

## III TRENDANALYSE

# „Bio-Technologien“ ebnen den Weg zur Bioökonomie

Wie sich ganze Industrien durch biotechnologische Methoden verändern werden.

Angeichts der Negativtrends, die mit der Bevölkerungsexplosion einhergehen, ist das Konzept der Bioökonomie zur notwendigen Vision geworden.<sup>[1-3]</sup> Gemeint ist der Wandel zur nachhaltig ressourceneffizienten Herstellung von Nahrungsmitteln, biobasierten Industrieprodukten und Energieträgern aus Biomasse.

Ohne große wissenschaftlich-technische Durchbrüche wird diese Umstellung nicht gelingen, und der Erfolg hängt ganz entscheidend von den Innovationen der Biotechnologie ab.

### Die Schlüsselrolle der Biotechnologie

Entlang der Wertschöpfungsketten der Bioökonomie müssen Pflanzenbiotechnologie, industrielle Biotechnologie, Lebensmittelbiotechnologie und Bioverfahrenstechnik die dringend benötigten Lösungen liefern. Das kombinierte Know-how aus Biologie, chemischer Verfahrenstechnik und Materialwissenschaften verspricht neue, effiziente Herstellungsprozesse bis hin zu Bioraffinerien, die Biomasse in ein Spektrum verschiedener Produkte konvertieren.<sup>[4]</sup> Viele Produktstammbäume der Chemieindustrie werden von biobasierten Plattformchemikalien ausgehen; Biotransformationen und Biokatalyse werden immer mehr chemische Syntheseschritte ersetzen.

Optimierte Nutzpflanzen und Algen als Rohstofflieferanten bilden das Fundament der Bioökonomie. Sie sollten hinsichtlich Bodenqualität und Wasserbedarf genügsam sein, gleichzeitig aber möglichst große Mengen Biomasse oder interessanter Substanzen produzieren<sup>[5-9]</sup> – nicht zuletzt, um Zielkonflikte mit der Nahrungsmittelproduktion zu vermeiden.<sup>[10]</sup> Für ihre Entwicklung setzt man auf moderne biotechnologische Züchtungsverfahren.<sup>[11, 12]</sup>

Sowohl in der Pflanzenbiotechnologie als auch in der industriellen Biotechnologie zeichnen sich die größten Fortschritte durch das *metabolic engineering* und die „Synthe-



tische Biologie“ ab. Diese Ansätze sollen nachfolgend kurz beleuchtet werden.

Der rationale Entwurf, die gezielte Konstruktion ist zum Wesensmerkmal der modernen Biotechnologie geworden. In dem Maße, wie systembiologische Modelle und die Strukturaufklärung von Biomolekülen zu neuen Einsichten verhelfen, entwickelt sie sich zu einer quantitativen Disziplin. Die Konvergenz von Molekularbiologie und Ingenieurwissenschaften eröffnet ganz neue Möglichkeiten für die Entwicklung biologischer Produktionssysteme.

Diese Arbeiten werden oftmals unter *metabolic engineering* und „Synthetische Biologie“ zusammengefasst.<sup>[13-19]</sup> Treibende Kraft dahinter sind die immensen technologischen Fortschritte bei der Entschlüsselung von Genomen und bei der Synthese maßgeschneiderter Erb moleküle.

### Revolutionäre Technologien

Der Wettbewerb der verschiedenen Technologien hat den Zeitaufwand für DNA-Sequenzierungen stark verkürzt.<sup>[20]</sup> Die neuesten Verfahren basieren auf Nanoporen,

