

Metagenomics für eine innovative und erfolgreiche Chemieindustrie

von Dr. Patrick Lorenz, Dr. Martin Langer und Dr. Jürgen Eck

Die Weiße Biotechnologie erlebt eine spannende Zeit und birgt das Potential, etablierte Industrien wie zum Beispiel die chemische Industrie oder die Nahrungsmittelindustrie nachhaltig in ihrer positiven Entwicklung zu unterstützen. Die industrielle Herstellung von Basis-, Fein- und Spezialchemikalien sowie Biokraftstoffen erfolgt immer häufiger unter Nutzung biotechnologischer Verfahren z.B. unter Verwendung isolierter Enzyme und Mikroorganismen und ergänzt dabei die klassische chemische Synthese. Dabei spielt die Identifizierung oder Darstellung geeigneter Biokatalysatoren sowie neuer, patentierbarer Enzyme eine immer wichtigere Rolle. Die vielversprechende genetische Ressource nicht-kultivierter Mikroorganismen, welche zur Zeit über 99% der gesamten Population ausmachen, mit ihrer unübersehbaren Vielfalt neuer, technisch anwendbarer Enzyme, Biokatalysatoren und Wirkstoffe ist dabei industriell von immer größer werdendem Interesse. Der durch die Metagenomik verbesserte Zugang zu der molekularen Diversität sowie der unerschöpflichen, biochemischen Kompetenz mikrobieller Systeme aus terrestrischen oder aquatischen Lebensräumen hat sich in den letzten Jahren als ein Schlüssel zum nachhaltigen Erfolg der Weißen Biotechnologie entwickelt.

Die Weiße Biotechnologie als nachhaltiger Wirtschaftsfaktor

Die Weiße Biotechnologie wird als einer der Innovationstreiber der chemischen Industrie diskutiert [1]. Schon seit einigen Jahren werden mit ihr signifikante und stetig steigende Umsätze erwirtschaftet. Gemäß einer 2006 publizierten Markt-

analyse von McKinsey wachsen die Umsätze, die mit Technologien der Weißen Biotechnologie erzielt werden, mit zweistelligen Prozentwerten pro Jahr. Bereits 2005 wurden 77 Mrd. US-\$ oder 7% der globalen Chemie-Umsätze mit Technologien und Produkten der Weißen Biotechnologie erwirtschaftet. Auch in einer Prognose für das Jahr 2010 sieht man bei dem Beratungsunternehmen mit weltweit 125 Mrd. US-\$ an dedizierten „Weiße Biotechnologie-Umsätzen“ innerhalb der chemischen Industrie ein großes und auch wachsendes Potential, was dann 10% aller globalen Chemie-Umsätze entspräche [2]. Enzyme und Biokatalysatoren finden dabei schon seit einigen Jahren vielseitige Anwendungen in unterschiedlichsten Industrien [3, 4]. Die globalen Umsätze an industriellen Enzymen wurden für das Jahr 2003 auf insgesamt 2,3 Milliarden US-\$ geschätzt [5]. Davon entfielen 789 Mio. US-\$ auf Enzyme für Wasch- und Reinigungsmittel, 634 Mio. US-\$ auf Enzyme in Lebensmittel-Anwendungen, 376 Mio. US-\$ auf den Bereich Landwirtschaft/Futtermittel, 237 Mio. US-\$ auf den Sektor Textilverarbeitung und kumulativ 222 Mio. US-\$ auf die Bereiche Holz- und Papierverarbeitung, Leder, Feinchemikalien u.a.

