

DOI: 10.13376/j.cblls/2019056

文章编号: 1004-0374(2019)05-0423-07



张雪洪, 现任上海交大学生命科学技术学院生物工程系教授、微生物代谢国家重点实验室副主任。自1989年浙江大学硕士研究生毕业起, 即在上海交通大学生物工程系工作, 一直从事生物工程上下游的教学和研究。主要研究方向为微生物代谢工程与合成生物学、生物物质的分离纯化、农业生物药物等。1999年获得上海交通大学博士学位。先后担任助教、讲师、副教授、教授, 曾任上海交大生命科学技术学院副院长、常务副院长。兼任上海市化学化工学会理事、生物技术与工程专业委员会副主任。曾主持国家“十一五”863重大项目、“十二五”863主题项目、国家自然科学基金项目等, 在生物工程、微生物学等相关刊物发表SCI文章100余篇。

## 假单胞菌中基于羟基苯甲酸的合成生物学

王松伟, 张雪洪\*

(上海交大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

**摘要:** 假单胞菌是一类重要的环境微生物, 具有卓越的物质分解转化和合成能力, 利用莽草酸途径可以合成多种芳香族化合物, 包括羟基苯甲酸等平台产品。羟基苯甲酸, 如2-羟基苯甲酸(2-HBA)、3-羟基苯甲酸(3-HBA)、4-羟基苯甲酸(4-HBA)和3,4-二羟基苯甲酸(PCA), 在假单胞菌碳代谢中起着重要作用。以羟基苯甲酸作为合成生物学的一个基本模块, 用于合成高附加值的衍生物具有广阔的前景。探究基于不同羟基苯甲酸为前体的细胞工厂建立, 可为假单胞菌合成生物学平台的应用和构建打下良好的基础。

**关键词:** 假单胞菌; 莽草酸途径; 羟基苯甲酸; 合成生物学平台

中图分类号: Q81; Q936 文献标志码: A

## Biosynthesis based on hydroxybenzoate acid in *Pseudomonas*

WANG Song-Wei, ZHANG Xue-Hong\*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology,  
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** *Pseudomonas* has been well engineered as typical microorganisms for value-added aromatic compound production including hydroxybenzoate acid on the basis of shikimate pathway. Hydroxybenzoate acids, such as 2-hydroxybenzoate acid (2-HBA), 3-hydroxybenzoate acid (3-HBA), 4-hydroxybenzoate acid (4-HBA) and 3,4-dihydroxybenzoate acid (PCA), play key roles in the microbial carbon metabolism of *Pseudomonas*. Using the versatile intermediate platform of hydroxybenzoate acid, a lot of high-value products can be synthesized efficiently. With a close-up at the future perspectives, a series of commercial biological products could be developed through the design and construction of artificial biosynthetic pathways in conventional microorganisms *Pseudomonas* for synthetic biology platform construction.

**Key words:** *Pseudomonas*; shikimate pathway; hydroxybenzoate acid; synthetic biology platform

收稿日期: 2018-12-01; 修回日期: 2019-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670033)