durch die lange DNA-Stränge gezogen und Nukleotid für Nukleotid abgelesen werden.<sup>[21-24]</sup> Damit ist die Sequenzierung mikrobieller Genome nur noch eine Frage von Stunden und selbst humane Genome sind in wenigen Tagen sequenzierbar. Eine wichtige Anwendung ist die Analyse von Metagenomen zur Identifikation bislang unbekannter Biosynthesegene oder zur Charakterisierung von Konsortien mikrobieller Organismen, die in biotechnischen Verfahren zusammenwirken.<sup>[25]</sup> Die Verfügbarkeit der leistungsfähigen, robusten und kostengünstigen Sequenzierungstechnologien kann in ihren Folgen kaum abgeschätzt werden. Fest steht, dass sie die Biomedizin und Biotechnologie enorm beschleunigen.<sup>[26]</sup> Ebenso beeindruckende Fortschritte gibt es bei der Synthese von langen Polynukleotiden. DNA-Stränge mit Millionen Basenpaaren sind bereits synthetisch zugänglich. Das bedeutet eine Revolution für die Biotechnologie. Nicht nur Gene und Gencluster, sondern auch Chromosomen, komplette Viren- und Bakteriengenome lassen sich herstellen.<sup>[27-32]</sup> Molekulare Werkzeuge für den zielgerichteten Umbau ganzer Genome, das sogenannte *genome engineering*, sind ebenfalls verfügbar.<sup>[33-35]</sup> So hat man Recombinase-Systeme entwickelt, um fremde DNA-Abschnitte genau plaziert in die Chromosomen von Bakterien und höheren Zellen zu integrieren.<sup>[36-40]</sup>

### Neue Stoffwechselwege in Produktionsorganismen

Die Möglichkeiten dieser Technologien erscheinen grenzenlos: Mühevoll-prozeduren der traditionellen Gentechnik entfallen, das Programmieren von Zellen und der rationale Aufbau von Biosynthesesystemen werden wesentlich erleichtert.<sup>[41, 42]</sup> Die Konstruktion neuartiger Produktionsorganismen, „Minimalorganismen“ und „Chassis-Organismen“ wird damit ebenfalls möglich.<sup>[43-45]</sup>

Ein Meilenstein war die Synthese des kompletten *Mycoplasma genitalium*-Genoms und der Transfer des synthetisch her-

## Die Autoren



**Prof. Dr. Thomas Scheper** lehrt Technische Chemie an der Universität Hannover, wo er zwischen 1976 und 1981 auch Chemie studierte. Nach der Promotion und Habilitation in der niedersächsischen Landeshauptstadt wurde er 1992 hier auch zum Professor berufen. Scheper ist Vorsitzender der Fachgemeinschaft Biotechnologie in der Dechema. **Prof. Dr. Kurt Wagemann** ist Geschäftsführer der Dechema. Er wurde 1959 geboren. Wagemann studierte Chemie an der LMU München, fertigte seine Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Gerhard Ertl an und promovierte anschließend am Max-Planck-Institut für Quantenoptik. 1989 trat er in die Dechema ein, wo er verschiedene Positionen in den Bereichen Forschungsplanung und Forschungsförderung bekleidete. Anfang 2011 wurde Wagemann zum Honorarprofessor der Universität Stuttgart berufen.



gestellten Genoms in Empfänger-Bakterienzellen.<sup>[30,31]</sup> Auf große Resonanz stießen auch die Arbeiten zur Gewinnung einer Vorstufe des Antimalaria-Wirkstoffs Artemisinin mit Hilfe eines rational konstruierten Biosynthese-Genclusters.<sup>[46]</sup> Es ist übrigens auch ein gutes Beispiel für das Zusammenspiel von moderner Biotechnologie und chemischer Verfahrenstechnik, denn der letzte Syntheseschritt zum Artemisinin ist nur dank eines photochemischen Verfahrens in guten Ausbeuten möglich.<sup>[47]</sup> Eine andere absehbare Anwendung sind saisonal variable Impfstoffe, die durch entsprechend programmierte bakterielle Produzenten termingerecht hergestellt werden können.<sup>[48]</sup>