Während Enzymanwendungen in den Lebensmittel-, Futtermittel- und Detergenz-Industrien sich zumeist auf eine geringe Anzahl Substrate (überwiegend Biopolymere) und Reaktionsklassen (überwiegend Hydrolysen) fokussieren, sind die Substrat- und Umsetzungsanforderungen im Bereich der Feinchemie ungleich komplexer. Entsprechend hoch ist der Bedarf an effizienten Biokatalysatoren unterschiedlichster Spezifitäten, so daß mittlerweile die Biokatalyse als chemosynthetisches Werkzeug einen festen Platz im Technologie-Portfolio vieler Unternehmen der chemischen Industrie eingenommen hat [6-8]. Die klassische Mikrobiologie kommt dabei als Lieferant neuer technischer Enzyme und industriell relevanter Biokatalysatoren in den letzten Jahren immer mehr an ihre Grenzen, da neue Mikroorganismen als Quelle innovativer Enzyme und Wirkstoffe nur mühsam und aufwendig isoliert und beschrieben wurden. Die industriell interessanten Enzyme sind daher in ihrer Anzahl und Funktion sehr begrenzt, was die Identifizierung und Verwertung neuer, alternativer Quellen, wie z.B. Metagenome, in das Zentrum des Interesses rückt.

Die Metagenom-Technologie als Innovationsmotor

Erst vor wenigen Jahren wurde der Begriff Metagenom von Handelsman und Mitarbeitern in der wissenschaftlichen Welt etabliert [9]. Unter Metagenom versteht man demnach die Gesamtheit der Genome aller Mikroorganismen in einem Habitat (was so unterschiedliche Lebensräume wie Boden, Wiederkäuermagen, Termitendarm oder Meerwasser, uvm. darstellen kann) zu einem definierten Zeitpunkt. Unter „Metagenomics“ wird entsprechend die Anwendung der Technologien und Konzepte der Genomforschung auf Konsortien nicht-kultivierter Mikroorganismen zusammengefaßt.

Das primäre Ziel der Metagenomik ist die vollständige Abbildung, das heißt Klonierung der mikrobiellen genetischen Information in geeigneten Vektoren (z.B. Plasmide, Cosmide, BACs) und die Erstellung rekombinanter „Metagenombanken“ in gut kultivierbaren Ersatzwirten wie z.B. dem Darmbakterium *E. coli* (Abbildung 1). In nachfolgenden, iterativen Screening-Kampagnen werden diese Banken nach neuartigen Genen und Genprodukten für die Verwendung in diversen industriellen Anwendungsgebieten durchmustert [10, 11].

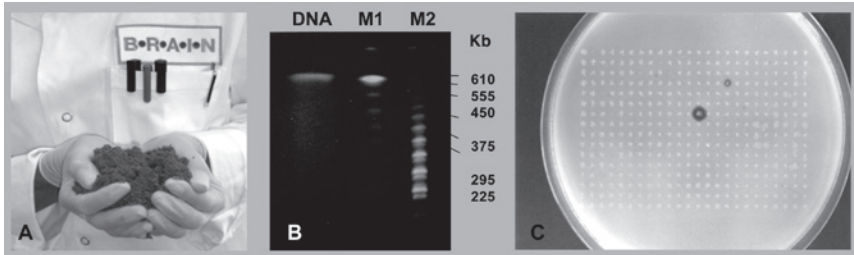


Abbildung 1: Extraktion von DNA zur Konstruktion und Durchmusterung von METAGENOME® Bibliotheken nach Quaiser et al. [12]. Aus einer Bodenprobe (A) wird die gesamte DNA des Habitates (Metagenom) isoliert und charakterisiert (B). Anschließend wird die DNA in Abhängigkeit der gesuchten Klasse an Genen in kleinere, 3 bis 12 kbp große Fragmente (für Aktivitäts-Basierte Expressions-Bibliotheken, ABEL®) oder in größere, 40 kbp große Fragmente (für LIL® - Bibliotheken) verdaut und in entsprechende Vektoren kloniert. Anschließend wird die Bibliothek in einem leicht kultivierbaren Mikroorganismus (z.B. *E. coli*) exprimiert. Ein aktivitätsbasiertes Screening ist beispielhaft in (C) dargestellt, wo einzelne Metagenom-Klone die gewünschte Enzymaktivität zeigen (Hofbildung).

