

Anniliina Kalela

FLAVONOIDIEN TUOTTAMINEN MIKRO- ORGANISMEILLA

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Tarkastaja: Ville Santala
Toukokuu 2023

TIIVISTELMÄ

Anniliina Kalela: Flavonoidien tuottaminen mikro-organismeilla

The production of flavonoids by microorganisms

Kandidaatintyö

Tampereen yliopisto

Tekniikan ja luonnontieteiden TkK-tutkinto-ohjelma, ympäristö- ja biotekniikka

Toukokuu 2023

Maailman terveysjärjestö (WHO) on arvioinut, että yli 65-vuotiaan väestön määrä kaksinkertaistuu maailmassa vuoteen 2030 mennessä. Sen myötä ikääntymisestä sekä kroonisista neurologisista sairauksista tulee merkittävä taakka terveydenhuollolle, minkä vuoksi ennaltaehkäisevien ravintoaineiden sekä lääkkeiden kehittäminen on tärkeää. Tämän lisäksi myös väestön alati kasvava kiinnostus terveellisiä elintapoja kohtaan kasvattaa muun muassa antioksidanttien määrän lisäämistä ruokavalioon. Flavonoidit ovat luonnollisesti kasveissa esiintyviä yhdisteitä, joilla on useiden tutkimusten mukaan todettu olevan runsaasti myönteisiä terveysvaikutuksia, mikä perustuu muun muassa niiden antioksidanttiseen, anti-inflammatoriseen ja antimutageeniseen toimintakykyyn. Kiinnostus niiden käyttöön sairauksien ehkäisyssä ja hoidossa on kasvanut runsaasti viime vuosina.

Flavonoidien perinteisten tuotantomenetelmien avulla ei pystytä vastaamaan kasvaneeseen kysyntään, minkä vuoksi kehitteillä on uusia tekniikoita, joiden avulla tulevaisuudessa voidaan mahdollisesti tuottaa flavonoideja entistä kestävämmällä, taloudellisemmalla ja turvallisemmalla tavalla. Nämä uudet menetelmät perustuvat muun muassa mikro-organismien käyttöön flavonoidien tuotannossa. Tämän työn tavoitteena on selvittää kirjallisuuteen perehtymällä, miten flavonoideja pystytään syntetisoimaan mikro-organismeissa eri aineenvaihdunnan muokkauksen tekniikoilla, miten tuotannosta saataisiin teollisesti kilpailukykyistä sekä kartoittaa flavonoidien tuotannon tulevaisuudennäkymiä.

Mikro-organismien käyttö biotuotteiden syntetisoinnissa on kontrolloitua sekä ulkoisista olosuhteista, kuten paikasta tai ajasta riippumatonta. Lisäksi niiden käytöllä pyritään vähentämään riippuvuutta uusiutumattomista luonnonvaroista muuttamalla petrokemialliset prosessit ympäristöystävällisiksi. Mikro-organismien käyttö perustuu niiden aineenvaihdunnan muokkauksen tekniikoihin. Kiinnostusta aineenvaihdunnan muokkausta kohtaan on herättänyt erityisesti kaupalliset sovellukset, missä kantoja kehittämällä on saatu lisättyä hyödyllisten metaboliittien tuotantoa. Synteettisen biologian tekniikat ovat mullistaneet aineenvaihdunnan muokkausta mahdollistaen biopohjaisen tuotannon perustamisen lukuisissa muokatuissa mikrobeissa. Viime vuosina on onnistuttu rakentamaan yhä useampia ja kehittyneempiä mikrobisolutehtaita syntetisoimaan flavonoideja esimerkiksi niiden suorista esiasteista tai uusiutuvista hiililähteistä.

Vielä flavonoidien tuottaminen mikro-organismeissa ei ole kuitenkaan saavuttanut teollista mitakaavaa, mutta tämä monitieteellinen ala kehittyy nopeasti systeemibiologian, synteettisen biologian sekä evolutiivisten tekniikoiden kehittymisen myötä. Metaboliamuokkauksen tekniikat ovat osoittaneet, että tulevaisuudessa mikro-organismien avulla pystytään vastaamaan flavonoidien kasvaneeseen kysyntään, sillä prosesseja on mahdollista tehostaa alkuperäisestä kannansuunnittelusta aina teolliseen tuotantoon asti.