Die Herstellung von hochwertigen Substanzen, Synthesebausteinen und Energieträgern unter Einsatz von *metabolic engineering* und den Methoden der Synthetischen Biologie ist zu einem sehr dynamischen Feld geworden.<sup>[14, 15, 45, 49-53]</sup> Neben Artemisinin sind auf diesem Weg wertvolle Naturstoffe wie Taxol und Omega-Fettsäuren biotechnisch herstellbar.<sup>[52]</sup> In Arbeit sind maßgeschneiderte Produktionsorganismen zur Gewinnung von Terpenen, Alkaloiden und Steroiden für die Pharmaindustrie.<sup>[54, 55]</sup> Mit Hilfe zusätzlich integrierter Biosyntheseschritte lassen sie sich sogar *in vivo* chemisch modifizieren, so dass man zu ganz neuartigen Verbindungen kommt.<sup>[56]</sup> Neuartig müssen auch die Antibiotika sein, die man durch das „Engineering“ von Biosynthese-Genclustern im Erbgut von geeigneten Produzenten erhalten will. Die Synthetische Biologie verspricht hier den schnellsten Zugang zu einer großen Zahl hochkomplexer Verbindungen.<sup>[57, 58]</sup>

Zahlreiche Synthesebausteine der Chemieindustrie lassen sich mit „Designer-Organismen“ herstellen. Zu den Produkten

zählen Aminosäuren, Bernsteinsäure, Milchsäure, Adipin-, Glucar- und Itaconsäure, Terpene wie das Isopren zur Gummierstellung, 1,3-Propanediol oder die biogenen Amine 1,4-Diaminobutan und 1,5-Diaminopentan.<sup>[49,50]</sup> Hinzu kommen mikrobiell produzierte Polyester und Polyamide, darunter Polymilchsäureester (PLA) und Polyhydroxybuttersäureester (PHB).<sup>[50,59]</sup> *Metabolic engineering* nutzt man auch zur Entwicklung von Mikroorganismen, die in der Lage sind, Umweltschiffe abzubauen, indem katabolische Stoffwechselwege unterschiedlicher Organismen kombiniert werden.<sup>[60]</sup> Erhebliche Forschungsmittel der Industrie fließen in die Entwicklung von Biokraftstoffen mittels Synthetischer Biologie.<sup>[61,62]</sup> Die produzierten Energieträger sind Wasserstoff, Ethanol, Butanol und verzweigte Alkohole, aber auch Methan und höhere Alkane.<sup>[63-66]</sup>

Als mikrobielle Produzenten dienen zahlreiche Bakterien, ebenso wie Hefen und andere Pilzarten, z. B. *Aspergillus*-Stämme. Von Interesse sind auch Verwerter ungewöhnlicher Substrate wie Xylose.<sup>[67,68]</sup> Bei der Gewinnung von Energieträgern konzentriert sich die Forschung auf Cyanobakterien und Mikroalgen, die neben Nährsalzen nur die Energie des Sonnenlichts, Wasser und Kohlendioxid<sup>[69]</sup> zum Wachstum benötigen.<sup>[70, 71]</sup> Darüber hinaus werden Pflanzen als grüne Bioreaktoren zur Produktion von Proteinen, z.B. Impfstoffen und Pharmazeutika, und hochwertigen Feinchemikalien entwickelt.<sup>[72-76]</sup> Andere Ansätze verfolgen den Aufbau von Gemeinschaften von „Designer-Organismen“<sup>[77,78]</sup>, die sich z. B. zur Verwertung von Lignocellulose-haltiger Biomasse einsetzen lassen.<sup>[79]</sup>

Die modernen Technologien der DNA-Synthese und des *genome engineering* erlauben auch die Integration sogenannter orthogona-

ler Biosynthesen in Produktionsorganismen. Darunter versteht man den Aufbau eines zusätzlichen unabhängigen Proteinsyntheseapparats, der den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren in Proteine ermöglicht, z. B. indem alternative genetische Codes genutzt werden.<sup>[80,81]</sup> Auch gelang es bereits, Erbmoleküle aus nicht-natürlichen Nukleotidanaloga aufzubauen, die wie natürliche DNA von Polymerasen vermehrt werden.<sup>[82,83]</sup>