Dem Metagenom-Ansatz kommt deshalb eine so hohe Wertstellung zu, weil die überwiegende Anzahl (oft über 99%) aller natürlich vorkommenden Mikroorganismen nicht oder nur sehr aufwendig isoliert und im Labor kultiviert werden kann [13-16], was eine biotechnologische Nutzung bislang ausschloß. In Abbildung 2 sowie der Tabelle 1 sind die Arbeiten von Amann et al. [13] sowie Torsvik et al. [14] zur besseren Übersicht zusammengefaßt.

Die Arbeiten von Torsvik et al. (Tabelle 1) bestätigen mit anderen Methoden die 1995 publizierten Daten von Amann [13]. Von den 6.000 durch Torsvik et al. in einem Waldboden postulierten Genomäquivalenten (d.h. verschiedenen Prokaryonten-Arten) ließen sich im Labor allerdings nur 35 Arten kultivieren, was etwa 0,6% der gesamten Diversität der Population entspricht. Amann et al. finden in einer nicht näher spezifizierten Bodenprobe mit 0,3% kultivierbaren Arten einen sehr ähnlichen Wert. Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, daß die überwiegende Mehrheit der biologischen Vielfalt der Mikroorganismen mit klassischen Kultivierungsbedingungen nicht abgebildet werden kann. Gans et al. [16] kommen nach einer Reevaluierung verschiedener Daten zu dem Ergebnis, daß in einer Bodenprobe sogar deutlich mehr Genomäquivalente (bis zu eine Million) zu identifizieren seien, was einem noch niedrigeren Prozentsatz

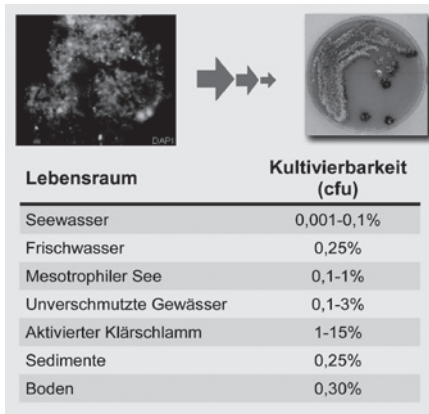


Abb. 2: Eine DAPI-Färbung der Gesamt-DNA eines Habitates (links oben) verdeutlicht, wie viele verschiedene Mikroorganismen-Arten in einem Lebensraum vorkommen. Der Versuch, diese Vielfalt zu kultivieren, endet oft darin, daß nur ein geringer Prozentsatz der Mikroorganismen unter den Kulturbedingungen anwächst (rechts oben). Eine Zusammenfassung solcher Experimente unter Verwendung verschiedenster Habitate ist darunter zusammengefaßt (nach [13]).

an kultivierbaren Mikroorganismen entspräche. Unabhängig von der letztlich „richtigen“ Anzahl an Genomäquivalenten in einem definierten Habitat bleibt festzuhalten, daß nur durch Anwendung der Metagenom-Technologie, also der direkten Klonierung und Expression von DNA aus beliebigen Habitatproben, erstmalig eine industrielle Nutzung von einer Vielzahl neuartiger Enzyme und Wirkstoffe aller Mikroorganismen einer natürlichen Quelle ermöglicht wird [17-19]. Dabei ist eine breite taxonomische Abdeckung innerhalb eines Metagenoms gewährleistet, was eine hohe Diversität auch bei den gesuchten Biokatalysatoren, Enzymen oder Syntheseclustern erwarten läßt.

