

ชีววิทยาสังเคราะห์กับการผลิตฮอร์โมนพืช

เปลี่ยนจุลินทรีย์ให้เป็น “โรงงานชีวภาพ” เพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน

บทคัดย่อ

ฮอร์โมนพืชหรือไฟโตฮอร์โมนเป็นสารสัญญาณที่พืชสร้างขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การงอกของเมล็ด การพัฒนาของผล และการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม อย่างไรก็ตาม การผลิตฮอร์โมนพืชด้วยวิธีดั้งเดิมยังมีข้อจำกัด ทั้งการสังเคราะห์ทางเคมีที่ใช้หลายขั้นตอนและสารเคมีรุนแรง ตลอดจนการสกัดจากพืชที่ให้ผลผลิตต่ำ ปัจจุบันชีววิทยาสังเคราะห์และวิศวกรรมเมแทบอลิซึมเปิดโอกาสให้ปรับแต่งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ให้ทำหน้าที่เป็น “โรงงานชีวภาพ” ผลิตฮอร์โมนพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ บทความนี้อธิบายความก้าวหน้าในการผลิตออกซิน จิบเบอเรลลิน และกรดซาลิไซลิก รวมถึงกลยุทธ์เพิ่มผลผลิต การประยุกต์ใช้ และความท้าทายก่อนนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ: ฮอร์โมนพืช, ชีววิทยาสังเคราะห์, วิศวกรรมเมแทบอลิซึม, ออกซิน, จิบเบอเรลลิน, กรดซาลิไซลิก

1. ฮอร์โมนพืช: สารปริมาณน้อยที่ควบคุมชีวิตของพืช

แม้พืชจะไม่มีระบบประสาทเหมือนสัตว์ แต่สามารถรับรู้แสง แรงโน้มถ่วง อุณหภูมิ การขาดน้ำ การเข้าทำลายของเชื้อโรค และการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารได้อย่างแม่นยำ ความสามารถดังกล่าวส่วนหนึ่งเกิดจากการทำงานของฮอร์โมนพืชหรือ **phytohormones** ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณระหว่างเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ

ฮอร์โมนพืชที่รู้จักกันดี ได้แก่ ออกซิน ไซโทไคนิน จิบเบอเรลลิน กรดแอบไซซิก เอทิลีน บราสซิโนสเตอรอยด์ กรดจัสมอนิก กรดซาลิไซลิก และสไตรโกแลกโทน ฮอร์โมนแต่ละชนิดไม่ได้ทำงานอย่างโดดเดี่ยว แต่เชื่อมโยงกันเป็นเครือข่าย ตัวอย่างเช่น ออกซินเกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์และการเกิดราก จิบเบอเรลลินส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการยืดตัวของลำต้น ส่วนกรดซาลิไซลิกมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเชื้อโรค

การใช้ฮอร์โมนพืชอย่างเหมาะสมจะช่วยควบคุมการเจริญของพืช เพิ่มคุณภาพผลผลิต ลดความสูญเสียจากความเครียด และสนับสนุนระบบเกษตรแม่นยำที่ใช้ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. เหตุใดจึงต้องหาวิธีผลิตฮอร์โมนพืชแบบใหม่

ในปัจจุบัน ฮอร์โมนพืชเชิงพาณิชย์ผลิตได้จากสองแนวทางหลัก คือ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสกัดจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ แต่ทั้งสองแนวทางมีข้อจำกัด

การสังเคราะห์ทางเคมีมักประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน อาจต้องใช้อุณหภูมิหรือความดันสูง ใช้กรดแก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารเคมีที่เป็นพิษ ส่งผลให้ต้นทุนสูงและเกิดของเสียที่ต้องจัดการอย่างระมัดระวัง โดยเฉพาะฮอร์โมนที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น จิบเบอเรลลิน

ส่วนการสกัดจากพืชต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมาก เนื่องจากพืชสร้างฮอร์โมนเหล่านี้ในระดับต่ำมาก อีกทั้งปริมาณฮอร์โมนยังเปลี่ยนแปลงตามชนิดพืช อายุ เนื้อเยื่อ พันธุกรรม ฤดูกาล และสภาพแวดล้อม ทำให้ควบคุมคุณภาพและผลผลิตได้ยาก

ชีววิทยาสังเคราะห์จึงเสนอทางเลือกที่น่าสนใจ คือ การนำยีนและเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดมาประกอบเป็นเส้นทางชีวสังเคราะห์ให้ใหม่ภายในจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก จุลินทรีย์จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือวัตถุดิบราคาถูกให้เป็นฮอร์โมนพืชภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันไม่รุนแรง

กล่าวอย่างง่าย จุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับแต่งเปรียบเสมือนโรงงานขนาดเล็กที่มีสายการผลิตอยู่ภายในเซลล์

3. หลักการของชีววิทยาสังเคราะห์ในการผลิตฮอร์โมนพืช

การเพิ่มผลผลิตฮอร์โมนพืชไม่ได้เกิดจากการใส่ยีนเพียงหนึ่งยีน แต่ต้องปรับสมดุลของระบบเมแทบอลิซึมทั้งเครือข่าย กลยุทธ์สำคัญประกอบด้วย

3.1 เพิ่มวัตถุดิบตั้งต้น

หากต้องการผลิตออกซินชนิด indole-3-acetic acid หรือ IAA เซลล์ต้องมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนเพียงพอ นักวิจัยจึงเพิ่มการทำงานของยีนในเส้นทางสร้างทริปโตเฟน และลดการใช้ทริปโตเฟนในกระบวนการอื่น

ในกรณีของกรดซาลิไซลิก ต้องเพิ่มสารตัวกลาง เช่น phosphoenolpyruvate และ erythrose 4-phosphate เพื่อส่งต่อเข้าสู่เส้นทางซิกิเมตและสร้างโคริสมेट

3.2 เพิ่มเอนไซม์ในเส้นทางเป้าหมาย

ยีนที่สร้างเอนไซม์สำคัญสามารถนำมาเพิ่มจำนวนหรือควบคุมให้แสดงออกมากขึ้น ทำให้สารตั้งต้นถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์เป้าหมายได้รวดเร็วขึ้น

3.3 ปิดเส้นทางที่แข่งขันกัน

สารตัวกลางหนึ่งชนิดมักถูกใช้ได้หลายเส้นทาง หากปล่อยให้เซลล์นำสารดังกล่าวไปสร้างสารอื่น ผลผลิตฮอร์โมนจะลดลง จึงอาจต้องลบหรือยับยั้งยีนบางตัว เพื่อบังคับให้คาร์บอนไหลไปยังผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

3.4 จัดตำแหน่งเอนไซม์ให้ทำงานใกล้กัน

เอนไซม์ที่ทำงานต่อเนื่องกันสามารถนำไปวางไว้บริเวณเดียวกัน เช่น บนผิวเพอรอกซิโซม วิธีนี้ช่วยให้สารตัวกลางส่งต่อจากเอนไซม์หนึ่งไปสู่อีกเอนไซม์หนึ่งได้รวดเร็ว ลดการแพร่กระจายหรือการสูญเสียไปยังปฏิกิริยาอื่น

3.5 พัฒนาตัวตรวจวัดทางชีวภาพ

ไบโอเซนเซอร์ช่วยวัดระดับผลิตภัณฑ์ภายในเซลล์ได้รวดเร็ว เซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนได้มากอาจแสดงสัญญาณเรืองแสงมากขึ้น จึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากเซลล์จำนวนมากได้

4. การผลิตออกซิน: จากทริปโตเฟนสู่ IAA

4.1 บทบาทของออกซิน

ออกซินเป็นกลุ่มฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์ การเกิดราก การพัฒนาดอกและผล การโค้งเข้าหาแสง และการตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง ออกซินธรรมชาติที่พบมากที่สุดคือ **indole-3-acetic acid** หรือ **IAA**

พืช รา และแบคทีเรียสามารถสร้าง IAA ได้หลายเส้นทาง โดยส่วนใหญ่เริ่มจากกรดอะมิโนแอล-ทริปโตเฟน เส้นทางสำคัญได้แก่

- เส้นทางทริปตามีน หรือ TAM
- เส้นทาง indole-3-pyruvic acid หรือ IPA
- เส้นทาง indole-3-acetamide หรือ IAM
- เส้นทาง indole-3-acetonitrile หรือ IAN
- เส้นทาง tryptophan side-chain oxidase ซึ่งพบในแบคทีเรียบางชนิด

แผนภาพในหน้าที่ 3 ของบทความต้นฉบับแสดงให้เห็นว่า แม้ทุกเส้นทางเริ่มจากทริปโตเฟนเหมือนกัน แต่ใช้สารตัวกลางและเอนไซม์ต่างชุดกันก่อนสิ้นสุดที่ IAA

4.2 การดัดแปลง *Escherichia coli*

E. coli เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเจริญเร็ว มีข้อมูลทางพันธุกรรมมาก และปรับแต่งยีนได้สะดวก หนึ่งในตัวอย่างสำคัญคือการลบยีน **tnaA** ซึ่งสร้างเอนไซม์ tryptophanase ที่ย่อยทริปโตเฟน พร้อมกับใส่ยีน **iaaM** และ **ami1** เพื่อสร้างเส้นทาง IAM

ผลจากการปรับแต่งดังกล่าวทำให้ *E. coli* ผลิต IAA ได้ถึงประมาณ 7.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับสูงที่สุดระดับหนึ่งที่รายงานในจุลินทรีย์ดัดแปลง อย่างไรก็ตาม การผลิตหยุดเพิ่มหลังการหมักประมาณ 42 ชั่วโมง สะท้อนว่าการมีเอนไซม์มากเกินไปไม่ได้หมายความว่าระบบจะทำงานต่อเนื่องเสมอไป เพราะอาจเกิดการยับยั้งย้อนกลับและการใช้สารตั้งต้นไม่สมบูรณ์

4.3 การใช้ยีสต์และการจัดตำแหน่งเอนไซม์

ยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* มีข้อดีคือใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น ไซโลส กลีเซอรอล แล็กโทส และวัสดุเหลือใช้บางชนิด นักวิจัยได้พัฒนาโปรโมเตอร์ที่ตอบสนองต่อแหล่งคาร์บอน เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนสร้าง IAA

อีกแนวทางหนึ่งคือการนำเอนไซม์ในเส้นทาง IAM ไปจัดเรียงบนผิวเพอรอกซิโซม ทำให้การส่งผ่านสารตัวกลางมีประสิทธิภาพขึ้น และเพิ่มการผลิต IAA ประมาณ 9.5 เท่าเมื่อเทียบกับการปล่อยให้เอนไซม์กระจายอยู่ในไซโทซอล

4.4 จุลินทรีย์ที่ตอบสนองต่อการอักเสบ

งานวิจัยล่าสุดได้นำแบคทีเรียโพรไบโอติก *E. coli* Nissle 1917 มาดัดแปลงให้ผลิต IAA ในลำไส้ โดยวงจรพันธุกรรมถูกออกแบบให้ตรวจจับสารบ่งชี้การอักเสบ เช่น ไทโอซัลเฟตและไนเตรต เมื่อพบสัญญาณเหล่านี้ ระบบจึงเปิดการสร้าง IAA