## Molekulare Spezialwerkzeuge

Die moderne molekulare Biotechnologie konstruiert viele ihrer Werkzeuge selbst. Ein Beispiel sind die bereits erwähnten Recombinasen. Zahlreiche technisch genutzte Enzyme sind das Ergebnis molekular-evolutiver Optimierung einer Methode, die sich in den vergangenen 15 Jahren breit durchgesetzt hat und sich u. a. zur Umfunktionalisierung natürlicher Enzyme eignet.<sup>[84-88]</sup> Das Computerbasierte rationale Design neuartiger Enzyme auf Grundlage von Strukturdaten natürlicher Proteine bleibt hingegen noch eine große Herausforderung.<sup>[89-92]</sup> Dank leistungsfähiger Informatik und stetig wachsender Proteinstrukturdatenbanken gibt es erste Erfolge.<sup>[93-97]</sup> So konnte kürzlich über weltweit verteilte Computerberechnung die Struktur einer Diels-Alderase ermittelt werden, die im Vergleich zum Ausgangsenzym deutlich aktiver war und zusätzliche, neuartige Strukturelemente enthielt.<sup>[98]</sup> Selbst wenn man die Möglichkeiten der Kombination mit organometallischen Katalysatoren oder den Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren ausklammert, ist das Potential des *Protein designs* endlos. Maßgeschneiderte Enzyme für jede beliebige biokatalytische Stoffumwandlung würden damit konstruierbar werden und die Prozessindustrien umwälzen.

## Fazit

Die moderne Biotechnologie durchläuft gerade eine Phase stürmischer technologiegetriebener Innovation, die sie zu einer konstruktiven Ingenieurdisziplin wandelt. Sie hat damit das Potential, die dringend benötigten Lösungen hervorzubringen, um die Vision einer künftigen Bioökonomie Realität werden zu lassen. Die einzige Grenze auf diesem Weg ist unsere Vorstellungskraft.

## Quellen

Ein PDF des Artikels inklusive Literaturliste steht unter [www.transkript.de/spezial](http://www.transkript.de/spezial) als auch unter <http://biotech.dechema.de/Publikationen.html> zum Download bereit. ■