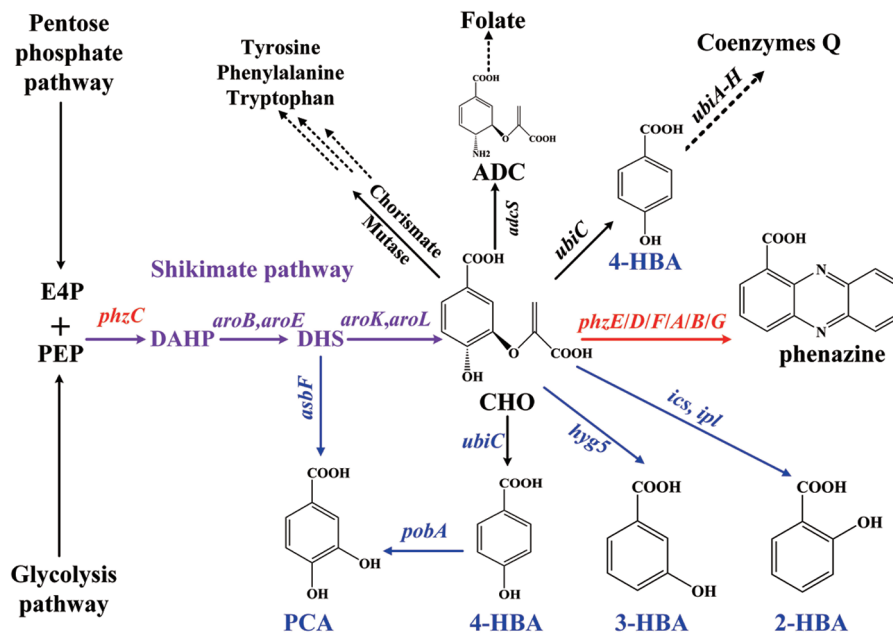
\*通信作者: E-mail: xuehzhong@sjtu.edu.cn

利用假单胞菌卓越的物质分解转化和合成能力,将假单胞菌改造成高效的细胞工厂是工业生物技术的研究热点之一。代谢工程和合成生物学技术的发展极大地提升了细胞工厂的构建能力,拓展了应用范围。通过合成途径的设计、构建、改造、优化,到细胞生产性能的优化,已成功构建出一系列高效的微生物合成平台。目前主要的微生物合成宿主为大肠杆菌、芽孢杆菌、酵母菌等。随着基因组学、蛋白质组学和合成生物学的迅速发展,不同的细胞工厂宿主菌分别得到了研究,生产潜力得以挖掘。

假单胞菌是一种重要的环境微生物,对极端环境,如高温、极端 pH 和毒素有非常高的适应性,同时能够耐受高浓度芳香族化合物<sup>[1]</sup>。假单胞菌也是重要的工业微生物,目前生产应用的假单胞菌主要有荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、绿针假单胞菌等。陶氏化学公司成功构建荧光假单胞菌外源蛋白表达体系<sup>[2]</sup>;作为分解环境有毒物质的恶臭假单胞菌,已成功用于生产单萜香叶酸、聚羟基脂肪酸酯、脂肪醇等<sup>[3-5]</sup>;铜绿假单胞菌 M18 和 PA1201 能够高产吩嗪-1-羧酸,产量达到 8~9 g/L<sup>[6]</sup>;绿针假单胞菌 GP72 和 HT66 用于生产 2-羟基吩嗪和吩嗪-1-酰胺等抗生素,后者产量达到 9 g/L<sup>[7]</sup>。假单胞菌基因组平均约为 6 M<sup>[8]</sup>,适合制备小分子化合物。随着假单胞菌基因组学、蛋白质组学、代

谢组学研究的深入,人们对假单胞菌高效生产机制的理解上升到系统、分子层次;与此同时,假单胞菌遗传操作系统也不断成熟,为系统地研究和改造假单胞菌,将假单胞菌打造成通用底盘细胞应用于合成生物学奠定了基础<sup>[9]</sup>。

羟基类苯甲酸是工业上重要的芳香族化合物,2-羟基苯甲酸(2-HBA)、3-羟基苯甲酸(3-HBA)、4-羟基苯甲酸(4-HBA)和 3,4-二羟基苯甲酸(PCA)在微生物碳代谢中起着重要作用,例如作为木质素降解中间体或多聚物类化合物合成的前体<sup>[10-12]</sup>。羟基类化合物在假单胞菌中以莽草酸途径为前导途径合成<sup>[13]</sup>,如图 1 所示, *phzC* 编码假单胞菌莽草酸途径的第一个酶——3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)合酶,催化 PEP 和 E4P 生成 DAHP。莽草酸途径是芳香族化合物合成过程中的一般共同代谢过程,除丙苯氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)外,植物和微生物体内的其他重要代谢产物,包括维生素 K1 和 K2、水杨酸、叶酸、辅酶 Q10 等都是经莽草酸途径合成的<sup>[14]</sup>。芳香族氨基酸在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中的合成与生产已被广泛研究<sup>[15-19]</sup>。微生物对芳香族化合物的代谢起着重要的作用,而假单胞菌的作用最为突出,如能高产吩嗪类抗生素的绿针假单胞菌具有高效的莽草酸途径。多数芳香族化合物的氧化会产生羟基苯甲酸,羟基苯甲酸是工业上重要的平台化合物,在假单胞菌次级代谢中



红色: 吩嗪合成途径; 蓝色: 羟基类化合物的合成途径; 紫色: 莽草酸途径。

图1 假单胞菌莽草酸途径及其衍生物的合成途径<sup>[11-12]</sup>

起着重要作用, 可以用于生产塑料纤维、化妆品, 以及食品和食品饲料添加剂等。由于假单胞菌对芳香族化合物的显著耐受能力, 可以作为合成羟基苯甲酸类化合物的底盘菌株。在假单胞菌中以羟基苯甲酸作为合成生物学的一个基本模块, 将其用于合成多种高附加值的生物产品具有广阔的前景。