แนวคิดนี้ต่างจากการผลิตสารในถังหมักทั่วไป เพราะเป็นการสร้าง “จุลินทรีย์รักษาโรคที่ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม” อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้ในมนุษย์จำเป็นต้องผ่านการประเมินด้านความปลอดภัย การควบคุมปริมาณ และการทดลองทางคลินิกอย่างเข้มงวด

5. การผลิตจิบเบอเรลลิน: เส้นทางยาวที่ต้องอาศัยการปรับแต่งหลายระดับ

5.1 บทบาทของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลินหรือ GA ส่งเสริมการงอกของเมล็ด การยืดตัวของลำต้นและราก การออกดอก และการพัฒนาของผล แม้มีการค้นพบจิบเบอเรลลินหลายชนิด แต่ชนิดที่มีบทบาททางชีวภาพเด่น ได้แก่ GA₁, GA₃, GA₄ และ GA₇ โดยเฉพาะ **GA₃** หรือ **gibberellic acid** ซึ่งใช้แพร่หลายในภาคการเกษตร

การสร้างจิบเบอเรลลินมีความซับซ้อนกว่า IAA เพราะประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้น เริ่มจากการสร้างสารไอโซพรีนอยด์ แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็น FPP, GGPP, ent-kaurene และจิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ

พืชและราใช้เส้นทางเมวาโลเนตหรือ MVA เป็นหลัก ขณะที่แบคทีเรียจำนวนหนึ่งใช้เส้นทาง MEP แผนภาพในหน้าที่ 7 ของบทความแสดงให้เห็นความแตกต่างของเอนไซม์ในพืช รา และแบคทีเรีย รวมถึงจุดที่สามารถเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีนเพื่อเพิ่มผลผลิต

5.2 รา *Fusarium fujikuroi* ในฐานะผู้ผลิตหลัก

รา *Fusarium fujikuroi* มีเส้นทางสร้าง GA ตามธรรมชาติและถูกศึกษาอย่างกว้างขวาง กลยุทธ์เพิ่มผลผลิตประกอบด้วย

1. เพิ่มการสร้างสารตั้งต้นในเส้นทาง MVA
2. เพิ่มเอนไซม์ที่สร้าง FPP และ GGPP
3. เพิ่มเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้นเป็น ent-kaurene
4. เพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไฮโดรไมโครม P450
5. ลดเส้นทางสร้างสควาลีนซึ่งแข่งขันใช้ FPP

ยีน *hmgR* และ *fpps* ถูกเพิ่มการแสดงออกเพื่อเพิ่ม HMG-CoA และ FPP ขณะที่ยีน *ggs2* และ *cps/ks* ช่วยเพิ่มสารตัวกลางในเส้นทาง GA นอกจากนี้ยังเพิ่มยีนฮีโมโกลบินจากแบคทีเรีย *Vitreoscilla* เพื่อช่วยส่งออกซิเจนให้เอนไซม์ P450 และเพิ่มระบบถ่ายโอนอิเล็กตรอน

การปรับแต่งหลายส่วนพร้อมกันทำให้ผลิต GA_3 ได้ประมาณ 2.89 กรัมต่อลิตร

5.3 เปลี่ยนน้ำมันใช้แล้วให้เป็นฮอร์โมนพืช

แนวทางที่น่าสนใจคือการใช้ไขมันปรุงอาหารใช้แล้วเป็นวัตถุดิบ พร้อมลดการทำงานของเอนไซม์ในเส้นทางสร้างสควาลีน โดยเฉพาะ ERG9 ซึ่งแข่งขันใช้ FPP กับเส้นทางจิบเบอเรลลิน วิธีนี้ช่วยเพิ่มการผลิต GA_3 เป็นประมาณ 3.24 กรัมต่อลิตร

กรณีดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าชีววิทยาสังเคราะห์ไม่ได้เพิ่มผลผลิตเพียงอย่างเดียว แต่สามารถเชื่อมโยงกับแนวคิดเศรษฐกิจหมุนเวียน โดยเปลี่ยนของเหลือทิ้งให้เป็นสารมูลค่าสูง

อย่างไรก็ตาม การผลิต GA ในยีสต์และ *E. coli* ยังให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่มีชุดเอนไซม์ที่เหมาะสมครบถ้วน หรือไม่สามารถสร้างสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ P450 หลายชนิดได้ดีเท่าเรา

6. การผลิตกรดชาลิไซลิก: จากระบบป้องกันโรคของพืชสู่สารสำคัญทางอุตสาหกรรม

6.1 บทบาทของกรดชาลิไซลิก

กรดชาลิไซลิกหรือ SA เป็นสารสัญญาณสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของพืช ช่วยกระตุ้นการป้องกันเชื้อก่อโรค และเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความแห้งแล้ง ความร้อน โลหะหนัก และความเครียดทางกายภาพ

นอกภาคการเกษตร กรดซาลิไซลิกยังใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ดูแลผิวและรักษาสิว รวมถึงเป็นสารตั้งต้นสำหรับอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

6.2 เส้นทางการสร้างในพืชและแบคทีเรีย

สารตั้งต้นสำคัญของ SA คือ โคริสมेट ซึ่งเกิดจากเส้นทางซิกิเมต

ในพืชมีสองเส้นทางหลัก ได้แก่

- เส้นทาง isochorismate synthase หรือ ICS
- เส้นทาง phenylalanine ammonia-lyase หรือ PAL

เส้นทาง ICS ค่อนข้างสั้น โดยเปลี่ยน โคริสมेटเป็นไอโซโคริสมेटและเปลี่ยนต่อไปเป็น SA ส่วนเส้นทาง PAL มีหลายขั้นตอน ผ่านฟีนิลอะลานีน กรดทรานส์ซินนามิก และสารประกอบอะโรมาติกอื่น ๆ

แบคทีเรียมีเส้นทางสั้นกว่า โดยใช้เอนไซม์ isochorismate synthase และ isochorismate pyruvate lyase เพียงสองขั้นตอนในการเปลี่ยน โคริสมेटเป็น SA ดังนั้นแบคทีเรียจึงเป็นโฮสต์ที่เหมาะสมสำหรับการออกแบบเส้นทางผลิต SA

แผนภาพในหน้าที่ 9 ของบทความแสดงทั้งเส้นทางธรรมชาติและตำแหน่งที่นักวิจัยตัดยีนหรือเพิ่มยีน เพื่อผลักการไหลของคาร์บอนไปยัง SA

6.3 เพิ่มผลผลิตด้วยการเปลี่ยนทิศทางการไหลของคาร์บอน

นักวิจัยได้ดัดแปลง *E. coli* ที่เดิมผลิตฟีนิลอะลานีนได้สูง โดยเปลี่ยนระบบนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ลดการเปลี่ยน PEP ไปเป็นไพรูเวต และลบยีนที่นำโคริสมेटไปสร้างกรดอะมิโนอะโรมาติกชนิดอื่น จากนั้นจึงใส่ยีน *ics* และ *ipl* เพื่อสร้าง SA

ระบบดังกล่าวผลิต SA ได้ประมาณ 11.5 กรัมต่อลิตร

อีกตัวอย่างหนึ่งคือ *Corynebacterium glutamicum* ที่ได้รับการปรับเส้นทางซิกิเมตและลบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติก สามารถผลิต SA ได้ประมาณ 12.9 กรัมต่อลิตร

6.4 ทำให้เซลล์ทนต่อผลิตภัณฑ์ของตนเอง

ปัญหาสำคัญของการผลิตกรดอินทรีย์คือ เมื่อผลิตภัณฑ์สะสมมากขึ้น ผลิตภัณฑ์อาจเป็นพิษต่อเซลล์ผู้ผลิตเอง นักวิจัยจึงใช้การวิวัฒนาการแบบปรับตัวในห้องปฏิบัติการ หรือ adaptive laboratory evolution เลี้ยงเซลล์ภายใต้ความเข้มข้นของ SA ที่เพิ่มขึ้นทีละน้อย เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ทนกรดได้ดี

เมื่อใช้ร่วมกับไบโอเซนเซอร์และการคัดเลือกเซลล์แบบรวดเร็ว ได้สายพันธุ์ที่ทน SA เพิ่มขึ้นจากประมาณ 0.9 เป็น 2.1 กรัมต่อลิตร และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอย่างชัดเจน

6.5 การผลิตอนุพันธ์มูลค่าสูง

SA สามารถนำไปสร้างสารอนุพันธ์ เช่น salicyl alcohol, gentisyl alcohol และ **salicin** ซึ่งเป็นสารไกลโคไซด์ที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ

การเพิ่มเอนไซม์ carboxylic acid reductase, alcohol dehydrogenase และ glucosyltransferase ทำให้ *E. coli* เปลี่ยนกลูโคสและกลีเซอรอลไปเป็น salicin ได้ โดยระบบหมักแบบป้อนสารอาหารสามารถผลิต salicin ได้สูงถึงประมาณ **14.6 กรัมต่อลิตร**

7. ประโยชน์ที่มากกว่าการผลิตสารควบคุมการเจริญของพืช

ฮอร์โมนพืชจากโรงงานจุลินทรีย์มีศักยภาพในหลายด้าน

7.1 เกษตรแม่นยำ

สามารถใช้ฮอร์โมนในปริมาณเหมาะสมตามชนิดพืช ระยะการเจริญ และสภาพแวดล้อม เช่น ใช้ออกซินส่งเสริมการเกิดราก ใช้จิบเบอเรลลินควบคุมการงอกหรือการพัฒนาผล และใช้กรดซาลิไซลิกกระตุ้นระบบป้องกันโรค

7.2 การใช้ร่วมกับปุ๋ยชีวภาพ

จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญของพืชบางชนิดสามารถผลิตฮอร์โมนได้เอง การออกแบบจุลินทรีย์ให้ผลิตฮอร์โมนในระดับพอเหมาะอาจช่วยลดการใช้สารเคมีและเพิ่มประสิทธิภาพการดูดธาตุอาหาร

7.3 การแพทย์และเภสัชกรรม

IAA, GA และ SA รวมถึงอนุพันธ์บางชนิดแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์สัตว์ เช่น ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ หรือเสริมการตอบสนองต่อยาบางชนิด อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดลองระดับเซลล์หรือสัตว์ทดลองไม่ควรถูกตีความว่าใช้รักษาโรคในมนุษย์ได้ทันที จำเป็นต้องมีการศึกษาความปลอดภัย ขนาดยา กลไก และประสิทธิผลทางคลินิกเพิ่มเติม

8. ความท้าทายก่อนก้าวสู่ระดับอุตสาหกรรม

แม้ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการจะน่าประทับใจ แต่การขยายจากขวดเยาะไปสู่ถังหมักขนาดใหญ่ยังมีอุปสรรคหลายประการ