Avainsanat: flavonoidit, biosynteesi, synteettinen biologia, aineenvaihdunnan muokkaus, mikro-organismi

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO.....	1
2.	FLAVONOIDIEN RAKENNE JA OMINAISUUDET	3
2.1	Flavonoidien perinteiset tuotantomenetelmät	4
2.2	Flavonoidien käyttökohteet	6
3.	FLAVONOIDIEN BIOSYNTeesi.....	10
3.1	Kasvien solu- ja kudosisviljelmät <i>in vitro</i>	10
3.2	Mikrobisolutehtaat.....	12
3.3	Flavonoidien biosynteesireitti kasveissa ja tärkeimmät entsyymit.....	13
3.4	Mikro-organismien aineenvaihdunnan muokkaus	16
4.	FLAVONOIDIEN TUOTANNON TULEVAISUUS	21
5.	JOHTOPÄÄTÖKSET	24
	LÄHTEET	26

1. JOHDANTO

Flavonoidit ovat luonnollisesti kasveissa esiintyviä yhdisteitä, joilla on vaihteleva fenolirakenne. Useimpia kukkia, hedelmiä sekä siemeniä värjäävät pigmentit ovat flavonoideja. Niitä on tunnistettu yli 6000 kappaletta (Falcone Ferreyra et al., 2012). Flavonoidiyhdisteet ovat kasveista uutettuja tuotteita, ja niitä löytyy lähes kaikista kasvien osista. Flavonoideilla on runsaasti tärkeitä biologisia ja fysiologisia tehtäviä kasveissa. Ne ovat vastuussa väripigmenttien lisäksi muun muassa aromeista sekä pölyttäjien houkuttelemisesta, ja lisäksi ne suojaavat kasveja UV-valolta sekä kasvipatogeeneilta. (Panche et al., 2016) Flavonoidit ovat osa ihmisten ruokavaliota, ja niitä löytyy lähes kaikista kasvipärisistä elintarvikkeista, kuten hedelmistä, vihanneksista, marjoista, teestä sekä viinistä.

Flavonoideja pidetään tärkeinä komponentteina erilaisissa farmaseuttisissa, lääketieteellisissä, kosmeettisissa sekä ravitsemukseen liittyvissä sovelluksissa. Tärkeät ominaisuudet liittyvät esimerkiksi niiden antioksidanttiseen, anti-inflammatoriseen sekä antimutageeniseen toimintakykyyn. (Panche et al. 2016) Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että hedelmien, vihannesten ja lääkekasvien terapeuttinen potentiaali perustuu erilaisten bioaktiivisten luonnontuotteiden, kuten flavonoidien esiintymiseen niissä (Tariq et al., 2023). Täten flavonoidien myönteisistä terveysvaikutuksista, sekä niiden käytöstä sairauksien ehkäisyssä ja hoidossa on tullut tärkeä tekijä, minkä vuoksi kiinnostus niiden biosynteesiin ja vaihtoehtoihin tuotantotapoihin on kasvanut merkittävästi viime vuosina (Falcone Ferreyra et al., 2012).

Flavonoidit ovat siis tärkeitä ihmisten terveydelle, ja niillä on todettu olevan runsaasti myönteisiä terveysvaikutuksia. Flavonoidit auttavat esimerkiksi ehkäisemään kroonisia sairauksia, kuten sydän- ja verisuonitauteja sekä syöpää (Shah et al., 2019). Maailman terveysjärjestö (WHO) on arvioinut, että yli 65-vuotias väestö kaksinkertaistuu maailmassa vuoteen 2030 mennessä ja ikääntymisestä tai neurologisista kroonisista sairauksista, kuten Alzheimerin tai Parkinsonin taudeista, voi tulla merkittävä taakka terveydenhuollolle. Sen takia ennaltaehkäisevien ravintoaineiden ja lääkkeiden kehittäminen on tärkeää. (Xu et al., 2020)