## Quellenverzeichnis

### **Bio-Technologien ebnen den Weg zur Bioökonomie (transkript 7/2012, 42-43)**

1. **En Route To The Knowledge-Based Bio-Economy**, (German Presidency of the Council of the European Union, 2007).
2. **Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030**, (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin, 2010).
3. **National Bioeconomy Blueprint**, (The White House, Washington DC, 2012).
4. Bozell, J.J. & Petersen, G.R. **Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited**. *Green Chemistry* **12**, 539 (2010).
5. Sinclair, T.R. **Challenges in breeding for yield increase for drought**. *Trends Plant Sci* **16**, 289-293 (2011).
6. Peterhansel, C. & Offermann, S. **Re-engineering of carbon fixation in plants - challenges for plant biotechnology to improve yields in a high-CO(2) world**. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 204-208 (2012).
7. Deikman, J., Petracek, M. & Heard, J.E. **Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields**. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 243-250 (2012).
8. Covshoff, S. & Hibberd, J.M. **Integrating C(4) photosynthesis into C(3) crops to increase yield potential**. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 209-214 (2012).
9. Munns, R., et al. **Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na(+) transporter gene**. *Nat Biotechnol* **30**, 360-364 (2012).
10. Foley, J.A., et al. **Solutions for a cultivated planet**. *Nature* **478**, 337-342 (2011).
11. Lusser, M., Parisi, C., Plan, D. & Rodriguez-Cerezo, E. **Deployment of new biotechnologies in plant breeding**. *Nat Biotechnol* **30**, 231-239 (2012).
12. Gruskin, D. **Agbiotech 2.0**. *Nat Biotechnol* **30**, 211-214 (2012).
13. Khalil, A.S. & Collins, J.J. **Synthetic biology: applications come of age**. *Nat Rev Genet* **11**, 367-379 (2010).
14. Keasling, J.D. **Manufacturing molecules through metabolic engineering**. *Science* **330**, 1355-1358 (2010).
15. Nielsen, J. & Keasling, J.D. **Synergies between synthetic biology and metabolic engineering**. *Nat Biotechnol* **29**, 693-695 (2011).
16. Keasling, J.D. **Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering**. *Metab Eng* **14**, 189-195 (2012).
17. Lynch, S.A. & Gill, R.T. **Synthetic biology: New strategies for directing design**. *Metab Eng* **14**, 205-211 (2012).
18. Boyle, P.M. & Silver, P.A. **Parts plus pipes: Synthetic biology approaches to metabolic engineering**. *Metab Eng* **14**, 223-232 (2012).
19. a) Yadav, V.G. & Stephanopoulos, G. **Reevaluating synthesis by biology**. *Curr Opin Microbiol* **13**, 371-376 (2010).  
b) Yadav, V.G., De Mey, M., Giaw Lim, C., Kumaran Ajikumar, P. & Stephanopoulos, G. **The future of metabolic engineering and synthetic biology: Towards a systematic practice**. *Metab Eng* **14**, 233-241 (2012).
20. Metzker, M.L. **Sequencing technologies - the next generation**. *Nat Rev Genet* **11**, 31-46 (2010).
21. Branton, D., et al. **The potential and challenges of nanopore sequencing**. *Nat Biotechnol* **26**, 1146-1153 (2008).
22. Rothberg, J.M., et al. **An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing**. *Nature* **475**, 348-352 (2011).
23. Manrao, E.A., et al. **Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase**. *Nat Biotechnol* **30**, 349-353 (2012).
24. Pennisi, E. **Search for Pore-fection**. *Science* **336**, 534-537 (2012).
25. Sabra, W., Dietz, D., Tjahjasari, D. & Zeng, A.-P. **Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology**. *Engineering in Life Sciences* **10**, 407-421 (2010).
26. Mardis, E.R. **A decade's perspective on DNA sequencing technology**. *Nature* **470**, 198-203 (2011).
27. a) Tian, J., Ma, K. & Saaem, I. **Advancing high-throughput gene synthesis technology**. *Mol Biosyst* **5**, 714-722 (2009).  
b) Ma, S., Tang, N. & Tian, J. **DNA synthesis, assembly and applications in synthetic biology**. *Curr Opin Chem Biol* (2012). doi: 10.1016/j.cbpa.2012.05.001
28. Cello, J., Paul, A.V. & Wimmer, E. **Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template**. *Science* **297**, 1016-1018 (2002).
29. Wimmer, E. & Paul, A.V. **Synthetic poliovirus and other designer viruses: what have we learned from them?** *Annu Rev Microbiol* **65**, 583-609 (2011).
30. Gibson, D.G., et al. **Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome**. *Science* **319**, 1215-1220 (2008).
31. Gibson, D.G., et al. **Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome**. *Science* **329**, 52-56 (2010).