ประการแรก ระบบเมแทบอลิซึมที่ให้ผลดีในระดับเล็กอาจไม่ทำงานเหมือนเดิมในถังหมักขนาดใหญ่ เนื่องจากการกระจายออกซิเจน สารอาหาร ค่า pH และอุณหภูมิไม่สม่ำเสมอ

ประการที่สอง การแสดงออกของยีนจำนวนมากสร้างภาระให้เซลล์ จุลินทรีย์อาจเจริญช้าหรือเกิดการกลายพันธุ์ที่ทำให้สูญเสียความสามารถในการผลิต

ประการที่สาม ผลิตภัณฑ์หรือสารตัวกลางบางชนิดเป็นพิษต่อเซลล์ จึงต้องพัฒนาความทนทาน ระบบขับสารออกจากเซลล์ หรือกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ระหว่างการหมัก

ประการที่สี่ ต้องประเมินต้นทุนของวัตถุดิบ การทำให้บริสุทธิ์ การควบคุมคุณภาพ และการจัดการจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมอย่างรอบคอบ

สุดท้าย การใช้ฮอร์โมนพืชต้องคำนึงถึงขนาดและช่วงเวลาที่เหมาะสม เพราะฮอร์โมนไม่ได้ให้ผลแบบ “ยิ่งมากยิ่งดี” ความเข้มข้นสูงเกินไปอาจยับยั้งการเจริญหรือทำให้สรีรวิทยาของพืชเสียสมดุลได้

9. อนาคตของโรงงานชีวภาพผลิตฮอร์โมนพืช

ความก้าวหน้าของวิศวกรรมเอนไซม์ การแก้ไขจีโนม แบบจำลองเมแทบอลิซึม ไบโอเซนเซอร์ และปัญญาประดิษฐ์ จะช่วยให้การออกแบบสายพันธุ์มีความแม่นยำมากขึ้น

แบบจำลองระดับจีโนมสามารถทำนายได้ว่าควรเพิ่มหรือลดยีนใด ขณะที่ปัญญาประดิษฐ์อาจช่วยวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนมากเพื่อค้นหาสภาวะการหมัก สูตรอาหาร และอัตราการป้อนวัตถุดิบที่เหมาะสม ไบโอเซนเซอร์แบบเวลาจริงยังช่วยติดตามการผลิตฮอร์โมนทั้งในถังหมักและในเนื้อเยื่อพืช

ในระยะยาว อาจเกิดระบบเกษตรที่เชื่อมโยงเซนเซอร์ภาคสนาม ข้อมูลสภาพอากาศ ภาพถ่ายจากโดรน และแบบจำลองการเจริญของพืช เพื่อกำหนดชนิดและปริมาณฮอร์โมนที่เหมาะสมเฉพาะพื้นที่ แทนการใช้สารในอัตราเดียวกันทั้งแปลง

บทสรุป

ชีววิทยาสังเคราะห์กำลังเปลี่ยนวิธีผลิตฮอร์โมนพืชจากกระบวนการที่พึ่งพาการสังเคราะห์ทางเคมีหรือการสกัดจากพืชไปสู่กระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถออกแบบและควบคุมได้ การผลิต IAA แสดงให้เห็นประโยชน์ของการเพิ่มสารตั้งต้นและจัดตำแหน่งเอนไซม์ การผลิต GA₃ แสดงความสำคัญของการปรับแต่งหลายเส้นทางและการเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ P450 ส่วนการผลิต SA แสดงให้เห็นพลังของการเปลี่ยนทิศทางการไหลของคาร์บอน การเพิ่มความทนต่อผลิตภัณฑ์ และการใช้ไบโอเซนเซอร์คัดเลือกสายพันธุ์

เทคโนโลยีนี้มีศักยภาพสนับสนุนเกษตรแม่นยำ ลดการพึ่งพาสารเคมี ใช้วัตถุดิบหมุนเวียน และผลิตสารมูลค่าสูงสำหรับอุตสาหกรรมอื่น อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมยังต้องอาศัยการเพิ่มผลผลิต ความเสถียรของสายพันธุ์ ความปลอดภัยทางชีวภาพ และการประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมอย่างครบถ้วน

เมื่อองค์ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรม วิศวกรรมกระบวนการ และปัญญาประดิษฐ์ก้าวหน้าขึ้น จุลินทรีย์อาจไม่ได้เป็นเพียงสิ่งมีชีวิตที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า แต่จะกลายเป็นกำลังสำคัญในการผลิตสารควบคุมการเจริญของพืช เพื่อรับมือกับความมั่นคงทางอาหารและการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในอนาคต

เอกสารหลักที่ใช้เรียบเรียง

Intasian, P., Kimprasoot, N., Trisrivirat, D. และ Chaiyen, P. (2026). *Synthetic biology for phytohormone production*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 90, 102649.



Synthetic biology for phytohormone production

Pattarawan Intasian^a, Ninlapan Kimprasoot^a,
Duangthip Trisrivirat and Pimchai Chaiyen

Phytohormones are compounds produced by plants that can control the processes of plant development and are involved in defense mechanisms. They can serve as sustainable enhancers for plant growth and are also better alternatives to agrochemicals because of their bio-based nature and optimal safety profile towards mammalian cells. Although phytohormones are essential for plant growth, they are naturally synthesized by plants in varying quantities, influenced both by environmental and genetic factors. The synthesis of phytohormones, however, faces several hurdles, including challenges in optimizing the production process as well as difficulties in the extraction of these compounds for downstream applications. In this review, we critically evaluate synthetic biology approaches for phytohormone production, which provides a sustainable method for the production of important phytohormones including auxin, gibberellin (GA), and salicylic acid (SA). These three compounds are highly significant for the agricultural industry because of their widespread utilization.

Addresses

School of Biomolecular Science and Engineering, Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology (VISTEC), Wangchan Valley, Rayong 21210, Thailand

Corresponding authors: Intasian, Pattarawan (pattarawan.i@vistec.ac.th); Chaiyen, Pimchai (pimchai.chaiyen@vistec.ac.th)

^a Contributed equally.

Current Opinion in Chemical Biology 2026, 90:102649

This review comes from a themed issue on **Synthetic Biology (2025)**

Edited by **Chayasith Uttamapinant** and **Peng Zou**

For complete overview of the section, please refer the article collection - **Synthetic Biology (2025)**

Available online 27 December 2025

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2025.102649>

1367-5931/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Introduction

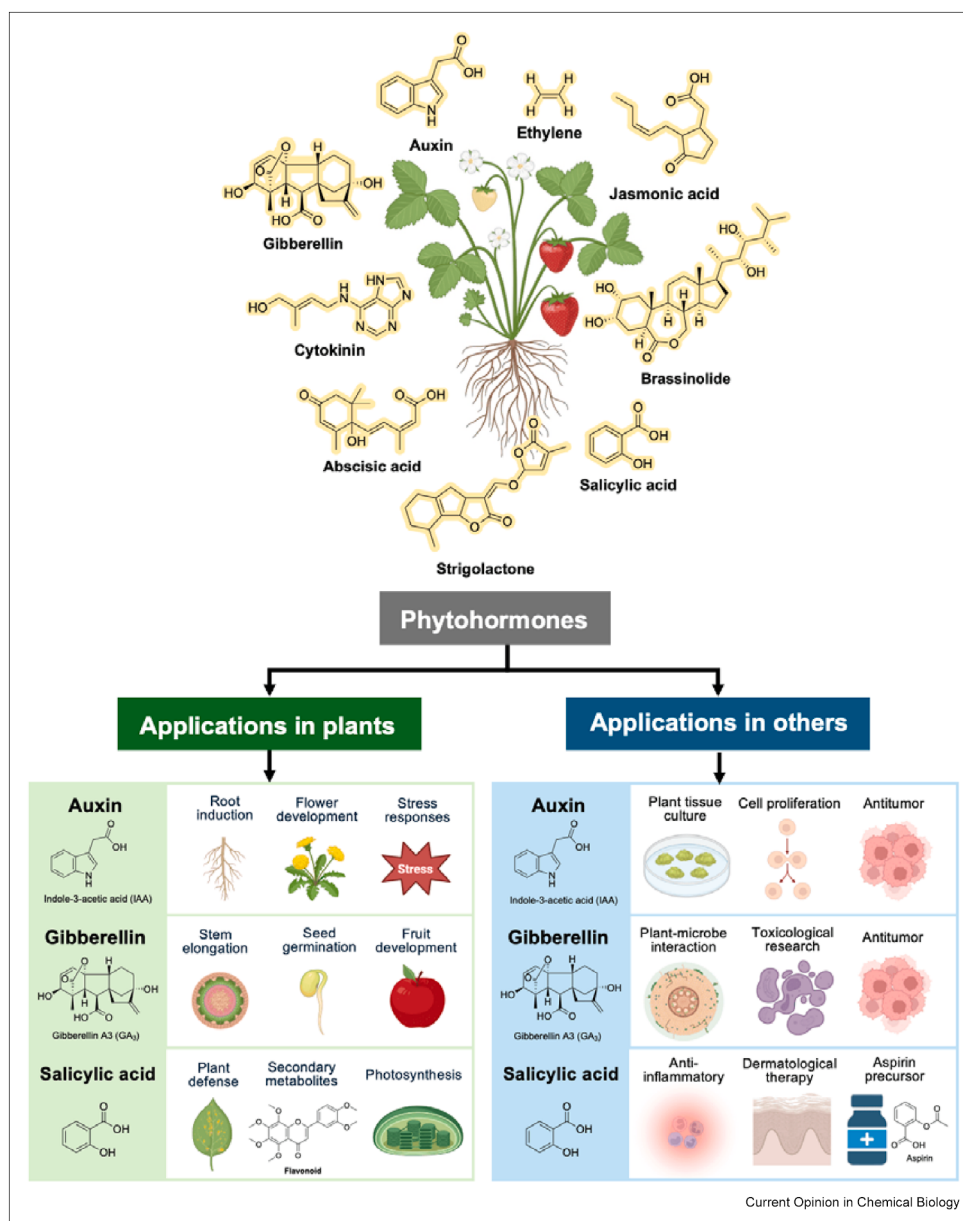
Phytohormones or plant hormones are signaling compounds that regulate growth, development, and environmental stress responses of plants [1]. Phytohormones play important roles in modern precision agriculture [2]. As plants are key resources in the food chain for humans and animals and also serve as

feedstock for the production of fuel, materials and pharmaceuticals [1], the use of phytohormones in modern agriculture is crucial to supporting the agricultural industry in its efforts to minimize the utilization of land, water, and toxic agrochemicals. Accordingly, the use of phytohormones in precision agriculture not only increases the competitiveness of the industry in terms of cost and sustainable production, but also, in parallel, helps to reduce the harmful effects of agriculture on the environment.