## 1 基于3-羟基苯甲酸为平台的生物合成

3-羟基苯甲酸(3-HBA)是一种常见的木质素降解过程中的芳香族中间产物, 被用作防腐和杀菌剂, 同时也用于医药合成中间体<sup>[10]</sup>。

### 1.1 以3-HBA为前体的龙胆酸的生物合成

假单胞菌具有高效的芳香族化合物降解能力, 可利用3-HBA为唯一碳源和能源生长, 3-羟基苯甲酸-6-单加氧酶催化3-HBA产生龙胆酸, 进入龙胆酸途径<sup>[20-22]</sup>。在制药工业中, 龙胆酸可以作为抗氧化赋型剂, 同时还是基体辅助激光解析电离质谱中常用的基体。

3-HBA一般由莽草酸途径合成, 3-羟基苯甲酸合成酶催化分支酸产生3-HBA, 在大肠杆菌中以分支酸为前体催化产生3-HBA, 产量达到2.2 g/L<sup>[23]</sup>。如图2所示, 在假单胞菌龙胆酸途径中, 利用内源途径, 3-HBA继续经单加氧酶MhbM催化产生龙胆酸, 但未见合成产量详细报道。

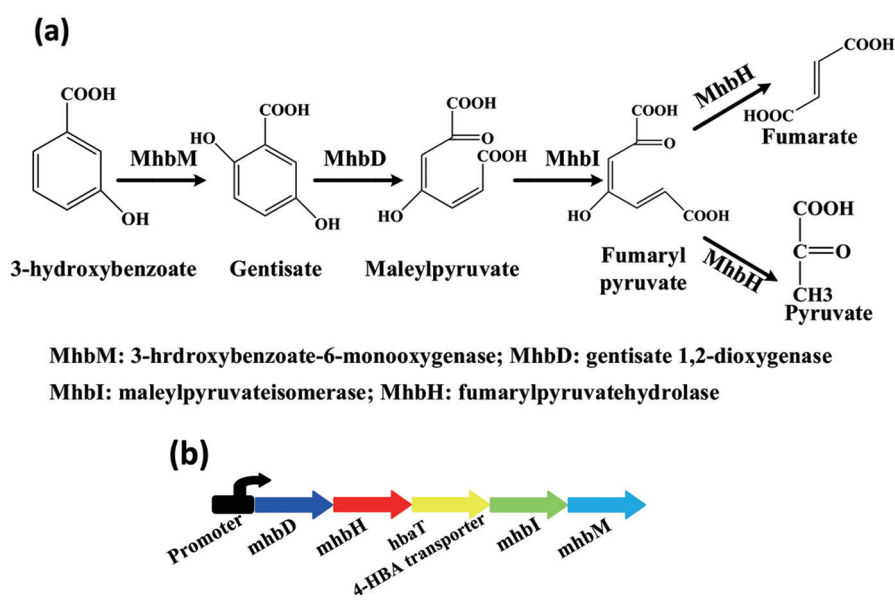
### 1.2 以3-HBA为前体的马来酸的生物合成

假单胞菌中广泛存在龙胆酸途径, 前期有学者

在大肠杆菌中, 利用假单胞菌龙胆酸降解途径来源的基因合成了马来酸, 产量达到7.1 g/L<sup>[22]</sup>。在恶臭假单胞菌、产碱假单胞菌、硝基还原假单胞菌和嗜松香假单胞菌等中都有龙胆酸降解途径的报道<sup>[24-27]</sup>。马来酰丙酮酸合成酶(MhbD)催化氧化龙胆酸形成马来酰丙酮酸, 随后进一步被MhbI、MhbH催化产生马来酸或富马酸<sup>[22]</sup>。马来酸是一种具有重要价值的四碳二羧酸类有机酸, 其衍生物马来酸酐可以用于合成高分子材料和用于医药行业。图2b所示, 假单胞菌中具有完整的龙胆酸降解基因簇, 结合假单胞菌内源高效龙胆酸降解途径以3-HBA为前体可以实现龙胆酸和马来酸等高附加值生物制品的合成。