Luonnossa flavonoidit syntetisoituvat kasveissa, ja niitä on perinteisesti otettu talteen eristämällä. Lisäksi flavonoideja pystytään tuottamaan kemiallisella synteesillä. (Zha et

al., 2019) Näillä perinteisillä menetelmillä on kuitenkin merkittäviä tuottoa rajoittavia ongelmia, ja siksi on pyritty kehittämään uusia menetelmiä, joiden avulla flavonoideja pystytään syntetisoimaan kestävämmällä, taloudellisemmalla sekä turvallisemmalla tavalla. Uusien menetelmien avulla pyritään parantamaan flavonoidien tuotannon tuottopeutta, laatua sekä kestävyyttä. Uusilla tekniikoilla saattaa olla myös mahdollisuuksia tuottaa harvinaisia tai jopa uusia flavonoidiyhdisteitä, mikä ei ole mahdollista nykyisillä menetelmillä. Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet mikro-organismien, kuten sienien ja bakteerien kyvyn syntetisoida flavonoideja entistä tuottavammin. Flavonoidiyhdisteiden eristäminen kasveista ei enää tyydytä kysyntää, minkä vuoksi mikro-organismien käyttö mikrobisolutehtaina on mielenkiintoinen vaihtoehto tuottaa flavonoideja entistä nopeammin ja halvemmalla.

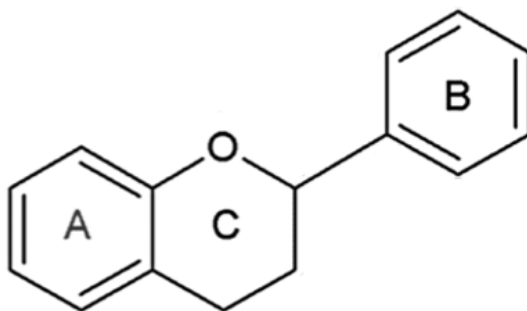
Tämän työn tavoitteena on siis perehtyä erilaisiin tapoihin tuottaa flavonoideja biotekniikan avulla, sekä selvittää miksi ja miten uusia tapoja kehitetään. Työssä syvennytään erityisesti kasvien solu- ja kudosiseläisiin, mikrobisolutehtaisiin sekä mikro-organismien aineenvaihdunnan muokkaukseen. Työ on toteutettu kirjallisuusselvityksenä ja lisäksi sen tavoitteena on vastata seuraaviin tutkimuskysymyksiin: Mitkä ovat flavonoidien luonnolliset tuotantotavat ja miksi halutaan löytää uusia menetelmiä? Mitä erilaisia menetelmiä flavonoidien tuottamiselle mikro-organismien avulla on? Miten flavonoidien tuotannosta mikro-organismien avulla saataisiin teollisesti kannattavaa? Miltä flavonoidien tuotannon tulevaisuus näyttää ja mitä mahdollisuuksia ne saattavat tarjota tulevaisuudessa?

Teorialuvussa 2 esitellään flavonoidit yleisesti niiden rakenteen ja ominaisuuksien perusteella. Lisäksi esitellään flavonoidien perinteiset synteesisimenetelmät, flavonoidien käyttökohteita sekä vaikutuksia ihmisten terveydelle. Luvussa 3 perehdytään flavonoidien tuottamiseen mikro-organismeilla sekä syvennytään flavonoidien biosynteesireittiin kasveissa ja tärkeimpiin aineenvaihduntareittien entsyymeihin. Luvussa 4 kartoitetaan flavonoidien tuotannon tulevaisuuden näkymiä ja pohditaan, mitä teollisesta tuotannosta saataisiin kilpailukykyistä ja mitä ongelmia on vielä ratkaistavana.

