not*I geschnittenen PCR-Amplifikate *Maqu_2220*, *Maqu_2507*, *AtFAR6* und *AcrM* jeweils mit dem *Nde*I-*Not*I 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*-*Not*I-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 Ampicilin-Resistenz vermittelt sowie einen p15A-Replikationsursprung trägt. Stromaufwärts der Schnittstelle *Nde*I 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 *Nru*I 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	*Maqu_2220*	162
pHg-12-59	pJ294	*Maqu_2507*	163
pHg-12-60	pJ294	*AtFAR6*	164
pHg-12-61	pJ294	*AcrM*	165
pHg-12-62	pJ294	*Acr1a*	166
pHg-12-63	pJ294	*Acr1b*	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 elektrokompetente 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

- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-58
- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-59
- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-60
- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-61
- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-62
- *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-63

- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL] / pHg-12-58
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL] / pHg-12-59
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL] / pHg-12-60
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL] / pHg-12-61
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL] / pHg-12-62
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL] / pHg-12-63

- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-58
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-59
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-60
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-61
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDFDuet-1 / pHg-12-62
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* 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:
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 sterilfiltiert. 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 Fettalkoholen und Fettaldehyden unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen mit der in Beispiel 18 beschriebenen Methode quantifiziert. Es wird gezeigt, dass die Stämme *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-58, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-61, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-62, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-63 sowie die Stämme *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-58, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-61, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-62 und *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* 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 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-58 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60 mehr Fettalkohole und

Fettaldehyde der Kettenlänge C16:0 und C16:1, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-61 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C8:0 und C10:0, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-62 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0, *E.coli* W3110 *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-63 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-58 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-59 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C14:0, C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-60 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C16:0 und C16:1, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-61 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C8:0 und C10:0, *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* pCDF[alkL]/pHg-12-62 mehr Fettalkohole und Fettaldehyde der Kettenlänge C12:0 und C14:0 und *E. coli* JW5020-1 Kan^s *ΔfadE* 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.

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

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 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.

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* DH5α-Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgten in der dem Fachmann bekannten Art und Weise.

Die Richtigkeit des jeweiligen Plasmids wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *Eco*RV 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.

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 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 *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

alkL aus *Pseudomonas putida* werden elektrokompetente 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 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 Plasmide überprüft.

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

- *E.coli* W3110 Δ*fadE* pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-66
- *E.coli* W3110 Δ*fadE* pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-67
- *E. coli* JW5020-1 Kan^s pJ294[Ptac-ChFATB1_optEc] / pHg-12-66
- *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
- *E.coli* W3110 Δ*fadE* pJ294[Ptac-synUcTE] / pHg-12-66
- *E.coli* W3110 Δ*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 sterilfiltiert. 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 *ΔfadE* 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 *ΔfadE* 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 *ΔfadE* 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 *E.coli* W3110 *ΔfadE* 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.

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 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.
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 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 (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., *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 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

verglichen zu seinem Wildtyp verminderte Aktivität mindestens eines Enzyms E_1, ausgewählt aus der Gruppe

E_1 P450 Alkanhydroxylasen,

E_{1b} AlkB Alkanhydroxylasen der EC 1.14.15.3,

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.

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 gegebenenfalls eine weitere Doppelbindung aufweisen können.

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 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 ermöglichen aus der einfachen Kohlenstoffquelle die organischen Substanz zu bilden und

III) gegebenenfalls Isolierung der gebildeten organischen Substanz.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/065933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/21 C12N9/00 C12P7/62
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHNEIDER S ET AL: "Biocatalyst engineering by assembly of fatty acid transport and oxidation activities for in vivo application of cytochrome P-450BM-3 monooxygenase", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 10, 1 October 1998 (1998-10-01), pages 3784-3790, XP002645599, ISSN: 0099-2240	1-6,10, 12,13
Y	the whole document tables 1,2	1-13
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 January 2013	22/01/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Giebeler, Katharina

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRIS GRANT ET AL: "Whole-cell bio-oxidation of n-dodecane using the alkane hydroxylase system ofGPo1 expressed in", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 48, no. 6, 31 January 2011 (2011-01-31), pages 480-486, XP028384660, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2011.01.008 [retrieved on 2011-02-17]	1-6, 11-13
Y	the whole document	1-13

X	BELLEN VAN J B ET AL: "DNA SEQUENCE DETERMINATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE OCT-PLASMID-ENCODED ALKJKL GENES OF PSEUDOMONAS OLEOVORANS", MOLECULAR MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 6, no. 21, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 3121-3136, XP001098364, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1111/J.1365-2958.1992.TB01769.X	1-6, 10-13
Y	the whole document page 3129	1-13

X	EP 0 277 674 A1 (UNIV GRONINGEN [NL]) 10 August 1988 (1988-08-10)	1-6, 11-13
Y	the whole document page 3, lines 2-14 page 5, lines 13-33	1-13

Y,P	JULSING MATTIJS K ET AL: "Outer Membrane Protein AlkL Boosts Biocatalytic Oxyfunctionalization of Hydrophobic Substrates in Escherichia coli", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 78, no. 16, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 5724-5733, XP009164655, ISSN: 0099-2240 the whole document	1-13