### 1.3 以3-HBA为前体的生物合成途径设计

3-氨基-5-羟基苯甲酸(3,5-AHBA)是许多天然产物的合成前体, 包括萘、苯二胺类和丝裂霉素家族抗生素, 而3,5-AHBA是经特殊的氨基莽草酸途径合成的<sup>[28]</sup>, 在利福霉素合成途径中首次鉴定了3,5-AHBA合成基因。从结构分析来看, 3,5-AHBA可以在3-HBA基础上, 在苯环上通过加上氨基而形成。在假单胞菌吩嗪类抗生素合成过程中, 第一个酶PhzE催化分支酸和来源于谷氨酰胺的一个氨基生成2-氨基-2-脱氧异分支酸<sup>[29]</sup>。因此, 可以筛选不同来源的氨基转移酶和氨基供体, 实现假单胞菌中3-HBA直接催化转化为3,5-AHBA。链霉菌中萜类天然产物brasiliardin A也是以3-HBA为前体合成的<sup>[30]</sup>。在假单胞菌中, 以3-HBA为前体合成



a: 以3-HBA为前体合成龙胆酸和富马酸途径; b: 假单胞菌龙胆酸降解基因簇。

图2 假单胞菌中以3-HBA为前体的龙胆酸合成途径<sup>[21-22]</sup>



萜类或聚酮类天然产物具有广阔前景。

## 2 基于2-羟基苯甲酸为平台的生物合成

2-羟基苯甲酸(2-HBA),又名水杨酸,是阿司匹林以及很多止痛药的主要成分,广泛应用于医药生产,而且2-HBA还可以调节植物生长和发育<sup>[31]</sup>。2-HBA在不同菌株中已被合成,主要有大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌<sup>[10,32]</sup>。在假单胞菌中,可以利用异分支酸途径合成2-HBA,如图1所示。

### 2.1 以2-HBA为前体的龙胆酸的生物合成

以2-HBA为前体,引入*nagGH*编码的5-水杨酸羟化酶可以合成龙胆酸,*nagGH*最初被归属于假单胞菌,后进一步被分类归属为罗尔斯通菌属<sup>[33]</sup>。图1所示,经过异分支酸途径,催化分支酸产生2-HBA,5-水杨酸羟化酶催化2-HBA生产龙胆酸<sup>[34]</sup>。尽管结合假单胞菌代谢特征,在假单胞菌内以2-HBA为前体合成龙胆酸具有前景,但具体研究尚未见报道。

### 2.2 以2-HBA为前体的生物合成途径设计

以2-HBA为前体,可以生物合成分枝杆菌生长素和耶尔森<sup>[30]</sup>。据报道,厦门链霉菌318来源的异戊烯基转移酶XimB可以高效催化不同羟基化合物,XimB具有广泛的底物特异性<sup>[35]</sup>,结合假单胞菌代谢特征,在假单胞菌中异源表达*ximB*催化羟基类化合物2-HBA,合成具有较强生物活性的异戊烯化芳香族化合物。以XimB作为分子开关,在假

单胞菌内实现高附加值异戊烯类芳香族化合物的生产表达。

## 3 基于4-羟基苯甲酸为平台的生物合成

4-羟基苯甲酸(4-HBA)是一种重要的生物化工产品 and 中间体,可衍生出多种高附加值的产物,如天麻素、香草醇、泛醌、厦门真菌素、白藜芦醇、黏糠酸、熊果苷等<sup>[11-12, 14, 36]</sup>。假单胞菌中,莽草酸途径是3种芳香族氨基酸、叶酸、辅酶Q等的共同代谢途径,4-HBA是辅酶Q合成过程的第一步产物。在假单胞菌中建立以4-HBA为前体的合成平台具有广阔的前景,如图3所示。

### 3.1 以4-HBA为前体的黏糠酸的生物合成

黏糠酸是一种重要的生物化工产品 and 中间体,氢化后生成的己二酸是用于生产塑料和尼龙的平台化合物<sup>[37-38]</sup>。同时,黏糠酸是一系列芳香族化合物降解过程中天然存在的中间体,是假单胞菌 $\beta$ -酮己二酸降解途径的天然产物<sup>[39]</sup>,利用假单胞菌发酵生产黏糠酸具有天然优势。恶臭假单胞菌KT2440-JD1是被报道的第一个可以合成黏糠酸的假单胞菌,在14 L发酵罐水平发酵4 d可以产生45 g/L的黏糠酸<sup>[40-41]</sup>。另有报道,在绿针假单胞菌HT66中,以4-HBA为前体,结合内源的 $\beta$ -酮己二酸降解途径,利用内源高效启动子*P<sub>phz</sub>*表达黏糠酸合成基因簇,可以实现黏糠酸的合成。使用染色体整合技术,将黏糠酸合成基因簇整合到基因组染色体上,阻断黏