2. FLAVONOIDIEN RAKENNE JA OMINAISUUDET

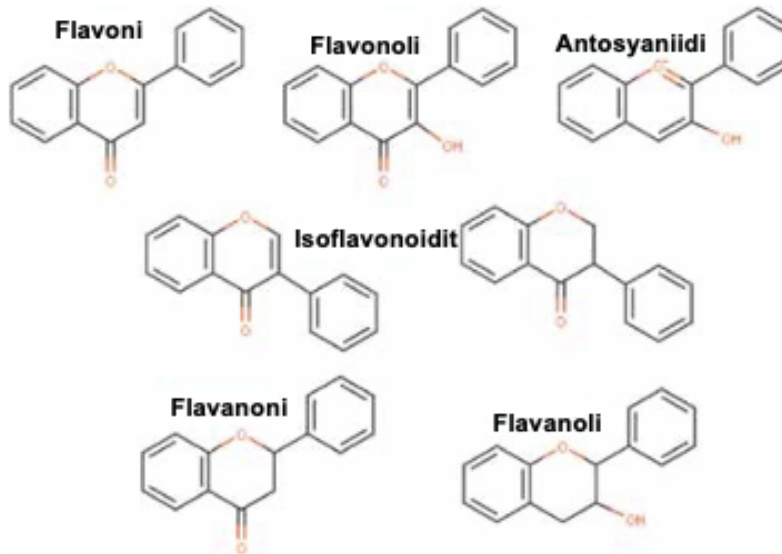
Flavonoidit ovat kasvipäisiä orgaanisia yhdisteitä, joilla on vaihteleva fenolirakenne. Ne ovat kasvien toissijaisia metaboliitteja eli aineenvaihduntatuotteita, jotka eivät ole välttämättömiä kasvien selviytymiselle, mutta ne tekevät kasveista kilpailukykyisiä omassa elinympäristössään. (Teoh, 2016) Flavonoidit ovat vesiliukoisia kasvipigmenttejä, ja niiden tuotanto kasveissa on hyvin säänneltyä ja kudosspesifistä (Shah et al., 2019). Luonnossa flavonoideja on löydettävissä kaikista kasvien osista sekä kasvipäisistä elintarvikkeista ja juomista, kuten hedelmistä, vihanneksista, teestä, kaakaosta ja viinistä, joten ne ovat osa ihmisten ruokavaliota. Flavonoidien päivittäinen saanti vaihtelee 50–800 mg välillä (Rodríguez De Luna et al., 2020). Kasveissa flavonoidit ovat vastuussa kukkien väristä sekä aromeista. Lisäksi ne tunnetaan myönteisistä terveysvaikutuksistaan, minkä vuoksi niitä pyritään eristämään. (Panche et al., 2016) Tällä hetkellä flavonoideja on tunnistettu yli 6000 kappaletta (Falcone Ferreyra et al., 2012), mutta niitä arvioidaan olevan vielä runsaasti tätä enemmän.

Flavonoidien ydinrunko koostuu yleensä 15 hiiliatomista, ja niissä kaikissa on tunnistettavissa C6-C3-C6-hiilirunko. Perusrakenteen voidaan ajatella koostuvan kolmesta renkaasta A, B, ja C (kuva 1). (Badria & Ananga, 2020)



Kuva 1. Flavonoidien perusrunko koostuu 15 hiiliatomista, jotka muodostavat C6-C3-C6-hiilirungon. Muokattu kohteesta (Panche et al., 2016).

Flavonoidit luokitellaan siis aromaattisiksi yhdisteiksi, sillä niiden kemiallinen rakenne sisältää syklisiä hiilirenkaita (Teoh, 2016). C-renkaan rakenteellisten ominaisuuksien perusteella flavonoidit voidaan jakaa kuuteen luokkaan. Nämä luokat ovat flavonit, flavonolit, flavanolit, flavanonit, isoflavonoidit sekä antosyaniidit (kuva 2) (Badria & Ananga, 2020).



Kuva 2. Flavonoidit on jaettavissa kuuteen alaryhmään C-renkaan rakenteellisten ominaisuuksien perusteella. Muokattu kohteesta (Badria & Ananga, 2020, s. 38).