Tab. 1: Abundanz von Prokaryonten in 1 cm³ Umweltprobe [14, verändert]

DNA Quelle	Abundanz (Zellen/cm ³)	Habitat-Genom-Komplexität (bp)	Genom-Äquivalente*
Waldboden	4,8 x 10 ⁹	2,5 x 10 ¹⁰	6.000
Kultivierbare Prokaryonten in Waldboden	1,4 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁸	35
Grasboden	1,8 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ⁹ - 3,5 x 10 ¹⁰	3.500 – 8.800**
Ackerboden	2,2 x 10 ¹⁰	5,7 x 10 ⁸ – 1,4 x 10 ⁹	140 – 350
Natürliches, marines Sediment	3,1 x 10 ⁹	4,8 x 10 ¹⁰	11.400
Marines Fischfarm-Sediment	7,7 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁸	50
Saline (22% salin)	6,0 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁷	7

* Genomäquivalente in bezug zu dem E. coli-Genom (4,1 x 10⁶ bp)

** Gemäß einer Publikation von Gans et al. [16] könnte die Biodiversität mit einer Million Genomäquivalenten (verschiedene mikrobielle Arten) pro cm³ Grasboden sogar noch um ein Vielfaches höher sein.

Anders als in den USA, wo die Weiße Biotechnologie insbesondere durch staatliche Organisationen wie zum Beispiel das Department of Energy (DOE) vorangetrieben wird, ist in Europa die treibende Kraft besonders in der Industrie zu finden [20]. Das läßt sich auch an den Aktivitäten von Unternehmen wie der BASF AG oder der Degussa AG ablesen, die Ende des letzten Jahres 150 Millionen beziehungsweise 50 Millionen Euro an Forschungsgeldern für Forschungsprojekte innerhalb der Weißen Biotechnologie bereitgestellt haben. Auch das BMBF ist unter anderem mit der Ausschreibung „BioIndustrie 2021“ stark daran interessiert, die Weiße Biotechnologie innerhalb Deutschlands langfristig zu unterstützen.

Angesichts sich global verknappender Energie- und Rohstoffreserven erscheint eine ressourcenschonende und umweltfreundliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe und die Herstellung neuer Bio-basierter Produkte ökonomisch und ökologisch wünschenswert. Zunehmender Kostendruck und sich verlagernde Zielmärkte setzen insbesondere die in Europa starke chemische Industrie unter Druck, innovative und hochwertige neue Produkte zu lancieren. Darin liegt auch das Interesse an der Metagenom-Technologie begründet. Die wesentlichen Treiber lassen sich dabei mit den Schlagworten (1) „Molekulare Neuheit/Patentierbarkeit“, (2) „Funktionelle Diversität“ (3) „Idealer Biokatalysator“, und (4) „Zugang zu neuen Naturstoffen“ zusammenfassen:

- (1) Für manche Massen Anwendungen, wie z. B. den Einsatz von Enzymen als funktionelle Bestandteile von Hochleistungswaschmitteln sind bestimmte Enzyme natürlicherweise hervorragend geeignet und hinsichtlich ihrer Effizienz und industriellen Produktionskosten weitgehend optimiert. Dies gilt bei Wasch- und Reinigungsmitteln insbesondere für die Gruppe der Subtilisine. Somit ist es für neue industrielle Anwendungen nötig, im Metagenom nach neuen Enzymen mit anderen Sequenzen aber ähnlichen Umsatzraten zu suchen, die dann patentrechtlich geschützt und industriell verwertet werden können.
- (2) In der Feinchemie ist eine Spezialisierung auf bestimmte Reaktionstypen und Verbindungsklassen sehr verbreitet. In der wenige Monate dauernden Zeitspanne der Festlegung einer industriellen Syntheseroute für ein Syntheton kann die Biokatalyse im Wettbewerb mit der klassischen chemischen Synthese nur dann gewinnen, wenn für eine spezifische Reaktionsklasse eine umfangreiche und diverse Sammlung von vorevaluierten Biokatalysatoren (Enzymbank) bereitgehalten wird, die innerhalb eines kurzen Zeitfensters analytisch auf Substratumsatz getestet werden kann. Die molekulare und funktionelle Vielfalt des Metagenoms ist geradezu prädestiniert, diesen Anforderungen zu genügen und entsprechende Enzymbanken mit innovativen Produkten zu „versorgen“.
- (3) Um auf die bekannten Vorteile einer enzymatischen Substratumsetzung (Chemo- und Regio-Selektivität, Chiralität) nicht zu verzichten, müssen enzymatische Prozesse unter Bedingungen ablaufen, welche unter chemischen Gesichtspunkten (z.B. hinsichtlich Edukt- und Produkt-Stabilität, -Löslichkeit,