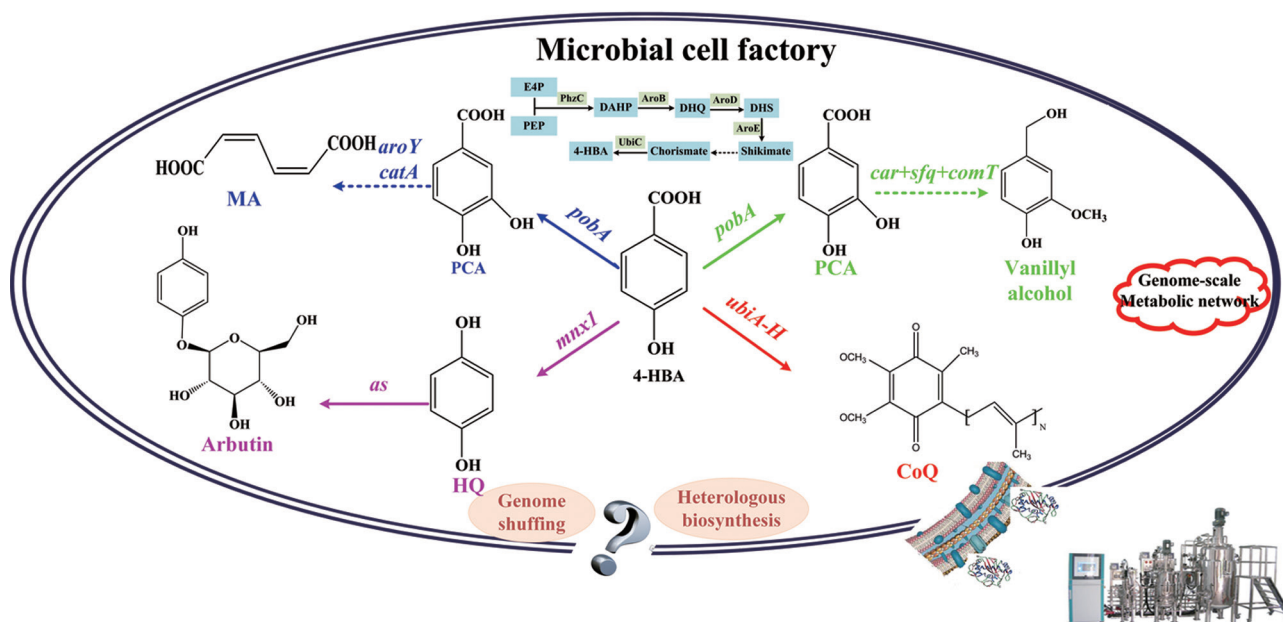


图3 以4-羟基苯甲酸为平台的细胞工厂的构建

糠酸转化途径, 过表达限速步骤来增加黏糠酸合成的前体供应, 实现无需质粒及诱导剂诱导稳定生产黏糠酸, 产量达到 3.4 g/L<sup>[11]</sup>。结合假单胞菌代谢特征, 利用内源高效启动子表达异源基因, 一方面无需抗生素的选择压力, 消除了发酵后期质粒丢失的影响; 另一方面, 黏糠酸表达基因簇整合到基因组上可以实现黏糠酸的稳定生产, 对于工业应用更加有利、环境友好且生物兼容。非质粒介导的外源基因表达策略将广泛应用到未来合成生物学平台的构建中。