32. Merryman, C. & Gibson, D.G. **Methods and applications for assembling large DNA constructs.** *Metab Eng* **14**, 196-204 (2012).
33. a) Carr, P.A. & Church, G.M. **Genome engineering.** *Nat Biotechnol* **27**, 1151-1162 (2009).  
b) Cambray, G., Mutalik, V.K. & Arkin, A.P. **Toward rational design of bacterial genomes.** *Curr Opin Microbiol* **14**, 624-630 (2011)  
c) Feher, T., Burland, V. & Posfai, G. **In the fast lane: Large-scale bacterial genome engineering.** *J Biotechnol* **160**, 72-79 (2012).  
d) Perez-Pinera, P., Ousterout, D.G. & Gersbach, C.A. **Advances in targeted genome editing.** *Curr Opin Chem Biol* (2012).
34. a) Buchholz, F. **Engineering DNA processing enzymes for the postgenomic era.** *Curr Opin Biotechnol* **20**, 383-389 (2009).  
b) Mercer, A.C., Gaj, T., Fuller, R.P. & Barbas, C.F., 3rd. **Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity.** *Nucleic Acids Res*, 11163-11172 (2012).
35. McMahon, M.A., Rahdar, M. & Porteus, M. **Gene editing: not just for translation anymore.** *Nat Meth* **9**, 28-31 (2012).
36. Albermann, C. **Integration von Expressionskassetten in das Chromosom von Escherichia coli.** *BIOspektrum* **17**, 171-173 (2011).
37. Lemuth, K., Steuer, K. & Albermann, C. **Engineering of a plasmid-free Escherichia coli strain for improved in vivo biosynthesis of astaxanthin.** *Microb Cell Fact* **10**, 29 (2011).
38. Noll, S., Hampp, G., Zeppenfeld, T. & Kranz, H. **Recombineering – auf dem Weg zur E. coli-Zellfabrik** *BIOspektrum*, 411-413 (2009).
39. Cobb, R.E. & Zhao, H. **Direct cloning of large genomic sequences.** *Nat Biotechnol* **30**, 405-406 (2012).
40. Sukhija, K., et al. **Developing an Extended Genomic Engineering Approach Based on Recombineering to Knock-in Heterologous Genes to Escherichia coli Genome.** *Mol Biotechnol* **51**, 109-118 (2012).
41. **Unbottling the genes.** *Nat Biotechnol* **27**, 1059 (2009).
42. a) Prather, K.L. & Martin, C.H. **De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories.** *Curr Opin Biotechnol* **19**, 468-474 (2008).  
b) Klein-Marcuschamer, D., Yadav, V.G., Ghaderi, A. & Stephanopoulos, G.N. **De novo metabolic engineering and the promise of synthetic DNA.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* **120**, 101-131 (2010).
43. Glass, J.I., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O. & Venter, J.C. **A systems biology tour de force for a near-minimal bacterium.** *Mol Syst Biol* **5**, 330 (2009).
44. Jewett, M.C. & Forster, A.C. **Update on designing and building minimal cells.** *Curr Opin Biotechnol* **21**, 697-703 (2010).
45. Vickers, C.E., Blank, L.M. & Kromer, J.O. **Grand challenge commentary: Chassis cells for industrial biochemical production.** *Nat Chem Biol* **6**, 875-877 (2010).
46. Ro, D.K., et al. **Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast.** *Nature* **440**, 940-943 (2006).
47. Levesque, F. & Seeberger, P.H. **Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin.** *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 1706-1709 (2012).
48. Kindsmuller, K. & Wagner, R. **Synthetic biology: impact on the design of innovative vaccines.** *Hum Vaccin* **7**, 658-662 (2011).
49. Pickens, L.B., Tang, Y. & Chooi, Y.-H. **Metabolic Engineering for the Production of Natural Products.** *Ann Rev Chem Biomol Eng* **2**, 211-236 (2011).
50. a) Lee, J.W., Kim, H.U., Choi, S., Yi, J. & Lee, S.Y. **Microbial production of building block chemicals and polymers.** *Curr Opin Biotechnol* **22**, 758-767 (2011).  
b) Lee, J.W., et al. **Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals.** *Nat Chem Biol* **8**, 536-546 (2012).
51. French, C.E. **Synthetic biology and biomass conversion: a match made in heaven?** *J R Soc Interface* **6 Suppl 4**, S547-558 (2009).
52. Ye, V.M. & Bhatia, S.K. **Metabolic engineering for the production of clinically important molecules: Omega-3 fatty acids, artemisinin, and taxol.** *Biotechnol J* **7**, 20-33 (2012).
53. Lee, J.W., Kim, T.Y., Jang, Y.S., Choi, S. & Lee, S.Y. **Systems metabolic engineering for chemicals and materials.** *Trends Biotechnol* **29**, 370-378 (2011).
54. Misawa, N. **Pathway engineering for functional isoprenoids.** *Curr Opin Biotechnol* **22**, 627-633 (2011).
55. Leonard, E., Runguphan, W., O'Connor, S. & Prather, K.J. **Opportunities in metabolic engineering to facilitate scalable alkaloid production.** *Nat Chem Biol* **5**, 292-300 (2009).
56. a) Runguphan, W., Qu, X. & O'Connor, S.E. **Integrating carbon-halogen bond formation into medicinal plant metabolism.** *Nature* **468**, 461-464 (2010).  
b) Heide, L., et al. **Use of a halogenase of hormaomycin biosynthesis for formation of new clorobiocin analogues with 5-chloropyrrole moieties.** *Chembiochem* **9**, 1992-1999 (2008).
57. Medema, M.H., Breitling, R., Bovenberg, R. & Takano, E. **Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms.** *Nat Rev Microbiol* **9**, 131-137 (2011).
58. Medema, M.H., Alam, M.T., Breitling, R. & Takano, E. **The future of industrial antibiotic production: from random mutagenesis to synthetic biology.** *Bioeng Bugs* **2**, 230-233 (2011).
59. Zhou, X.Y., et al. **Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant Escherichia coli.** *Microb Cell Fact* **11**, 54 (2012).
60. Copley, S.D. **Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals.** *Nat Chem Biol* **5**, 559-566 (2009).