etc.) suboptimal sein mögen, die Enzymkatalysatoren aber nicht zu schnell denaturieren und damit inaktivieren.

- (4) Zahlreiche pharmakologisch aktive Sekundärmetaboliten werden von Bakterien in komplexen mikrobiellen Konsortien oder Habitaten (z.B. Schwämmen) gebildet, die im Labor nicht ohne weiteres nachzustellen sind [21]. In diesen Fällen ist es die direkte Klonierung und Expression der Synthese-Gencluster (häufig mehr als 40 kbp groß), der für die Metabolitenbildung verantwortlichen Enzyme aus metagenomischer DNA, die einen rekombinanten Zugang zu diesen wertvollen Substanzen ermöglichen kann.

Innovative Enzyme aus aktivitätsbasiertem Screening

Die Identifizierung von industriell interessanten Genen im Metagenom kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Neben der Sequenzierung ganzer Banken klonierter Metagenom-DNA und funktioneller *in silico*-Annotation durch computerbasierte Algorithmen [22], sind Verfahren verbreitet, welche die Basenkomplementarität der DNA nutzen, um durch Sondenhybridisierung und PCR-Verfahren Gene mit Ähnlichkeit zu bereits bekannten Sequenzen zu identifizieren und zu amplifizieren [4].

Die größte Chance, sequenzneue (= patentierbare) und aktiv exprimierbare Gene in Metagenombanken zu finden, besteht beim Aktivitäts-basierten Screening, das heißt der Identifizierung von rekombinanten Klonen, die eine zusätzliche enzymatische Aktivität dadurch zeigen, daß sie entsprechende metagenomische DNA aufgenommen haben (Abbildung 1C).

Wiederfindungsraten und Expression als Herausforderungen in der Metagenomik

Aus dem Aktivitäts-Screening bekannter Bakterienisolate sowie aus zahlreichen komplett sequenzierten mikrobiellen Genomen kann man die Häufigkeiten bestimmter Enzymklassen in unbekannt Genbanken abschätzen. In metagenomischen Expressionsbanken verschiedener mikrobieller Quellen wird jedoch häufig nur ein Bruchteil der zu erwartenden Enzymgene identifiziert beziehungsweise von den rekombinanten Klonen exprimiert [4, 11]. Solche Aktivitäts-basierten Screenings sind häufig wirtsspezifischen Beschränkungen durch die heterologe Genexpression im Expressionswirt (z.B. bei *E. coli*) unterworfen. Zusätzlich fallen abhängig von den Enzymklassen erheblich divergierende Wiederfindungsraten auf. Unter Bezug auf Klonierungen in vergleichbaren Plasmidvektoren und dem Expressionswirt *E. coli* konnten für Esterasen unter Verwendung des Substrates Tributyrin sehr unterschiedliche Hitraten zwischen einem aktivem Klon pro 6 Mbp (Megabasenpaare)

bzw. 147 Mbp klonierter Metagenom-DNA erzielt werden [11]. Bei Annahme der gleichen Abundanz der Esterasen in allen Genomen sind die signifikant unterschiedlichen Ergebnisse auch Ausdruck der divergierenden Expressierbarkeit der metagenomischen Enzymgene aus verschiedenen Habitaten.