Phytohormones can be classified into several types based on their chemical structures, including auxins, cytokinins, gibberellins (GAs), abscisic acid, ethylene, and the more recently identified brassinosteroids, jasmonic acid, and salicylic acid (SA) [2]. Currently, these plant hormones are produced industrially by chemical synthesis or plant extraction [3]. However, the chemical synthesis approach requires multiple-step reactions [4], which are carried out under harsh conditions (e.g. high pressure ~1500 psi) [5] and use strong and toxic chemicals (e.g. sulfuric acid). For extraction from plants, a large amount of plant material is required as the yield obtained is very small due to the fact that these phytohormones are naturally produced at minuscule levels, leading to high operation costs. In order to produce plant hormones under mild and green conditions, a synthetic biology approach using metabolically engineered microbes has emerged as a promising technology. Engineered microbes can produce phytohormones with a high yield and only require fermentation processes for bio-production, which can be carried out under ambient pressure and temperature.

In this article, we discuss recent developments in synthetic biology technology for improving the production of important and valuable phytohormones: auxin, gibberellin (GA), and SA. These compounds are involved in numerous applications and comprise a significant proportion of the market demand for phytohormones. These phytohormones not only regulate or promote plant growth but also have beneficial biological effects on mammalian cells, displaying anti-tumor and anti-inflammatory properties (Figure 1). We herein also discuss new advancements in the metabolically engineered cells for the production of these plant hormones. For other phytohormones such as cytokinin, jasmonate, and brassinosteroid, their production through synthetic

Figure 1



Phytohormones (auxin, gibberellin, and salicylic acid) and their applications for plants and humans.

biology has not been investigated significantly and thus is not included in this review.

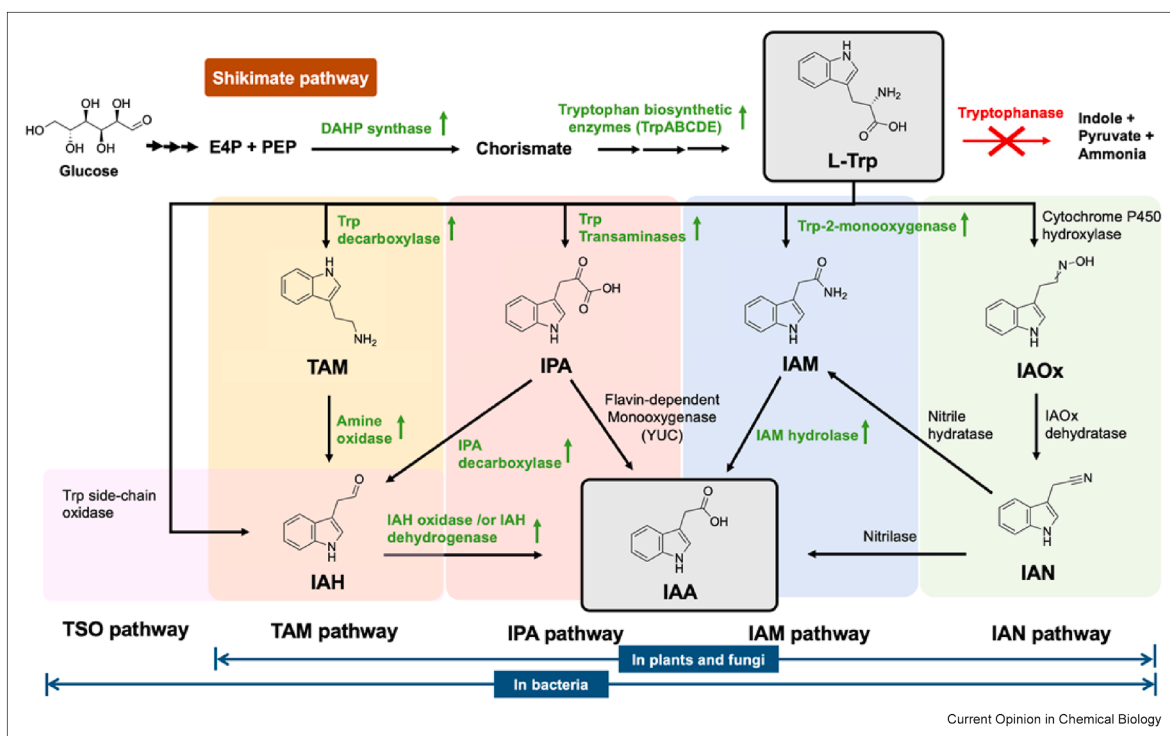
Biosynthetic pathways for indole-3-acetic acid production

Auxin is a type of plant hormone which plays an important role in plant growth and development processes such as cell elongation, fruit and flower development, and responses to light and gravity [6]. It also displays beneficial effects for humans. Indole-3-acetic acid (IAA), a natural

form of auxin, displays anti-tumor activities in human cells [6]. In 2023, the global auxin market was valued at approximately \$0.9–\$0.95 billion. Because global climate change effects have resulted in a lower production yield of various crops, the demand of auxin has increased and thus the market value has been projected to gradually increase to \$1.3 billion by 2032 [7].

IAA, the most abundant auxin in plants, is naturally synthesized by plants and microbes *via* various

Figure 2



Tryptophan-dependent IAA biosynthesis pathways of plants, fungi, and bacteria (black arrows) and metabolically engineered pathways for IAA production in *E. coli* (green and red arrows). TSO pathway, tryptophan side-chain oxidase pathway; TAM pathway, tryptamine pathway; IPA pathway, indole-3-pyruvic acid pathway; IAM pathway, indole-3-acetamide pathway; IAN pathway, indole-3-acetonitrile; E4P, erythrose 4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; DAHP synthase, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase; L-Trp, L-tryptophan; IAH, indole-3-acetaldehyde; IAA, indole-3-acetic acid; IAOx, indole-3-acetaldoxime.

tryptophan-dependent biosynthesis pathways (Figure 2). In plants and fungi, four predominant pathways are involved in IAA biosynthesis including the biosynthesis pathways of tryptamine (TAM), indole-3-pyruvic acid (IPA), indole-3-acetamide (IAM), and indole-3-acetonitrile (IAN). These pathways have different enzymatic steps to convert L-tryptophan (L-Trp) into IAA. Similarly, bacteria produce IAA through five tryptophan-dependent pathways, including pathways producing TAM, IPA, IAM, IAN, and using tryptophan side-chain oxidase (TSO). However, the amounts of IAA obtained from natural plants or wild-type microorganisms are very low [8]; therefore, the extraction of IAA from natural plants or native bacteria is not economically feasible.

To improve IAA production, synthetic biology has been employed to genetically modify microorganisms using various strategies such as engineering tryptophan and IAA biosynthesis pathways to enhance IAA yield [9–15]. For example, genes involved in the IAM and IPA pathways to synthesize IAA, and the *trp* operon for tryptophan production were added into *Escherichia coli* to

enable the cells to produce IAA and boost its productivity by increasing substrate availability [16,17]. The *E. coli* MG1655, engineered by disrupting the tryptophanase gene (*tnaA*) to decrease tryptophan degradation and incorporating the *iaaM* gene from *Pseudomonas savastanoi* and the *ami1* gene from *Arabidopsis thaliana*, which encode tryptophan 2-monooxygenase (TMO) and IAM hydrolase, respectively, could achieve an IAA production titer of 7.1 g/L, the highest IAA titer reported to date [9]. However, IAA production plateaued after 42 h, which was likely due to feedback inhibition of IAM hydrolase activity and incomplete substrate utilization [9]. Recently, *in vitro* production of IAM and IAA was shown to be improved through enzyme and process engineering [16,17].

In addition to engineering IAA pathways in bacteria, *Kluyveromyces marxianus*, a non-conventional yeast widely used in industrial applications because of its ability to utilize a wide range of feedstocks such as xylose, glycerol, and lactose, was engineered by developing novel carbon source-responsive promoters to improve the production of IAA and other products. The results

showed that expressing TMO and IAM hydrolase from *P. savastanoi* under the control of the modified promoter, P_{IN450}, increased the IAA production by 3.6-fold compared to the native promoter, yielding an IAA titer of approximately 0.024 g/L [12]. Additionally, the two enzymes were expressed and colocalized on the peroxisome surface in *K. marxianus* to improve substrate channeling and IAA production. This resulted in a final strain displaying a 9.5-fold increase in IAA production compared to levels produced by the strain in which the enzymes remained cytosolic, which gave an IAA titer of approximately 0.035 g/L [13]*.

IAA has shown beneficial therapeutic effects on human cells. Most recently, in 2025, Vaaben and Woo's research groups employed the probiotic *E. coli*, Nissle 1917 (EcN) as a host for expressing enzymes involved in the IPA pathway (Figure 2). This approach sought to use gut microbiota to convert tryptophan, derived from the breakdown of dietary proteins, into IAA, which can regulate both the innate and adaptive immune systems. Genes involved in the IPA pathway, including those encoding aspartate aminotransferase (*aspC*), decarboxylase (*ipdC*), and dehydrogenase (*iad1*), were overexpressed in EcN to enhance IAA production in response to the production of inflammatory biomarkers (thiosulfate and nitrate) in the gut, demonstrating the therapeutic capability of the probiotic strain EcN producing IAA [14]*. For example, these three genes were introduced into EcN, and RiboJ insulator was incorporated upstream of the *iad1* gene to stabilize mRNA and enhance gene expression, resulting in improved IAA production with a titer of 793 mg/L (Table 1). This strain was further engineered with genetic circuits that respond to thiosulfate *via* the ThsS/ThsR-PphsA two-component system and to nitrate *via* the NarX/NarL-PYeaR system, enabling activation of IAA biosynthesis only when inflammation markers are present [14].

In addition to IAA, halogenated-IAA, including 4-chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA) [18], 5-chloroindole-3-acetic acid (5-Cl-IAA) [19], 6-chloroindole-3-acetic acid (6-Cl-IAA) and 7-chloroindole-3-acetic acid (7-Cl-IAA) [3], and related derivatives could be produced. Lysate of the *E. coli* strain BL21 (DE3) expressing flavin-dependent halogenases, including tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas* sp. NFIX28, tryptophan 6-halogenase (SttH) from *Streptomyces toxytricini*, and tryptophan 5-halogenase (PyrH) from *Streptomyces rugosporus* could generate 7-, 6-, and 5-chlorotryptophan, respectively. These chlorinated-tryptophans were subsequently converted into 7-, 6-, and 5-Cl-IAA products with a conversion rate of 1.1–2.0% using the lysate of *E. coli* expressing the IAM pathway enzymes, IaaM from *P. savastanoi* and IAM hydrolase (IaaH) from *Alcaligenes faecalis* [3] (Table 1). For IAA production in a plant host, *Arabidopsis thaliana* expressing the tryptophan 5-

halogenase gene (*pyrH*) could produce 5-chlorotryptophan, 5-chloroindole-3-acetonitrile (5-Cl-IAN), and 5-Cl-IAA [19].