Y,P	WO 2011/131420 A1 (EVONIK DEGUSSA GMBH [DE]; POETTER MARKUS [DE]; SCHMID ANDREAS [DE]; BU) 27 October 2011 (2011-10-27) the whole document	1-13

	-/--	

1

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REBECCA M. LENNEN ET AL: "A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in Escherichia coli and catalytic conversion to alkanes", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 106, no. 2, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 193-202, XP055003869, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22660 cited in the application the whole document	1-13
Y	ERIC J. STEEN ET AL: "Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass", NATURE, vol. 463, no. 7280, 28 January 2010 (2010-01-28), pages 559-562, XP055011271, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature08721 cited in the application the whole document	1-13
Y	WO 2010/063031 A2 (SOLAZYME INC [US]; FRANKLIN SCOTT [US]; SOMANCHI ARAVIND [US]; ESPINA) 3 June 2010 (2010-06-03) cited in the application the whole document	1-13
Y	WO 2009/121066 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; KATZ LEONARD [US]; FORTMAN JEFFREY L [US]; KEASL) 1 October 2009 (2009-10-01) cited in the application the whole document	1-13
A	NEHER TRACY M ET AL: "Pseudomonas fluorescens ompW: plasmid localization and requirement for naphthalene uptake", CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, NRC RESEARCH PRESS, CA, vol. 55, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 553-563, XP009149676, ISSN: 0008-4166 the whole document	1-13
A	BEILEN VAN J B ET AL: "GENETICS OF ALKANE OXIDATION BY PSEUDOMONAS OLEOVORANS", BIODEGRADATION, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, vol. 5, no. 3/04, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 161-174, XP001001243, ISSN: 0923-9820, DOI: 10.1007/BF00696457 the whole document	1-13

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/065933

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 0277674	A1	10-08-1988	CA	1297439	C	17-03-1992
			DE	3853548	D1	18-05-1995
			DE	3853548	T2	21-09-1995
			EP	0277674	A1	10-08-1988
			JP	2790630	B2	27-08-1998
			JP	63273483	A	10-11-1988
			NL	8700085	A	01-08-1988
			US	5032512	A	16-07-1991
WO 2011131420	A1	27-10-2011	CA	2796777	A1	27-10-2011
			DE	102010015807	A1	20-10-2011
			TW	201207105	A	16-02-2012
			WO	2011131420	A1	27-10-2011
WO 2010063031	A2	03-06-2010	AU	2009319721	A1	03-06-2010
			AU	2009319722	A1	03-06-2010
			CA	2745040	A1	03-06-2010
			CA	2745129	A1	03-06-2010
			CN	102300996	A	28-12-2011
			CN	102712858	A	03-10-2012
			CO	6400153	A2	15-03-2012
			CO	6400156	A2	15-03-2012
			EP	2370554	A2	05-10-2011
			EP	2370555	A2	05-10-2011
			JP	2012510275	A	10-05-2012
			JP	2012513743	A	21-06-2012
			KR	20110091567	A	11-08-2011
			KR	20110096555	A	30-08-2011
			SG	171428	A1	28-07-2011
			SG	171430	A1	28-07-2011
			US	2010151112	A1	17-06-2010
			US	2010151535	A1	17-06-2010
			US	2010151538	A1	17-06-2010
			US	2010151539	A1	17-06-2010
			US	2010151567	A1	17-06-2010
			US	2011165634	A1	07-07-2011
			US	2011203168	A1	25-08-2011
			US	2011250658	A1	13-10-2011
			US	2012277453	A1	01-11-2012
			US	2012283460	A1	08-11-2012
			WO	2010063031	A2	03-06-2010
			WO	2010063032	A2	03-06-2010
WO 2009121066	A1	01-10-2009	CN	101983239	A	02-03-2011
			EP	2254995	A1	01-12-2010
			JP	2011516045	A	26-05-2011
			US	2011014667	A1	20-01-2011
			WO	2009121066	A1	01-10-2009

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2012/065933

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07K14/21 C12N9/00 C12P7/62
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07K C12N C12P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHNEIDER S ET AL: "Biocatalyst engineering by assembly of fatty acid transport and oxidation activities for in vivo application of cytochrome P-450BM-3 monooxygenase", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 64, Nr. 10, 1. Oktober 1998 (1998-10-01), Seiten 3784-3790, XP002645599, ISSN: 0099-2240	1-6,10, 12,13
Y	das ganze Dokument Tabellen 1,2	1-13

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
15. Januar 2013	22/01/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Giebeler, Katharina

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHRIS GRANT ET AL: "Whole-cell bio-oxidation of n-dodecane using the alkane hydroxylase system ofGPo1 expressed in", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, Bd. 48, Nr. 6, 31. Januar 2011 (2011-01-31), Seiten 480-486, XP028384660, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2011.01.008 [gefunden am 2011-02-17]	1-6, 11-13
Y	das ganze Dokument	1-13