Eine Zusammenfassung weiterer Aktivitäts-basierter Durchmusterungen nach Biokatalysatoren in Metagenomen gibt Lorenz in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel [11]. Auffällig ist hier in der Tabelle 1 des Artikels, daß z.B. Cellulasen insbesondere in Metagenomen aus Kuhdarm mit neun Hits pro Megabasenpaare (Mbp) sehr häufig gefunden wurden, was ein „rationales Bioprospecting“, also eine gezielte Probennahme in vielversprechenden Biotopen auch bei Metagenom-Ansätzen sinnvoll erscheinen läßt, da z.B. davon auszugehen ist, daß im Darm pflanzenfressender Wiederkäuer zahlreiche Cellulose-abbauende Mikroorganismen vorkommen. Beim Screenen nach Amylasen, welche in Metagenomen aus verschiedenen Bodenproben gesucht wurden, fallen, ähnlich wie bei den Esterasen, signifikante Unterschiede in der Hitrate auf, welche zwischen einem aktiven Klon in 13 Mbp bzw. 400 Mbp liegt. Noch schwieriger ließen sich Enzyme wie Proteasen, Dehydrogenasen oder Dehydratasen darstellen, wo ein aktiver Klon unter mehr als 1.000 Mbp durchmusterter DNA gefunden wurde, was mit einem erheblichen Screeningaufwand einhergeht. Möglichkeiten, hier optimierend einzugreifen, bestehen zum Beispiel in der Anreicherung von Gruppen interessierender Mikroorganismen im Kontext ihres natürlichen Substrates, das heißt einer klassischen mikrobiologischen Technik, bei der z.B. durch das Angebot an bestimmten Nährstoffen gezielt solche mikrobiellen Konsortien angereichert werden, die diese Substrate zum Wachstum nutzen können. Eine Nivellierung unterschiedlicher Populationen isolierter DNA vor Anlage einer Genbank nach dem Nukleotid-(G/C-)Gehalt oder eine sequenzspezifische Anreicherung gesuchter DNA-Fragmente zur Optimierung der Hitraten wird von Gray et al. beschrieben [23]. Neben dem Gehalt an Enzymgenen in der klonierten Metagenom-DNA ist es jedoch bei vielen, insbesondere sekretierten Proteinen eine Frage der heterologen Expression, ob ein Gen aktivitätsbasiert detektiert werden kann.

Expression von Metagenom-Biosynthese-Genclustern

Insbesondere bei der rekombinanten Darstellung neuer niedermolekularer Wirkstoffe durch Klonierung großer Biosynthese-Gencluster aus dem Metagenom werden aufgrund ihrer natürlichen biosynthetischen Kompetenz andere Wirtsorganismen wie u.a. *Streptomyces sp.* gegenüber *E. coli* bevorzugt [24, 25].

Da jedoch *E. coli* durch seine genetische Manipulierbarkeit, das zur Verfügung stehende molekularbiologische Instrumentarium (z.B. Vektoren) und seine ausgezeichnete genetische Transformierbarkeit herausragt, werden auch große Insertionen tragende Metagenombanken zunächst in Shuttle-Vektoren kloniert und in *E. coli* angelegt [26] und in einem zweiten Schritt in die geeigneteren Wirtsstämme

transferiert. Für die Expression von Biokatalysatoren gelten filamentöse Pilze (z.B. *Aspergillus*) oder aber *Bacillus sp.* als Industriestandard. Niedermolekulare Substanzen werden im industriellen Maßstab insbesondere in Actinomyceten wie Streptomyceten und Mycobakterien oder aber in Pilzen wie *Ashbya gossypii* (Vitamin B2) dargestellt.

Quo vadis Metagenomics?