A real-time biosensor for detecting *in vivo* IAA in plants was developed based on its binding to the *E. coli* tryptophan repressor (TrpR). Although the native TrpR does not bind IAA well, engineering of TrpR (M42F, T44L, T81M, N87G, S88Y) improved binding to IAA, allowing for the construction of a biosensor termed AuxSen, which is a fusion of the engineered TrpR with a pair of fluorescent proteins, mNeonGreen and Aquamarine, to enable fluorescence resonance energy transfer (FRET) as an optical readout. AuxSen could be expressed in *A. thaliana* to enable real-time, reversible visualization of auxin at subcellular resolution [20].

Biosynthetic pathways for production of gibberellins

GA is a secondary metabolite that promotes plant growth and development, such as seed germination, stem and root elongation, and flowering [21]. GAs also show antioxidant, anti-inflammatory, and anti-tumor activities in humans [21]. Although several types of GAs can be produced in plants and fungi, only GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇ have been reported to have biological activities in plant cells [22,23]. GA₃ or gibberellic acid is a key compound valued as a plant hormone used in agricultural crops. The current market value of GA as reported in 2024 is \$0.81 billion and is predicted to reach \$1.26 billion by 2030 [24].

The natural biosynthetic pathways for GAs are found in fungi, bacteria, and plants. These biosynthetic pathways can be divided into three main steps. The first step is the generation of farnesyl pyrophosphate (FPP). In fungi and plants, organisms such as *Fusarium fujikuroi* and *A. thaliana* use acetyl-CoA as a precursor to generate FPP *via* the mevalonate (MVA) pathway, whereas bacteria such as nitrogen-fixing *Rhizobium* sp. and the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* use pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) as precursors for FPP production *via* the methylerythritol phosphate (MEP) pathway. The second step is the production of *ent*-kaurenes, a cluster of specific compounds derived from FPP for GA production in fungi, bacteria, and plants. The last step is the biosynthesis of GA, in which various types of GAs can be produced from *ent*-kaurenes, depending on the organisms and their specific enzymes [25,26]. Biosynthetic reactions and enzymes involved in the GA biosynthesis pathways in fungi, bacteria and plants are shown in Figure 3.

Production of GAs in fungi or yeast has been reported to reach higher yields than those found in bacteria because of their ability to produce higher amounts of intermediates. *Yarrowia lipolytica* [27], *Metschnikowia*

Table 1

Metabolically engineered cells and their abilities to produce IAA, GA, and SA.

Host	Specific engineering/ metabolic operation	Genotype	Feedstock or culture medium	Titer	Reference
Indole-3-acetic acid					
<i>E. coli</i> DH5 α	Delete tryptophanase to reduce utilization of endogenous tryptophan and incorporate IPA pathway enzymes to produce IAA	$\Delta tnaA$ harboring pCES208 plasmid containing P _{tac} - <i>ipdC</i> and P _{sod} - <i>aspC</i> and pCL1921 plasmid containing P _{tac} - <i>iad1</i> (IPA pathway)	LB + L-trp	3 g/L	[10]
<i>E. coli</i> MG1655	Delete tryptophanase to reduce utilization of endogenous tryptophan and incorporate IAM pathway enzymes to produce IAA	$\Delta tnaA$ harboring pTrc99a plasmid containing <i>iaaM</i> and <i>ami1</i> genes (IAM pathway)	Tris-HCl buffer (pH 7.5) supplemented with L-trp	7.1 g/L	[9]
<i>K. marxianus</i> CBS712 $\Delta U\Delta K$	Express IAM pathway enzymes under the control of a modified promoter to improve IAA production	$\Delta ura3$, $\Delta ku70$ harboring plasmid containing <i>iaaM</i> and <i>iaaH</i> genes (IAM pathway) under the control of P _{IN450} (a carbon source-responsive promoter)	SCA + D-lactose + L-trp	~ 0.024 g/L	[12]
<i>K. marxianus</i> CBS712 $\Delta U\Delta K$	Express and co-localize IAM pathway enzymes on the peroxisome surface to improve substrate channeling and IAA production	$\Delta ura3$, $\Delta ku70$ harboring multi-copy bicistronic expression plasmid containing <i>iaaM</i> -PEX15 _{Km} and <i>iaaH</i> -PEX15 _{Km} (IAA biosynthetic genes fused with peroxisome)	SCA + D-lactose + L-trp	~ 0.035 g/L	[13]
<i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN)	Incorporate RiboJ insulator to stabilize mRNA and enhance gene expression and incorporate IPA pathway enzymes to produce IAA	Harboring pTrc99 A plasmid containing RiboJ- <i>iad1-aspC-ipdC</i> gene cluster (IPA pathway)	LB + L-trp	0.793 g/L	[14]
<i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN)	Delete tryptophanase to reduce utilization of endogenous tryptophan and incorporate IPA pathway enzymes to produce IAA	$\Delta tnaA$ harboring pMUT1 plasmid containing <i>aspC</i> , <i>ipdC</i> and <i>iad1</i> genes (IPA pathway)	LB	0.137 g/L	[15]
<i>E. coli</i> Lemo21 (DE3) for expressing IAM pathway enzymes and <i>E. coli</i> BL21 (DE3) for expressing tryptophan halogenases	Incorporate IAM pathway enzymes and tryptophan halogenases to produce halogenated IAA products	<i>E. coli</i> Lemo21 (DE3): Harboring pETDUET-SUMO- <i>iaaM</i> and pCDF-SUMO- <i>iaaH</i> <i>E. coli</i> BL21 (DE3): Harboring individual tryptophan halogenase plasmids (pET-PrnA, pET-PyrH, or pET-STTH)	Potassium phosphate buffer supplemented with L-Trp	1.1–2% conversion	[3]
<i>A. thaliana</i>	Incorporate tryptophan halogenases to produce IAA derivative	Harboring plasmid containing <i>pyrH</i> gene	Murashige and Skoog (MS) medium	70–90 ng chlorinated IAA/g dry weight	[19]
Gibberellins					
<i>F. fujikuroi</i> strain CGMCC No. 2019378	Enhance precursors and intermediates for GAs production, and increase O ₂ and	Harboring plasmid containing <i>hmgr</i> , <i>fpps</i> , <i>cps/ks</i> , <i>ggs2</i> , <i>cpr</i> , <i>vhb</i> and <i>p450-1</i>	Agricultural residues (corn starch, rice flour, soybean meal, peanut powder)	2.89 g/L	[29]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

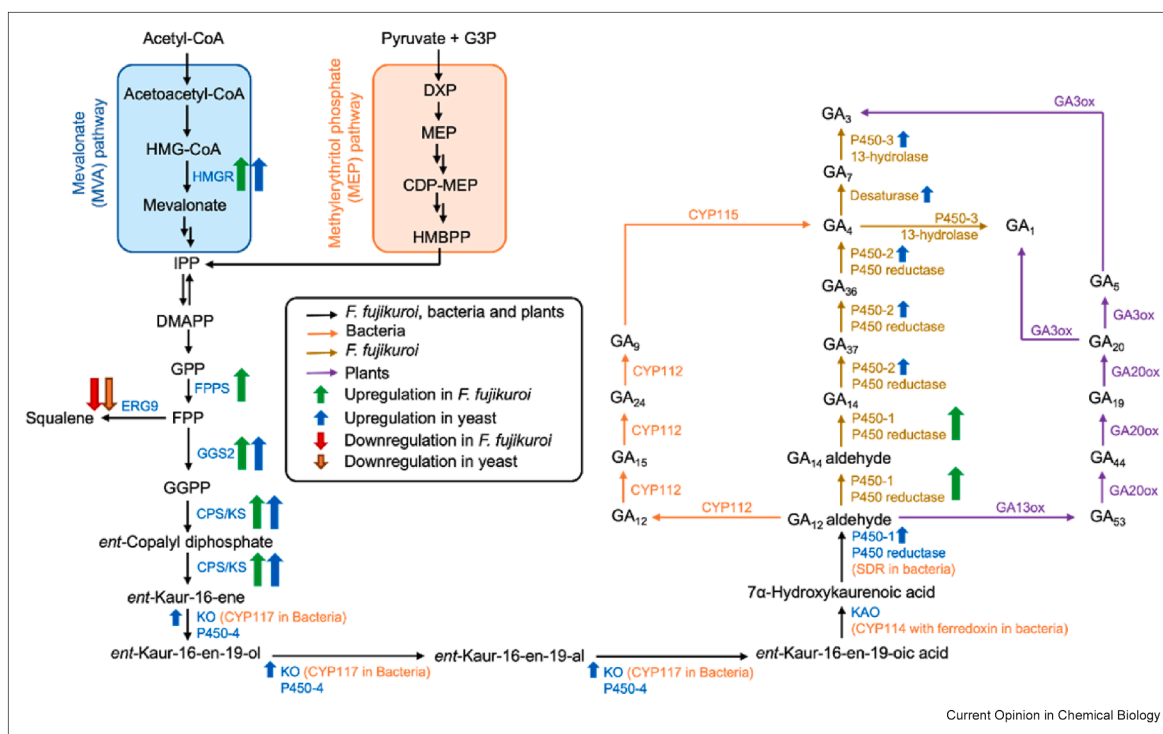
Host	Specific engineering/ metabolic operation	Genotype	Feedstock or culture medium	Titer	Reference
<i>F. fujikuroi</i> strain NRF-C1 (CCTCC M 20231195)	electron transfer to P450s Decrease transcriptional levels of ERG9, a competitive pathway for GAs production	Truncated ERG9 promoter	Glucose and waste cooking oil	3.24 g/L	[22]
Salicylic acid L-Phenylalanine-overproducing <i>E. coli</i> ATCC31882	Enhance availability of key precursors in the aromatic compounds biosynthesis and block the competitive pathways	<i>ptsHI::P_{A1lacO-1}-glk-galP ΔpykF, ΔpykA, ΔpheA, ΔtyrA</i> harboring pZE12ml plasmid (containing <i>ics</i> and <i>ipl</i> genes)	M9 minimal medium supplemented with aromatic amino acids + glucose	11.50 g/L	[38]
L-Phenylalanine-overproducing <i>E. coli</i> ATCC31882	Rewire the flux of PEP into the biosynthetic pathway of aromatic compounds	<i>ptsHI::P_{A1lacO-1}-glk-galP ΔpykF, ΔpykA, ΔpheA, ΔtyrA, Δppc, Δedd, ΔiclR, ΔppsA, Δpck, ΔsdaA, ΔsdaB</i> , Harboring pSAKml- <i>aceBA-gltA</i> plasmid	M9Y minimal medium supplemented with aromatic amino acids + glucose	3.01 g/L	[39]
<i>E. coli</i> W3110	Develop biosensor-enabled high-throughput screening system for SA detection and SA tolerance by ALE approach	<i>ΔpykA::Ptrc-lao-entC-pchB, yjiV::Ptrc-lao-ppsA, ygaY::Ptrc-lao-tktA, yeeP::Ptrc-lao-aroL, yneU::Ptrc-lao-aroGS180F</i> , ALE, FACS	M9 minimal medium + glucose + glycerol + yeast extract + MOPS)	~1.48 g/L	[42]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Implement the shikimate pathway and the genes related to hydroxybenzoic acid degradation	<i>ΔcgmRR (cg1966-cg1998), ΔqsuD, ΔqsuB, ΔnagD, Δcg2392, gnd^{S361F}, aroG^{91g-atg}, pta::P_{H36}-aroG, ΔpheA, ΔtyrA, Δcg0975, ΔpobA, Δcg0344-cg0347, Δcg3349-cg3354, Δcg2624-cg2640, Δcg2966</i>	CGXII medium or CGXIY medium + glucose	12.9 g/L	[40]
<i>E. coli</i> MG1655-U7-09	Use various species of enzyme candidates (e.g. CARs and glucosyltransferase)	U7 (BMGU with T7 RNA polymerase gene integrated into <i>nupG</i> gene site) harboring pETDuet- <i>amS-CARse-sfp-ugt71L1</i>	Modified M9Y medium with glycerol and glucose	0.9123 g/L salicin	[45]
<i>E. coli</i> BW25113 (F')	Boost the flux to increase chorismate and overexpress the salicin producing enzymes	<i>ΔpykA ΔpykF ΔtyrA ΔpheA</i> carrying pZE-EP and pCs-APTA-CSO plasmids	M9 media supplemented with glucose and yeast extract	14.6 g/L salicin	[46]