X	BELLEN VAN J B ET AL: "DNA SEQUENCE DETERMINATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE OCT-PLASMID-ENCODED ALKJKL GENES OF PSEUDOMONAS OLEOVORANS", MOLECULAR MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, Bd. 6, Nr. 21, 1. Januar 1992 (1992-01-01) , Seiten 3121-3136, XP001098364, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1111/J.1365-2958.1992.TB01769.X	1-6, 10-13
Y	das ganze Dokument Seite 3129	1-13

X	EP 0 277 674 A1 (UNIV GRONINGEN [NL]) 10. August 1988 (1988-08-10)	1-6, 11-13
Y	das ganze Dokument Seite 3, Zeilen 2-14 Seite 5, Zeilen 13-33	1-13

Y,P	JULSING MATTIJS K ET AL: "Outer Membrane Protein AlkL Boosts Biocatalytic Oxyfunctionalization of Hydrophobic Substrates in Escherichia coli", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 78, Nr. 16, 1. August 2012 (2012-08-01), Seiten 5724-5733, XP009164655, ISSN: 0099-2240 das ganze Dokument	1-13

Y,P	WO 2011/131420 A1 (EVONIK DEGUSSA GMBH [DE]; POETTER MARKUS [DE]; SCHMID ANDREAS [DE]; BU) 27. Oktober 2011 (2011-10-27) das ganze Dokument	1-13

	-/--	

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	REBECCA M. LENNEN ET AL: "A process for microbial hydrocarbon synthesis: Overproduction of fatty acids in Escherichia coli and catalytic conversion to alkanes", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 106, Nr. 2, 1. Juni 2010 (2010-06-01), Seiten 193-202, XP055003869, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22660 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-13
Y	ERIC J. STEEN ET AL: "Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass", NATURE, Bd. 463, Nr. 7280, 28. Januar 2010 (2010-01-28), Seiten 559-562, XP055011271, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature08721 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-13
Y	WO 2010/063031 A2 (SOLAZYME INC [US]; FRANKLIN SCOTT [US]; SOMANCHI ARAVIND [US]; ESPINA) 3. Juni 2010 (2010-06-03) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-13
Y	WO 2009/121066 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; KATZ LEONARD [US]; FORTMAN JEFFREY L [US]; KEASL) 1. Oktober 2009 (2009-10-01) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-13
A	NEHER TRACY M ET AL: "Pseudomonas fluorescens ompW: plasmid localization and requirement for naphthalene uptake", CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, NRC RESEARCH PRESS, CA, Bd. 55, Nr. 5, 1. Mai 2009 (2009-05-01), Seiten 553-563, XP009149676, ISSN: 0008-4166 das ganze Dokument -----	1-13
A	BEILEN VAN J B ET AL: "GENETICS OF ALKANE OXIDATION BY PSEUDOMONAS OLEOVORANS", BIODEGRADATION, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, Bd. 5, Nr. 3/04, 1. Dezember 1994 (1994-12-01), Seiten 161-174, XP001001243, ISSN: 0923-9820, DOI: 10.1007/BF00696457 das ganze Dokument -----	1-13

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2012/065933

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0277674 A1	10-08-1988	CA 1297439 C	17-03-1992
		DE 3853548 D1	18-05-1995
		DE 3853548 T2	21-09-1995
		EP 0277674 A1	10-08-1988
		JP 2790630 B2	27-08-1998
		JP 63273483 A	10-11-1988
		NL 8700085 A	01-08-1988
		US 5032512 A	16-07-1991
WO 2011131420 A1	27-10-2011	CA 2796777 A1	27-10-2011
		DE 102010015807 A1	20-10-2011
		TW 201207105 A	16-02-2012
		WO 2011131420 A1	27-10-2011
WO 2010063031 A2	03-06-2010	AU 2009319721 A1	03-06-2010
		AU 2009319722 A1	03-06-2010
		CA 2745040 A1	03-06-2010
		CA 2745129 A1	03-06-2010
		CN 102300996 A	28-12-2011
		CN 102712858 A	03-10-2012
		CO 6400153 A2	15-03-2012
		CO 6400156 A2	15-03-2012
		EP 2370554 A2	05-10-2011
		EP 2370555 A2	05-10-2011
		JP 2012510275 A	10-05-2012
		JP 2012513743 A	21-06-2012
		KR 20110091567 A	11-08-2011
		KR 20110096555 A	30-08-2011
		SG 171428 A1	28-07-2011
		SG 171430 A1	28-07-2011
		US 2010151112 A1	17-06-2010
		US 2010151535 A1	17-06-2010
		US 2010151538 A1	17-06-2010
		US 2010151539 A1	17-06-2010
		US 2010151567 A1	17-06-2010
		US 2011165634 A1	07-07-2011
		US 2011203168 A1	25-08-2011
		US 2011250658 A1	13-10-2011
		US 2012277453 A1	01-11-2012
		US 2012283460 A1	08-11-2012
		WO 2010063031 A2	03-06-2010
		WO 2010063032 A2	03-06-2010
WO 2009121066 A1	01-10-2009	CN 101983239 A	02-03-2011
		EP 2254995 A1	01-12-2010
		JP 2011516045 A	26-05-2011
		US 2011014667 A1	20-01-2011
		WO 2009121066 A1	01-10-2009