### 3.2 以4-HBA为前体的熊果苷的生物合成

熊果苷是一种糖苷类化合物, 可用作烧烫伤药、肠道消炎药原料, 同时具有镇咳止痰平喘、抗氧化的作用。因其具有显著抑制酪氨酸酶活性的作用, 成为一种新兴的无刺激、无过敏的天然美白活性物质<sup>[42]</sup>。而 $\alpha$ -熊果苷的美白效果是 $\beta$ -熊果苷的10倍以上, 而且 $\alpha$ -熊果苷直接抑制酪氨酸酶活性, 不抑制人体细胞, 是一种更安全、高效的美白剂<sup>[43]</sup>。据报道, 在绿针假单胞菌中以4-HBA为前体, 引入外源酶MNX1和AS, 通过染色体整合, 将熊果苷合成基因簇整合到绿针假单胞菌基因组上, 利用高效的内源启动子 $P_{phz}$ , 实现假单胞菌中 $\alpha$ -熊果苷的高效合成。通过莽草酸途径的强化, 限速步骤4-HBA合成酶基因的过表达, 以及发酵过程中补料葡萄糖和4-HBA实现熊果苷产量的进一步提高, 达到6.79 g/L<sup>[12]</sup>。该措施将有助于利用合成生物学加强微生物次生代谢, 以环境微生物假单胞菌生产植物来源的天然产物。

### 3.3 以4-HBA为前体的辅酶Q的生物合成

辅酶Q10作为生物体有氧呼吸链中不可缺少的电子递氢体, 广泛应用于生物医药、化妆品、保健品等领域<sup>[44-45]</sup>。微生物发酵法生产辅酶Q10具有生物活性高、原料成本低等优点, 成为当前研究和开发的热点<sup>[46]</sup>。在假单胞菌中, 4-HBA作为辅酶Q合成中的醌头, 生物合成途径由9种酶组成, 包括UbiA、UbiB、UbiC、UbiD、UbiE、UbiF、UbiG、UbiH和IsqB。利用假单胞菌高效的莽草酸途径结合内源辅酶Q合成途径合成辅酶Q具有较大的前景。

## 4 基于3,4-二羟基苯甲酸为平台的生物合成

3,4-二羟基苯甲酸(PCA), 即原儿茶酸, 是一种新型芳香族化合物, 可用于合成聚合材料和生物塑料, 也可用于食品和医药行业<sup>[47]</sup>。在假单胞菌中,

高效的原儿茶酸降解途径一方面可以用于有毒污染物的降解, 同时, 假单胞菌具有较强的芳香族化合物耐受能力, 满足了原儿茶酸高产的可行性。

### 4.1 以PCA为前体的黏糠酸的生物合成

在假单胞菌中, PCA主要以DHS和4-HBA两条合成途径合成(图1)。前期大量研究报道以PCA为前体合成黏糠酸, PCA经脱羧酶AroY催化形成邻苯二酚, 利用假单胞菌中高效的邻苯二酚双加氧酶CatA催化合成黏糠酸, 在恶臭假单胞菌和绿针假单胞菌中, 都有以PCA前体合成黏糠酸的文章报道<sup>[11,48-50]</sup>。恶臭假单胞菌自调型的黏糠酸启动子调节系统(MA promoter-regulator system)已被报道, 利用 $P_{MA}$ -CatR启动子调节系统可以实现黏糠酸合成的动态实时调控, 黏糠酸浓度的升高可以进一步促进 $P_{MA}$ 的强度, 促进基因的表达, 该调节系统也可应用于其他微生物中, 如在大肠杆菌中利用 $P_{MA}$ -CatR调节系统实现1.8 g/L黏糠酸的生产<sup>[51]</sup>。在绿针假单胞菌基因组中同样存在 $P_{MA}$ -CatR系统, CatR是LysR家族的成员, LysR家族是一种DNA结合蛋白, 参与黏糠酸对苯酚和苯甲酸盐降解基因簇(*catACB*)的调节(图4)。假单胞菌中的动态实时调控系统(dynamic sensor regulator system)可以更好地应用于合成生物学研究中。

### 4.2 以PCA为前体的2-吡喃-4,6-二羧酸的生物合成

2-吡喃-4,6-二羧酸(PDC)是木质素降解过程中产生的二羧酸化合物, 因其结构和对苯二甲酸相似, 作为一种重要的平台化合物用于合成多种聚酯, 包括聚乙烯、对苯二甲酸酯等<sup>[52-53]</sup>。如图4所示, PDC可以PCA为前体合成。PCA在PCA 4,5-双加氧酶催化下产生CHMS, 然后经CHMS脱氢酶催化形成PDC, 在大肠杆菌菌中, 以PCA为前体合成PDC, 产量达到16.7 g/L<sup>[52]</sup>。在绿针假单胞菌中利用高效莽草酸途径以PCA为前体, 已建立PDC