IPA, indole-3-pyruvic acid; IAA, indole-3-acetic acid; IAM, indole-3-acetamide; GA, gibberellin; PEP, phosphoenolpyruvate; SA, salicylic acid; ALE, adaptive laboratory evolution; CAR, carboxylic acid reductase.

pulcherrima [28], *Fusarium moniliforme* and *E. fujikuroi* [22] were explored as hosts for the production of GAs (Figure 3 and Table 1). The critical criteria for the development of GA-producing cells comprise four main strategies: 1) enhancement of key intermediates in the MVA pathway in the yeast system before the *ent*-kaurene-producing steps, 2) increasing intermediates in the GA-producing biosynthesis pathway, 3) reduction of

pathways competitive with GAs biosynthesis, and 4) addition of auxiliary systems to support GA₃ biosynthesis. In *E. fujikuroi*, GA₃ biosynthesis has been extensively studied and developed for industrial-scale production. A multivariate modular metabolic engineering (MMME) strategy was used to optimize GA₃ production by enhancing the production of precursors and GA-specific intermediates, and P450-mediated

Figure 3



Pathways involved in the gibberellin biosynthesis. GA biosynthesis pathways in bacteria are displayed in black and orange. GA biosynthesis pathways in *F. fujikuroi* are displayed in black and yellow arrows. GA biosynthesis pathways in plants are displayed in black and purple arrows. G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, methylerythritol phosphate; CDP-MEP, 2-phospho-4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol; HMBPP, (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate; GPP, geranyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; HMGR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; FPPS, farnesyl pyrophosphate synthase; ERG9, squalene synthase; GGS2, GGPP synthase; CPS/KS, bifunctional copalyl diphosphate synthase and *ent*-kaurene synthase; KO, *ent*-kaurene oxidase; CYP117, cytochrome P450 monooxygenase functioning as an *ent*-kaurene oxidase; CYP114, *ent*-kaurenoic acid oxidase in bacteria; CYP112, cytochrome P450 enzyme functioning as a GA carbon 20 oxidase; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase; CYP115, cytochrome P450 enzyme functioning as a GA carbon 3 oxidase; P450-1, P450-2, P450-3, P450-4 represents cytochrome P450 monooxygenases; KAO, *ent*-kaurenoic acid oxidase; GA13ox, GA carbon 13 oxidase; GA3ox, GA carbon 3 oxidase; GA20ox, GA carbon 20 oxidase.

oxidation. To increase 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A (HMG-CoA) and FPP, the *hmgr* (encoding HMG-CoA reductase) and *fpps* (encoding farnesyl pyrophosphate synthase) genes were overexpressed in *F. fujikuroi*. Genes involved in the GAs biosynthesis pathway, such as *ggs2* (encoding geranylgeranyl diphosphate synthase 2) and *cps/ks* (encoding *ent*-copalyl diphosphate synthase, *ent*-kaur-16-ene synthase, bifunctional *ent*-kaurene synthase), were also overexpressed to increase production of intermediates and precursors for GAs production. Auxiliary systems such as *vhb* (encoding hemoglobin from bacterial *Vitreoscilla*) were overexpressed to capture and transfer molecular oxygen to enhance the oxidative ability of P450s, while overexpression of *cpr* (encoding NADPH-dependent cytochrome P450 reductase) was performed to enhance electron transfer to P450s, along the *p450-1* (encoding P450-1 monooxygenase). These changes

resulted in enhanced GA₃ accumulation up to levels of 2.89 g/L *via* shake-flask submerged fermentation [29].

Recent studies have shown the improvement of GA₃ production in *F. fujikuroi* by reducing competitive pathways *via* supplementing the media with a small-molecule inhibitor, terbinafine, to inhibit squalene epoxidase (ERG1). The ERG9 promoter was also truncated to decrease squalene synthase (ERG9) expression levels because ERG9 competes with the GAs biosynthesis by using FPP for the squalene biosynthesis, leading to 3.24 g/L GA₃ from waste cooking oil, which is the non-food-competitive feedstock [22]*. Improvement of GA₃ production in *F. fujikuroi* was also studied using a genome-scale metabolic model. The model predicted that introducing genes encoding enzymes for the conversion of acetate to acetyl-CoA and GA₇ to GA₃ resulted in a 35% and 75% increase in GA₃ production,

respectively [30]*. In addition to *F. fujikuroi*, GA₃ production has also been found in two yeast strains, *M. pulcherrima* [28] and *Y. lipolytica* [27], because they have native mevalonate (MVA) pathways. However, both strains showed a low amount of GA production. *M. pulcherrima* produced GA₃ at microgram per gram levels within cells, while *Y. lipolytica* only resulted in a low production of GA₄ and GA₃ (milligram scale) after overexpression of genes involved in the gibberellin biosynthesis pathway from *F. fujikuroi* and *A. thaliana* [27]. The production of GA₃ in *E. coli* was investigated by overexpression of a non-natural steviol biosynthesis pathway to generate GA₅₃ from *ent*-kaurenoic acid *via* steviol biosynthesis, because *E. coli* does not possess the GA production pathway. However, the engineered *E. coli* only produced a trace amount of GA₃ [31]. In addition to GAs produced by biosynthesis pathways, biotransformation of its intermediate *ent*-kaur-16-en-19-oic acid *via* hydroxylation in fungus *Cunninghamella echinulata* could result in compounds displaying cytotoxicity to human breast adenocarcinoma and human hepatocellular carcinoma cell lines [32]. This implies that in addition to agricultural applications, GA biosynthetic intermediates may have potential as anticancer drugs.

Biosynthetic pathways for salicylic acid production

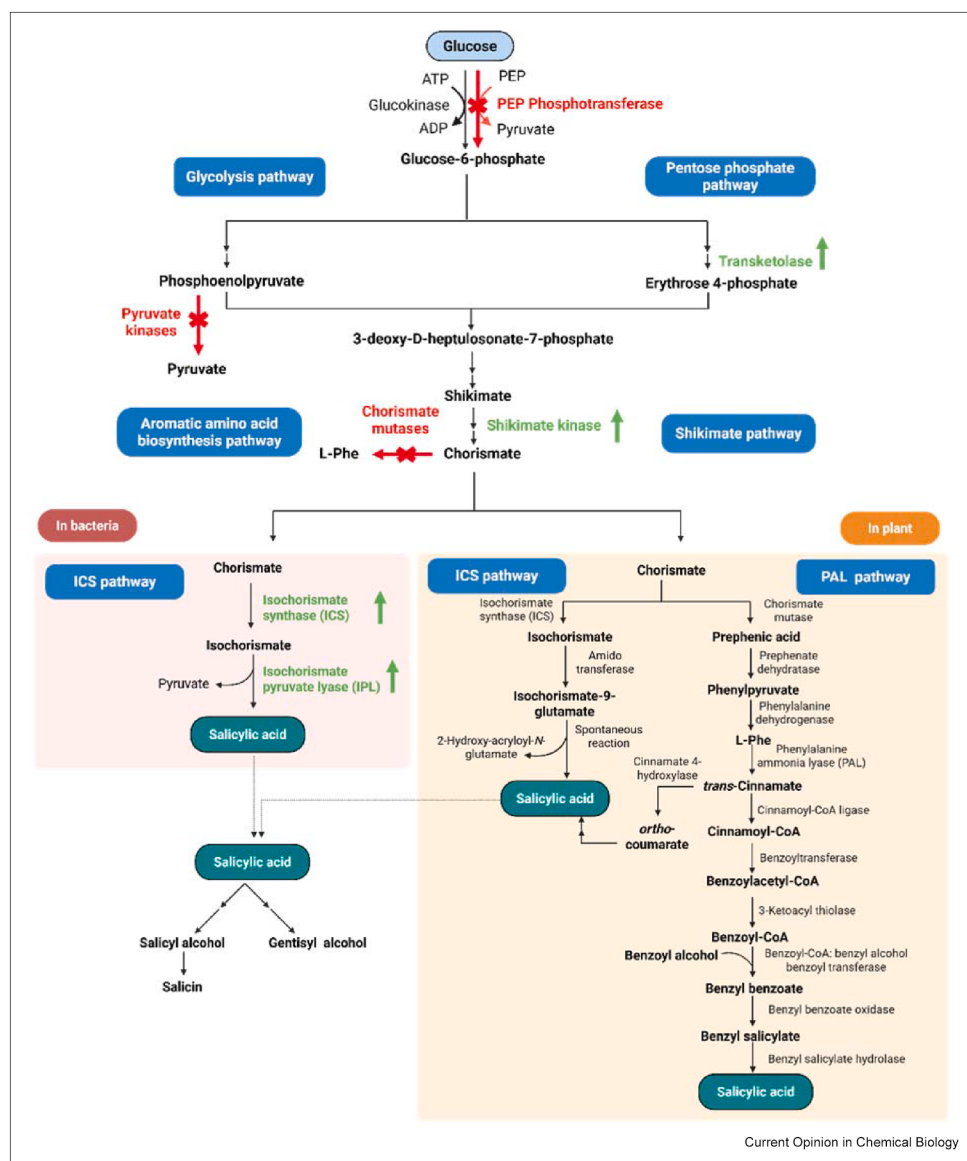
SA or 2-hydroxybenzoic acid can be produced by plants and microorganisms. SA is involved in various physiological processes and controls several signaling pathways in plants, including defensive mechanisms against pathogens and abiotic stresses such as drought, heat, heavy metal exposure, and other physical changes [33]. Besides its defensive mechanisms in plants, SA is widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries as an antibacterial reagent for acne treatment. With these advantages, SA has a high market value of \$511.34 million in 2025 and is expected to reach approximately \$863.45 million by 2035 [34].