61. a) Zhang, F., Rodriguez, S. & Keasling, J.D. **Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production.** *Curr Opin Biotechnol* **22**, 775-783 (2011).  
b) McEwen, J.T. & Atsumi, S. **Alternative biofuel production in non-natural hosts.** *Curr Opin Biotechnol* **23** (2012). in press
62. Dellomonaco, C., Fava, F. & Gonzalez, R. **The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology.** *Microb Cell Fact* **9**, 3 (2010).
63. Steen, E.J., et al. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol.** *Microb Cell Fact* **7**, 36 (2008).
64. Zhang, K., Sawaya, M.R., Eisenberg, D.S. & Liao, J.C. **Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20653-20658 (2008).
65. van Leeuwen, B.N., van der Wulp, A.M., Duijnste, I., van Maris, A.J. & Straathof, A.J. **Fermentative production of isobutene.** *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1377-1387 (2012).
66. Schirmer, A., Rude, M.A., Li, X., Popova, E. & del Cardayre, S.B. **Microbial biosynthesis of alkanes.** *Science* **329**, 559-562 (2010).
67. Steen, E.J., et al. **Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass.** *Nature* **463**, 559-562 (2010).
68. a) Hahn-Hägerdal, B., et al. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization.** in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 73 (eds. Nielsen, J., et al.) 53-84 (Springer Berlin / Heidelberg, 2001).  
b) Zhou, H., Cheng, J.S., Wang, B., Fink, G.R. & Stephanopoulos, G. **Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Metab Eng* **14**, 611-622 (2012).
69. Atsumi, S., Higashide, W. & Liao, J.C. **Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde.** *Nat Biotechnol* **27**, 1177-1180 (2009).
70. Ducat, D.C., Way, J.C. & Silver, P.A. **Engineering cyanobacteria to generate high-value products.** *Trends Biotechnol* **29**, 95-103 (2011).
71. Angermayr, S.A., Hellingwerf, K.J., Lindblad, P. & de Mattos, M.J. **Energy biotechnology with cyanobacteria.** *Curr Opin Biotechnol* **20**, 257-263 (2009).
72. Rybicki, E.P. **Plant-produced vaccines: promise and reality.** *Drug Discov Today* **14**, 16-24 (2009).
73. Daniell, H., Singh, N.D., Mason, H. & Streatfield, S.J. **Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals.** *Trends Plant Sci* **14**, 669-679 (2009).
74. Sharma, A.K. & Sharma, M.K. **Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities.** *Biotechnol Adv* **27**, 811-832 (2009).
75. Maxmen, A. **Drug-making plant blooms.** *Nature* **485**, 160 (2012).
76. Lim, E.K. & Bowles, D. **Plant production systems for bioactive small molecules.** *Curr Opin Biotechnol* **23**, 271-277 (2012).
77. a) Brenner, K., You, L. & Arnold, F.H. **Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology.** *Trends Biotechnol* **26**, 483-489 (2008).  
b) Shong, J., Jimenez Diaz, M.R. & Collins, C.H. **Towards synthetic microbial consortia for bioprocessing.** *Curr Opin Biotechnol* (2012).  
c) Zuroff, T.R. & Curtis, W.R. **Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production.** *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 1423-1435 (2012).
78. a) Mee, M.T. & Wang, H.H. **Engineering Ecosystems and Synthetic Ecologies.** *Mol BioSyst*, published on the web 22 May (2012).  
b) Chuang, J.S. **Engineering multicellular traits in synthetic microbial populations.** *Curr Opin Chem Biol* **16**, (2012) published on the web 5 June (2012) doi: 10.1016/j.cbpa.2012.04.002
79. Elkins, J.G., Raman, B. & Keller, M. **Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass.** *Curr Opin Biotechnol* **21**, 657-662 (2010).
80. a) Liu, C.C. & Schultz, P.G. **Adding new chemistries to the genetic code.** *Annu Rev Biochem* **79**, 413-444 (2010).  
b) Hoesl, M.G. & Budisa, N. **Recent advances in genetic code engineering in *Escherichia coli*.** *Curr Opin Biotechnol* (2012). doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.027
81. Wang, K., Schmied, W.H. & Chin, J.W. **Reprogramming the Genetic Code: From Triplet to Quadruplet Codes.** *Angew Chem Int Ed* **51**, 2288-2297 (2012).
82. Marliere, P., et al. **Chemical evolution of a bacterium's genome.** *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 7109-7114 (2011).
83. a) Pinheiro, V.B., et al. **Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution.** *Science* **336**, 341-344 (2012).  
b) Pinheiro, V.B. & Holliger, P. **The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers.** *Curr Opin Chem Biol* (2012).
84. Jackel, C. & Hilvert, D. **Biocatalysts by evolution.** *Curr Opin Biotechnol* **21**, 753-759 (2010).
85. a) Golynskiy, M.V. & Seelig, B. **De novo enzymes: from computational design to mRNA display.** *Trends Biotechnol* **28**, 340-345 (2010).  
b) Smith, B.A. & Hecht, M.H. **Novel proteins: from fold to function.** *Curr Opin Chem Biol* **15**, 421-426 (2011).  
c) Saven, J.G. **Computational protein design: engineering molecular diversity, nonnatural enzymes, nonbiological cofactor complexes, and membrane proteins.** *Curr Opin Chem Biol* **15**, 452-457 (2011).