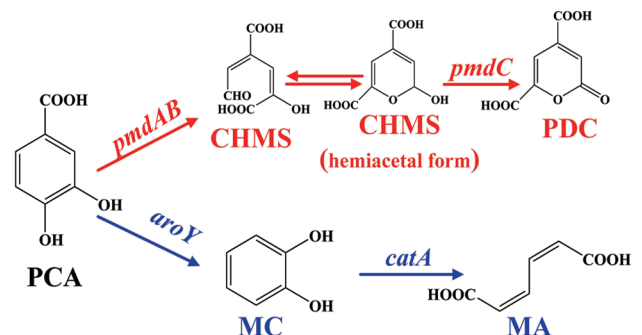


图4 以PCA为前体的MA和PDC的合成<sup>[11,52]</sup>

合成途径,产量未报道。结合假单胞菌代谢特征及较高的芳香族化合物耐受能力,可以实现PDC在假单胞菌中高效的积累。

## 5 展望

假单胞菌具有卓越的生物合成能力,可以产生广谱代谢产物,已被广泛用于开发生产各种化学品和多聚物前体。不同的羟基化合物可以衍生出多种具有重要功能的生物产品,以假单胞菌代谢产生的羟基苯甲酸作为合成生物学的平台产物具有广阔的前景。结合假单胞菌代谢特征,利用合成生物学手段在假单胞菌中异源表达和催化不同的羟基苯甲酸等羟基类化合物,合成具有较强生物活性的各种芳香族化合物。同样,我们期望持续不断开发合成生物学工具和基因组编辑策略,促进假单胞菌不同用途底盘细胞和基因工程菌株的构建,应用于合成生物学的研究,促进目标产物的高效与定向合成。

### [参 考 文 献]

- [1] Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, et al. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93: 2279-90
- [2] Retallack D, Schneider JC, Chew L, et al. *Pseudomonas fluorescens*—a robust expression platform for pharmaceutical protein production. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: S28
- [3] Bosetti A, Beilen JB, Preusting H, et al. Production of primary aliphatic alcohols with a recombinant *Pseudomonas* strain, encoding the alkane hydroxylase enzyme system. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14: 702-8
- [4] Mi J, Becher D, Lubuta P, et al. *De novo* production of the monoterpene geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 170
- [5] Ouyang SP, Luo RC, Chen SS, et al. Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 2504-11
- [6] Jin K, Zhou L, Jiang H, et al. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metab Eng*, 2015, 32: 30-8
- [7] Peng H, Tan J, Bilal M, et al. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* strains using statistical experimental designs. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34: 129
- [8] Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 1408-46
- [9] Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, et al. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002784
- [10] Kallscheuer N, Marienhagen J. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 70
- [11] Wang S, Bilal M, Zong Y, et al. Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1131-42
- [12] Wang S, Fu C, Bilal M, et al. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 174
- [13] Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in *fluorescent Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 417-45
- [14] Wang S, Bilal M, Hu H, et al. 4-Hydroxybenzoic acid—a versatile platform intermediate for value-added compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 3561-71
- [15] Guo D, Zhang L, Pan H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine. *Microbiologyopen*, 2017, 6: e00486
- [16] Wu WB, Guo XL, Zhang ML, et al. Enhancement of L-phenylalanine production in *Escherichia coli* by heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65: 476-83
- [17] Wang Y, Li Q, Zheng P, et al. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43: 1227-35
- [18] Yokota A, Sawada K, Wada M. Boosting anaerobic reactions by pyruvate kinase gene deletion and phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization for glutamic acid and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2017, 159: 181-98
- [19] Perez-Garcia F, Peters-Wendisch P, Wendisch VF. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for fast production of L-lysine and L-pipecolic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 8075-90
- [20] Chen X, Tang H, Liu Y, et al. Purification and initial characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from a halophilic *Marteella* strain AD-3. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1335
- [21] Liu TT, Zhou NY. Novel L-cysteine-dependent maleylpyruvate isomerase in the gentisate pathway of *Paenibacillus* sp. strain NyZ101. *J Bacteriol*, 2012, 194: 3987-94
- [22] Noda S, Shirai T, Mori Y, et al. Engineering a synthetic pathway for maleate in *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2017, 8: 1153
- [23] Noda S, Shirai T, Oyama S, et al. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives. *Metab Eng*, 2016, 33: 119-29
- [24] Izmalkova TY, Sazonova OI, Nagornih MO, et al. The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain AK5. *Res Microbiol*, 2013, 164: 244-53