Metagenomik ist schon heute eine Schlüsseltechnologie der industriellen Biotechnologie. Bei der Identifizierung verschiedener Enzym- und Biokatalysatorklassen treten jedoch Limitationen und Herausforderungen auf, welche in den nächsten Jahren von der angewandten Forschung angegangen werden müssen, um die Technologie weiter auszubauen. Aus den bisher publizierten und hier zusammengefaßten Ergebnissen läßt sich momentan eine technische Limitation der Metagenomics in der aktiven Expression der Zielgene in heterologen Ersatzwirten ableiten. Diese wird u.a. beeinflusst von der genetischen Stabilität episomal klonierter DNA im heterologen Wirt, der Erkennung von Genregulationssignalen (transkriptionelle Promotoren, Terminatoren, translationale Erkennungssignale) bis hin zu posttranslationalen Prozessen wie Proteinsekretion, -faltung oder proteolytischer Aktivierung oder auch der Darstellung hoch komplexer Gencluster-Syntheseprodukte.

Naheliegende Lösungsansätze für einige der Herausforderungen in dem Umfeld der Metagenomics sind die Nutzung Vektor-basierter Promotoren (z.B. der Promotor des Lactose-Operons aus *E. coli*), um entsprechend die Transkriptionsinitiation sicherzustellen, aber auch die parallele Verwendung alternativer Expressionswirte (u.a. *Bacillus*). Weitere Ansätze, welche die bisherigen Limitationen der Metagenomforschung beheben könnten, sind in der Entwicklung alternativer Screening-Systeme zu sehen, die ebenfalls Aktivitäts-basiert einen höheren und auch schnelleren Probendurchsatz erlauben.

Die Identifizierung von neuartigen Biokatalysatoren oder bioaktiven Naturstoffen in Metagenomen sollte dabei nicht auf die Durchmusterung von in *E. coli* abgelegten Metagenombanken beschränkt werden. Eine parallele Ausbringung der Bank in „shuttle Plasmidvektoren“ in alternativen Expressionswirten führt zu einer Erweiterung der Resultate und kann zu einer verbesserten Hitrate beitragen.

Literatur

- [1] Sustainable Chemistry Strategic Research Agenda 2005; www.suschem.org
- [2] Riese Lecture on World Congress in Industrial Biotechnology and Bioprocessing, July 2006, Toronto, Canada; www.mckinsey.com

- [3] Kirk, et al. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13, 345
- [4] Lorenz & Eck *Nat Rev Microbiol* 2005, 3, 510
- [5] GIA, Industrial Enzymes- A Global Multi-Client Market Research Project. In *Global Industry Analysts*. 2004, GIA, Silver Creek Valley Road, Suite 200, San José California 95138, USA: San José, California
- [6] Schmid, et al., *Nature*, 2001, 409, 258
- [7] Schmid, et al., *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13, 359
- [8] Schoemaker, et al. *Science*, 2003, 299, 1694
- [9] Handelsman et al. *Chem. Biol.* 1998, 5, R245
- [10] Handelsman, *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68, 669
- [11] Lorenz, *Chemie Ingenieur Technik* 2006, 78, 461
- [12] Quaiser, et al., Patent application WO 2004/018673
- [13] Amann, et al., *Microbiol Rev* 1995, 59, 143
- [14] Torsvik, et al., *Science* 2002, 296, 1064
- [15] Zengler, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 15681
- [16] Gans, et al., *Science* 2005, 309, 387
- [17] Cowan, et al. *Trends Biotechnol* 2005, 23, 321
- [18] Lorenz, et al. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13, 572
- [19] Langer, et al. *Biotechnol. J.* 2006, 1, 815
- [20] Lorenz & Zinke *Trends Biotechnol.* 2005, 23, 570
- [21] Piel, et al. *Nat Prod Rep*, 2004, 21, 519
- [22] Venter, et al. *Science* 2004, 304, 66
- [23] Gray, et al. *Adv Appl Microbiol.* 2003, 52, 1
- [24] Seow, et al. *J Bacteriol* 1997, 179, 7360
- [25] Wang, et al. *Org Lett* 2000, 2, 2401
- [26] Martinez, et al. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 2452