In plants and bacteria, the main starting metabolite for producing SA is chorismate, which can be synthesized through the shikimate pathway. Plants and bacteria use different kinds of pathways to produce SA from chorismate. In plants, there are two SA-producing shunts, the isochorismate synthase (ICS) pathway and the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) pathway. In the ICS pathway, two enzymes are required to synthesize SA from chorismate: isochorismate synthase (ICS), which converts chorismate into isochorismate, and amidotransferase, which converts isochorismate and glutamate into isochorismate-9-glutamate. At the final step, spontaneous decomposition of isochorismate-9-glutamate can occur to yield SA and 2-hydroxy-acryloyl-*N*-glutamate (Figure 4). The PAL pathway is much more complicated than the ICS pathway. It employs several enzymatic steps. Chorismate mutase catalyzes the conversion of chorismate to prephenate. Prephenate

dehydrogenase converts prephenate into phenylpyruvate, while phenylalanine dehydrogenase converts phenylpyruvate into L-phenylalanine. At the next step, PAL catalyzes the conversion of L-phenylalanine to *trans*-cinnamic acid (an important antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial agent). This *trans*-cinnamic acid can be further utilized *via* two routes, including the conversion of *trans*-cinnamic acid to form *ortho*-coumaric acid, which is a direct precursor for SA synthesis. Alternatively, *trans*-cinnamic acid can be converted into benzoyl-CoA by three enzymes, cinnamoyl-CoA ligase, benzoyltransferase, and 3-ketoacyl thiolase. Next, benzoyl-CoA: benzyl alcohol benzoyltransferase catalyzes the formation of benzyl salicylate, which is subsequently oxidized and hydrolyzed to generate SA [35–37]*. In bacteria, only the ICS pathway exists; therefore, only two enzymatic steps, ICS, which converts chorismate into isochorismate and isochorismate pyruvate lyase, which converts isochorismate to SA are required.

Because SA has a high market value, several metabolic engineering approaches have been investigated for the production of SA and its derivatives [38–42]. The overall progress of SA production in metabolically engineered cells is shown in Table 1. L-Phe-producing *E. coli* was first engineered to improve production of phosphoenolpyruvate (PEP), a key intermediate of SA production [38]. In this strain, the *ptsHI* gene encoding PEP phosphotransferase was replaced with *glk-galP*, which encodes galactose permease and glucokinase, in order to block the conversion of glucose and PEP into glucose-6-phosphate (G6P) and pyruvate. Moreover, *pykF* and *pykA* encoding pyruvate kinases were inactivated to inhibit the conversion of PEP to form pyruvate. *pheA* and *tyrA* encoding chorismate mutases were also deleted to prevent the leakage of chorismate. Finally, the pZE12mI plasmid harboring *ics* and *ipl* encoding isochorismate synthase and isochorismate pyruvate lyase, respectively, was incorporated to produce the SA product. Using 40% mol/mol glucose, the titer of SA reached 11.5 g/L [38], the highest titer reported to date among engineered strains. Recently, microbial tolerance to acid (SA) was explored as a variable for engineering hosts to be more suitable for industrial biomanufacturing. *E. coli* W3110 harboring a CmeR-P_{cmeO} biosensor-enabled high-throughput screening system was explored as a host for SA production [42]. CmeR is a regulator of the CmeABC multidrug efflux pump and can interact with SA. When CmeR binds to the P_{cmeO}, it inhibits the expression of the *egfp* gene. In the presence of SA, SA binds to CmeR and alleviates repression of *egfp*, leading to the establishment of an SA-dependent biosensor system. All genes for SA production were integrated into the genome of *E. coli* W3110 [42]. The engineered strain was then subjected to adaptive laboratory evolution (ALE) to screen for suitable candidates. An SA-tolerant variant exhibiting a 2.3-

Figure 4



The natural biosynthetic pathways of SA production in bacteria (pink box) and plants (orange box), while the modified pathways, including deleted and integrated enzymes are indicated with red and green arrows, respectively. SA, salicylic acid; ICS pathway, isochorismate synthase pathway; PAL pathway, phenylalanine ammonia lyase pathway; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; L-Phe, L-phenylalanine.

fold increase in tolerance to SA from 0.9 to 2.1 g/L and a 2.1-fold improvement in SA production (from 283 to 588.1 mg/L) was obtained. Finally, the adapted strain was fermented for 60 h and an SA titer of ~1.48 g/L (a 30% improvement compared to the non-adapted strain) could be obtained [42]*. This work demonstrated that integrative approaches including adaptive evolution, multi-pathway regulation at the level of transcriptional level, and incorporation of a high-throughput biosensor screening platform could yield SA-tolerant strains capable of producing high levels of SA.

In addition to direct applications of SA, derivatives of SA, such as salicyl alcohol (2-hydroxybenzyl alcohol) and gentisyl alcohol (2,5-dihydroxybenzyl alcohol) are also high-value compounds for the pharmaceutical industry [43]. Salicyl alcohol can be glycosylated to generate salicin, an anti-inflammatory drug that has minimal side effects in humans compared to aspirin [44]. To produce both salicyl alcohol and gentisyl alcohol, engineered *E. coli* expressing *car* encoding carboxylic acid reductase (CAR), *sfp* encoding CAR maturation factor phosphopantetheinyl transferase, and *adh6* encoding alcohol

dehydrogenase was employed to convert SA into salicyl alcohol (titer of 594.4 mg/L) or 2,5-dihydroxybenzoic acid into gentisyl alcohol (titer of 30.1 mg/L) [43]. Another report also investigated the production of salicin from glucose and glycerol using another engineered *E. coli*. Enzyme candidates from various species (e.g. CARs and glucosyltransferase) were tested, and the final titer achieved reached 912.3 mg/L [45]. Recently, the pathway converting chorismate to salicyl alcohol was fine-tuned such to boost flux and increase chorismate availability. Glucosyltransferase and UDP-glucose producing enzymes were also added to enhance the pool of the glycosyl donor for generating salicin. These attempts led to the highest salicin production level, which was 14.6 g/L in a fed-batch fermenter [46].

Perspectives and conclusions

As climate change effects are expected to reduce fertile land at an increasing speed, future sustainable technologies to promote plant growth and protect plants from environmental stressors are needed. The use of phytohormones in combination with bio-fertilizers, as well as implementation of sensor and automation technology can play important roles in precision agriculture, which aims to reduce the utilization of chemicals in farming and agriculture [47]. Industrial-scale production of phytohormones *via* metabolic engineering is instrumental in realizing this implementation.

Besides the utilization of phytohormones in plant growth, the discovery of therapeutic phytohormone activities in mammalian cells has paved the way for new applications of these compounds. IAA can be used to treat pancreatic cancer in both patients and mice because it increases the efficiency of chemotherapy in pancreatic cancer treatment [48]. Normally, chemotherapy is used to kill cancer cells by inducing cell death *via* apoptosis. It was found that IAA can indirectly induce tumor-cell death through the generation of radical oxygen species (ROS), thereby enhancing responses to chemotherapy treatment [48]. GA₃ has also shown therapeutic effects on several NF-κB-related diseases such as cancer and autoimmune diseases [21]. For SA, apart from its applications in acne treatment which is widely used in skincare products, SA can react with hydroxyl radicals in granulocytes to neutralize free radicals and reduce oxidative damage [49].

Although various phytohormones can be produced *via* engineered microbes, several challenges still need to be overcome for further development including: (1) the need to increase production yields to meet industrial level demand, (2) the need for improved technologies for real-time detection, visualization, quantification, and rapid-monitoring at cellular resolution in plants (similar technology used for IAA detection [20] may be

developed to detect other phytohormones), and (3) the need for implementation of artificial intelligence (AI)/ machine learning (ML), and other bioinformatics tools to optimize the amount of nutrients and phytohormones for plant growth [50]. It can be envisaged that rapid developments in enzyme, metabolic, and host engineering, along with process optimization will support efficient production of phytohormones, which will be important for achieving sustainable agriculture and medicine.

Declaration of competing interest

There are no competing interests to disclose.

Acknowledgements

This work was supported by the Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology (VISTEC) (to P.I., N.K., D.T., and P.C.), the National Science Research Fund (NSRF) in Thailand *via* the Program Management Unit for Human Resources & Institutional Development (PMU-B) Research and Innovation grant number B38G680005 (to P.I.) and the Fundamental Fund from Thailand Science Research and Innovation 2026 grant number FRB690039/0457 (to D.T.). All figures were generated with ChemDraw and bioRENDER.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

* of special interest

1. Waadt R, Sella CA, Hsu P-K, Takahashi Y, Munemasa S, Schroeder JI: **Plant hormone regulation of abiotic stress responses**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022, **23**:680–694.
2. Ali J, Mukarram M, Ojo J, Dawam N, Riyazuddin R, Ghramh HA, Khan KA, Chen R, Kurjak D, Bayram A, Phytohormones Harnessing: **Advancing plant growth and defence strategies for sustainable agriculture**. *Physiol Plantarum* 2024, **176**, e14307.
3. Menon N, Richmond D, Rahman MR, Menon BRK: **Versatile and facile one-pot biosynthesis for amides and carboxylic acids in *E. coli* by engineering auxin pathways of plant micro-biomes**. *ACS Catal* 2022, **12**:2309–2319.
4. Corey EJ, Munroe JE: **Total synthesis of gibberellic acid. A simple synthesis of a key intermediate**. *J Am Chem Soc* 1982, **104**:6129–6130.
5. Batool SS, Gilani SR, Tahir MN, Harrison WTA, Mitu L, Mazhar S: **Synthesis and structural features of copper(II) complexes of N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine with 2-chlorobenzoate¹⁻ and 2-hydroxybenzoate¹⁻**. *J Coord Chem* 2018, **71**:2569–2583.
6. Mukherjee A, Gaurav AK, Singh S, Yadav S, Bhowmick S, Abeyasinghe S, Verma JP: **The bioactive potential of phytohormones: a review**. *Biotechnol Rep* 2022, **35**, e00748.
7. Auxins Market Size - Global Industry, Share, Analysis: *Trends and Forecast 2024 - 2032*. Acumen Research and Consulting; 2024. <https://www.acumenresearchandconsulting.com/auxins-market>.