- [25] Liu K, Liu TT, Zhou NY. HbzF catalyzes direct hydrolysis of maleylpyruvate in the gentisate pathway of *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 1044-7
- [26] Singh R, Trivedi VD, Phale PS. Metabolic regulation and chromosomal localization of carbaryl degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strains C4, C5 and C6. *Arch Microbiol*, 2013, 195: 521-35
- [27] Iyer R, Iken B, Damania A. Genome of *Pseudomonas nitroreducens* DF05 from dioxin contaminated sediment downstream of the San Jacinto River waste pits reveals a broad array of aromatic degradation gene determinants. *Genom Data*, 2017, 14: 40-3
- [28] Kang Q, Shen Y, Bai L. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat Prod Rep*, 2012, 29: 243-63
- [29] Li QA, Mavrodi DV, Thomashow LS, et al. Ligand binding induces an ammonia channel in 2-amino-2-desoxyisochorismate (ADIC) synthase PhzE. *J Biol Chem*, 2011, 286: 18213-21
- [30] Andexer JN, Kendrew SG, Nur-e-Alam M, et al. Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 4776-81
- [31] Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2009, 47: 177-206
- [32] Lee JH, Wendisch VF. Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass. *J Biotechnol*, 2017, 257: 211-21
- [33] Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J Bacteriol*, 2001, 183: 700-8
- [34] Zhang Y, Zhao L, Zhao J, et al. S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiol*, 2017, 175: 1082-93
- [35] He BB, Bu XL, Zhou T, et al. Combinatory biosynthesis of prenylated 4-hydroxybenzoate derivatives by overexpression of the substrate-promiscuous prenyltransferase XimB in engineered *E. coli*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 2094-104
- [36] Chen Z, Shen X, Wang J, et al. Establishing an artificial pathway for *de novo* biosynthesis of vanillyl alcohol in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 1784-92
- [37] Deng Y, Ma L, Mao Y. Biological production of adipic acid from renewable substrates: current and future methods. *Biochem Eng J*, 2016, 105: 16-26
- [38] Niu W, Draths KM, Frost JW. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol Prog*, 2002, 18: 201-11
- [39] Jimenez JI, Minambres B, Garcia JL, et al. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, 2002, 4: 824-41
- [40] van Duuren JB, Wijte D, Leprince A, et al. Generation of a *catR* deficient mutant of *P. putida* KT2440 that produces *cis, cis*-muconate from benzoate at high rate and yield. *J Biotechnol*, 2011, 156: 163-72
- [41] Chua JW, Hsieh JH. Oxidative bioconversion of toluene to 1,3-butadiene-1,4-dicarboxylic acid (*cis, cis*-muconic acid). *World J Microbiol Biotechnol*, 1990, 6: 127-43
- [42] Shen X, Wang J, Wang J, et al. High-level *de novo* biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 42: 52-58
- [43] Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, et al. Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59: 143-4
- [44] Mancuso M, Orsucci D, Volpi L, et al. Coenzyme Q10 in neuromuscular and neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets*, 2010, 11: 111-21
- [45] Sharma A, Fonarow GC, Butler J, et al. Coenzyme Q10 and heart failure: a state-of-the-art review. *Circ Heart Fail*, 2016, 9: e002639
- [46] Zhu Y, Ye L, Chen Z, et al. Synergic regulation of redox potential and oxygen uptake to enhance production of coenzyme Q10 in *Rhodobacter sphaeroides*. *Enzyme Microbial Technol*, 2017, 101: 36-43
- [47] Okai N, Miyoshi T, Takeshima Y, et al. Production of protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing chorismate-pyruvate lyase from *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 135-45
- [48] Weber C, Brückner C, Weinreb S, et al. Biosynthesis of *cis, cis*-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 8421-30
- [49] Thompson B, Pugh S, Machas M, et al. Muconic acid production via alternative pathways and a synthetic 'metabolic funnel'. *ACS Synth Biol*, 2017, 7: 565-75
- [50] Zhang H, Pereira B, Li Z, et al. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 8266-71
- [51] Yang Y, Lin Y, Wang J, et al. Sensor-regulator and RNAi based bifunctional dynamic control network for engineered microbial synthesis. *Nat Commun*, 2018, 9: 3043
- [52] Luo ZW, Kim WJ, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid from glucose. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 2296-307
- [53] Nakajima M, Nishino Y, Tamura M, et al. Microbial conversion of glucose to a novel chemical building block, 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid. *Metab Eng*, 2009, 11: 213-20