86. Kourist, R., Höhne, M. & Bornscheuer, U. **Gerichtete Evolution und rationales Design. Maßgeschneiderte Enzyme.** *Chemie in unserer Zeit* **43**, 132-142 (2009).
87. a) Strohmeier, G.A., Pichler, H., May, O. & Gruber-Khadjawi, M. **Application of designed enzymes in organic synthesis.** *Chem Rev* **111**, 4141-4164 (2011).  
b) Bommarius, A.S., Blum, J.K. & Abrahamson, M.J. **Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst.** *Curr Opin Chem Biol* **15**, 194-200 (2011).  
c) Nestl, B.M., Nebel, B.A. & Hauer, B. **Recent progress in industrial biocatalysis.** *Curr Opin Chem Biol* **15**, 187-193 (2011).
88. Jochens, H., et al. **Converting an esterase into an epoxide hydrolase.** *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 3532-3535 (2009).
89. Suarez, M. & Jaramillo, A. **Challenges in the computational design of proteins.** *J R Soc Interface* **6** Suppl 4, S477-491 (2009).
90. Kazlauskas, R.J. & Bornscheuer, U.T. **Finding better protein engineering strategies.** *Nat Chem Biol* **5**, 526-529 (2009).
91. Lutz, S. **Beyond directed evolution -semi-rational protein engineering and design.** *Curr Opin Biotechnol* **21**, 734-743 (2010).
92. Bornscheuer, U.T., et al. **Engineering the third wave of biocatalysis.** *Nature* **485**, 185-194 (2012).
93. Rothlisberger, D., et al. **Kemp elimination catalysts by computational enzyme design.** *Nature* **453**, 190-195 (2008).
94. Jiang, L., et al. **De novo computational design of retro-aldol enzymes.** *Science* **319**, 1387-1391 (2008).
95. Siegel, J.B., et al. **Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction.** *Science* **329**, 309-313 (2010).
96. Khare, S.D., et al. **Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis.** *Nat Chem Biol* **8**, 294-300 (2012).
97. Privett, H.K., et al. **Iterative approach to computational enzyme design.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3790-3795 (2012).
98. Eiben, C.B., et al. **Increased Diels-Alderase activity through backbone remodeling guided by Foldit players.** *Nat Biotechnol* **30**, 190-192 (2012).