8. Nsanzabera F, Liu B: **Multiplex metabolic engineering for enhanced indole-3-acetic acid production via optimized biosynthetic pathways in *E. coli***. *Process Biochem* 2025, **157**: 147–161.
 9. Wu H, Yang J, Shen P, Li Q, Wu W, Jiang X, Qin L, Huang J, Cao X, Qi F: **High-level production of Indole-3-acetic acid in the metabolically engineered *Escherichia coli***. *J Agric Food Chem* 2021, **69**:1916–1924.
 10. Romasi EF, Lee J: **Development of indole-3-acetic acid-producing *Escherichia coli* by functional expression of *Ipdc*, *AspC*, and *lad1***. *J Microbiol Biotechnol* 2013, **23**: 1726–1736.
 11. Guo D, Kong S, Chu X, Li X, Pan H: **De Novo Biosynthesis of Indole-3-acetic Acid in Engineered *Escherichia coli***. *J Agric Food Chem* 2019, **67**:8186–8190.
 12. Bassett S, Da Silva NA: **Engineering a carbon source-responsive promoter for improved biosynthesis in the non-conventional yeast *Kluyveromyces marxianus***. *Metabolic Eng Comm* 2024, **18**, e00238.
 13. Bassett S, Suganda JC, Da Silva NA: **Engineering peroxisomal surface display for enhanced biosynthesis in the emerging yeast *Kluyveromyces marxianus***. *Metab Eng* 2024, **86**: 326–336.
- Improvement of substrate channeling and IAA production by expressing enzymes and colocalizing on the peroxisome surface in *K. marxianus*.
14. Woo S-G, Kim SK, Lee S-G, Lee D-H: **Engineering probiotic *Escherichia coli* for inflammation-responsive indoleacetic acid production using RiboJ-enhanced genetic circuits**. *J Biol Eng* 2025, **19**:10.
- Proof-of-concept of *in situ* IAA-based therapies using the probiotic strain *E. coli* Nissle 1917 (EcN) for producing IAA in response to gut inflammatory biomarkers.
15. Vaaben TH, Lützhøft DO, Koulouktis A, Dawoodi IM, Stavnsbjerg C, Kvich L, Gögenur I, Vazquez-Urbe R, Sommer MOA: **Modulating tumor immunity using advanced microbiome therapeutics producing an indole metabolite**. *EMBO Rep* 2025, **26**:1688–1708.
 16. Kongjaroon S, Lawan N, Trisvirat D, Chaiyen P: **Enhancement of tryptophan 2-monooxygenase thermostability by semi-rational enzyme engineering: a strategic design to minimize experimental investigation**. *RSC Chem Biol* 2024, **5**: 989–1001.
 17. Mapinta S, Kongjaroon S, Trisvirat D, Kesornpun C, Wu J, Chaiyen P, Weeranoppanant N: **Continuous-flow chemoenzymatic gram-scale synthesis of indole-3-acetic acid**. *Green Chem* 2024, **27**:793–803.
 18. Tivendale ND, Davidson SE, Davies NW, Smith JA, Dalmais M, Bendahmane AI, Quittenden LJ, Sutton L, Bala RK, Le Signor C, *et al.*: **Biosynthesis of the halogenated auxin, 4-chloroindole-3-acetic acid**. *Plant Physiol* 2012, **159**:1055–1063.
 19. Patallo EP, Walter A, Milbredt D, Thomas M, Neumann M, Caputi L, O'Connor S, Ludwig-Müller J, van Pée K-H: **Strategies to produce chlorinated Indole-3-Acetic acid and Indole-3-Acetic acid intermediates**. *ChemistrySelect* 2017, **2**: 11148–11153.
 20. Herud-Sikimić O, Stiel AC, Kolb M, Shanmugaratnam S, Berendzen KW, Feldhaus C, Höcker B, Jürgens G: **A biosensor for the direct visualization of auxin**. *Nature* 2021, **592**:768–772.
 21. Alabdeen Khdar Z, Le TM, Szakonyi Z: **Gibberellic acid (GA₃): a versatile chiral building block for syntheses of pharmaceutical agents**. *Chem Biodivers* 2025, **22**, e202401823.
 22. Shi T-Q, Shen Y-h, Li Y-W, Huang Z-Y, Nie Z-K, Ye C, Wang Y-T, Guo Q: **Improving the productivity of gibberellic acid by combining small-molecule compounds-based targeting technology and transcriptomics analysis in *Fusarium fujikuroi***. *Bioresour Technol* 2024, **394**, 130299.
- Truncation of promoter to reduce the competitive pathway of GAs biosynthesis.
23. Zhang H, Dai P, Gao X, Li H, Zhai R, Yang C, Wang Z, Xu L: **Gibberellin acid 4 and 7 increase indole-3-acetic acid production and induce cell division via PbCRF4-mediated activation of PbYUCCA6 expression in 'Dangshansu' pear**. *Sci Hortic* 2024, **327**, 112858.
 24. *Gibberellins Market, - Global Industry Size, Share, Trends, Opportunity, and Forecast, Segmented by product type (19-Carbon gibberellins, 20-Carbon gibberellins), by form (Powder, granules, liquid), by application (malting of barley, sugarcane yield, fruit production, seed production, others), by region & competition, 2020-2030F*. TechSci Research LLC; 2025.
 25. Nagel R, Turrini PCG, Nett RS, Leach JE, Verdier V, Van Sluys M-A, Peters RJ: **An operon for production of bioactive gibberellin A4 phytohormone with wide distribution in the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola***. *New Phytol* 2017, **214**:1260–1266.
 26. Nett RS, Montañares M, Marcassa A, Lu X, Nagel R, Charles TC, Hedden P, Rojas MC, Peters RJ: **Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution**. *Nat Chem Biol* 2017, **13**:69–74.
 27. Kildegaard KR, Arnesen JA, Adiego-Pérez B, Rago D, Kristensen M, Klitgaard AK, Hansen EH, Hansen J, Borodina I: **Tailored biosynthesis of gibberellin plant hormones in yeast**. *Metab Eng* 2021, **66**:1–11.
 28. Kachalkin AV, Lepeshko AA, Streletskaia RA, Glushakova AM: **Endophytic strains of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* positive for phytohormones production**. *Biologia* 2024, **79**: 299–309.
 29. Wang H-N, Ke X, Jia R, Huang L-G, Liu Z-Q, Zheng Y-G: **Multivariate modular metabolic engineering for enhanced gibberellic acid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi***. *Bioresour Technol* 2022, **364**, 128033.
 30. Li Y-W, Qian J-Y, Huang J-C, Guo D-S, Nie Z-K, Ye C, Shi T-Q: **Improving gibberellin GA₃ production with the construction of a genome-scale metabolic model of *Fusarium fujikuroi***. *J Agric Food Chem* 2023, **71**:18890–18897.
- Improvement of GA₃ production in a genome-scale metabolic model.
31. Lin Y, Liang M, Pang H, Wang Z, Bi H, Wei Y, Du L: **Production of gibberellins via a non-natural pathway using steviol as a substrate**. *J Agric Food Chem* 2024, **72**:540–548.
 32. Song C, Liu J, Wang H, Li X, Liu B, Zhang M, Shan X, Li H, Gao J, Qin J: **New derivatives from microbial transformation of ent-Kaur-16-en-19-oic acid by *Cunninghamella echinulata***. *Chem Biodivers* 2020, **17**, e2000178.
 33. Rivas-San Vicente M, Plasencia J: **Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development**. *J Exp Bot* 2011, **62**:3321–3338.
 34. Salicylic Acid Market Size: *Growth, and forecast for 2025 to 2035*. 2025. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/salicylic-acid-market>. Future Market Insights.
 35. Liu Y, Xu L, Wu M, Wang J, Qiu D, Lan J, Lu J, Zhang Y, Li X, Zhang Y: **Three-step biosynthesis of salicylic acid from benzoyl-CoA in plants**. *Nature* 2025, **645**:201–207.
- Identification of enzymes in SA biosynthesis via the benzoyl-CoA via phenylalanine ammonia-lyase pathway in a model *Nicotiana benthamiana* and knockout analysis of the related genes in *Oryza sativa*.
36. Zhu B, Zhang Y, Gao R, Wu Z, Zhang W, Zhang C, Zhang P, Ye C, Yao L, Jin Y, *et al.*: **Complete biosynthesis of salicylic acid from phenylalanine in plants**. *Nature* 2025, **645**: 218–227.
- Characterization of the phenylalanine ammonia-lyase pathway (PAL) for SA biosynthesis via functional analysis of rice (*Oryza sativa*) and evolutionary analysis of the PAL-SA pathway in plants.
37. Wang Y, Song S, Zhang W, Deng Q, Feng Y, Tao M, Kang M, Zhang Q, Yang L, Wang X, *et al.*: **Deciphering phenylalanine-derived salicylic acid biosynthesis in plants**. *Nature* 2025, **645**:208–217.
- Filling a major knowledge gap in the biosynthesis of SA via the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) pathway in rice and investigating the relationship between SA biosynthesis and pathogen resistance in rice.
38. Noda S, Shirai T, Oyama S, Kondo A: **Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives**. *Metab Eng* 2016, **33**:119–129.

39. Noda S, Mori Y, Fujiwara R, Shirai T, Tanaka T, Kondo A: **Reprogramming *Escherichia coli* pyruvate-forming reaction towards chorismate derivatives production.** *Metab Eng* 2021, **67**:1–10.
 40. Doke MKM, Hirata Y, Nakano M, Horita M, Nonaka D, *et al.*: **Hydroxybenzoic acid production using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*.** *Synthetic Biol Eng* 2023, **1**, 10010.
 41. Liu Q, Chen X, Hu G, Chu R, Liu J, Li X, Gao C, Liu L, Wei W, Song W, *et al.*: **Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of Para-hydroxybenzoic acid.** *Food Chem* 2024, **457**, 140165.
 42. Wang K, Pan X, Yang T, Rao Z: **Efficient production of salicylic acid through CmeR-PcmeO biosensor-assisted multiplexing pathway optimization in *Escherichia coli*.** *Biotechnol Biofuel Bioprod* 2025, **18**:40.
- Using several integrative approaches including adaptive evolution, multi-pathway regulation at the level of transcriptional regulator, and high-throughput biosensor screening platform.
43. Shen X, Wang J, Gall BK, Ferreira EM, Yuan Q, Yan Y: **Establishment of novel biosynthetic pathways for the production of salicyl alcohol and gentisyl alcohol in engineered *Escherichia coli*.** *ACS Synth Biol* 2018, **7**:1012–1017.
 44. Kumar S, Singh SK, Calabrese C, Maris A, Melandri S, Das A: **Structure of saligenin: microwave, UV and IR spectroscopy studies in a supersonic jet combined with quantum chemistry calculations.** *Phys Chem Chem Phys* 2014, **16**: 17163–17171.
 45. Zhang M, Liu C, Xi D, Bi H, Cui Z, Zhuang Y, Yin H, Liu T: **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level production of salicin.** *ACS Omega* 2022, **7**:33147–33155.
 46. Wang J, Zhao Q, Chen X, Lu Y, Sun X, Yuan Q, Wang J, Shen X: **Engineering a novel pathway for efficient biosynthesis of salicin in *Escherichia coli*.** *Metab Eng* 2024, **86**:172–180.
 47. Hirayama T, Mochida K: **Plant hormonomics: a key tool for deep physiological phenotyping to improve crop productivity.** *Plant Cell Physiol* 2023, **63**:1826–1839.
 48. Seo YD, Wargo JA: **From bugs to drugs: bacterial 3-IAA enhances efficacy of chemotherapy in pancreatic cancer.** *Cell Rep Med* 2023, **4**, 101039.
 49. Sagone Jr AL, Husney RM: **Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems.** *J Immunol* 1987, **138**:2177–2183.
 50. Ristova D, Carré C, Pervent M, Medici A, Kim GJ, Scalia D, Ruffel S, Birnbaum KD, Lacombe B, Busch W, *et al.*: **Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the *Arabidopsis thaliana* root.** *Sci Signal* 2016, **9**:rs13. -rs13.