Erot flavonoidiluokkien rakenteiden välillä tulevat hapettumistasosta sekä C-renkaan substituuksiosta. Samaan luokkaan kuuluvien flavonoidien erot puolestaan ovat A- ja B-renkaiden substituuksiosta. (Badria & Ananga, 2020) Flavonoidien rakenteellinen monimuotoisuus johtuu erilaisista modifikaatioreaktioista. Flavonoideja voidaan modifioida erilaisilla entsyymeillä, kuten hydroksylaaseilla, glykosyyli transferaaseilla ja metyyli transferaaseilla tuottamaan erilaisia flavonoideja, joilla on vaihtelevia rakenteita ja ominaisuuksia. (Zha et al., 2019)

2.1 Flavonoidien perinteiset tuotantomenetelmät

Sekundaariset metaboliitit syntyvät primaarisen aineenvaihdunnan seurauksena. Synteesi riippuu bioottisista ja abioottisista tekijöistä, kuten kasvusta, lämpötilasta, kosteudesta sekä valon määrästä. (Chandran et al., 2020) Flavonoidit syntetisoituvat luonnollisesti kasveissa, ja niitä on perinteisesti otettu talteen eristämällä kasveista. Flavonoidien pitoisuus esimerkiksi eri hedelmissä on 30–4000 mg/kg kuivapainosta. Tämä tarkoittaa, että yhden flavonoidikilon tuottamiseksi on käsiteltävä 0,25–33 tonnia hedelmiä tai vihanneksia (kuivapaino). (Rodriguez et al., 2017) Flavonoidien luonnollinen biosynteesi kasveissa on esitelty tarkemmin kappaleessa 3.3.

Kasveista eristämällä on kuitenkin ollut merkityksellisiä rajoituksia, kuten riippuvuus viljelysmaasta sekä ilmastosta, tarjonnan kausittaiset ja alueelliset vaihtelut sekä flavonoidipitoisuuden vaihtelut eri lähteiden mukaan. (Zha et al., 2019) Laajamittaista tuotantoa rajoittavat alhaiset pitoisuudet, eristämisen aikana tapahtuneet pitoisuuksien menetykset

sekä loppuvaiheen monimutkaiset puhdistusmenettelyt. Kasveissa luonnollisella tavalla syntetisoituneet flavonoidipitoisuudet ovat lisäksi suhteellisen alhaiset, mikä rajoittaa niiden laajamittaista tuotantoa. (Tariq et al., 2023)

Flavonoidien eristämiseen kasveista on useita menetelmiä, ja suurin osa flavonoidien biologisista ominaisuuksista määräytyykin vahvasti sen mukaan, miten ne on otettu talteen. Erityisesti viime vuosina väestön kasvanut kiinnostus terveellisiä elintapoja kohtaan sekä antioksidanttien sisällyttämiseen ruokavalioon on kasvattanut myös flavonoidien kysyntää ja täten niiden talteenottoa. On otettu käyttöön useita flavonoidien eristämiseen tarkoitettuja menetelmiä, joilla on pyritty lisäämään yhdisteiden saantoa. Esimerkkejä tällaisista menetelmistä ovat maserointi, perkolaatio, hydrodistillointi, liotus ja soxhlet. (Chávez-González et al., 2020)

Soxhlet-menetelmä on ollut yleisimmin käytetty menetelmä flavonoidien eristämiseen, sillä sen onnistumisaste on korkea (Dianursanti et al., 2020), ja lisäksi sen yksinkertaisuuden, helppouden, alhaisen kustannustason ja liuotuspitoisuuden vuoksi. Liuottimina on testattu käytettävän esimerkiksi etanolia, metanolia, bentseeniä sekä kloroformia. Yleisesti neste-neste- tai kiinteä-nesteuutto ovat olleet laajimmin flavonoidien eristämiseen käytetyt menetelmät. (Chávez-González et al., 2020) Taulukossa 1 on esitetty eri liuottimilla saatuja flavonoidien uuttotuloksia soxhlet-menetelmällä. Uuttotuloksen lisäksi taulukossa on eritelty esimerkin vuoksi muutamien eri flavonoidien pitoisuuksia.

Taulukko 1. Esimerkkejä soxhlet-menetelmällä saatuja flavonoidien pitoisuuksia eri liuottimilla. Tulos kertoo eristettyjen flavonoidien kokonaispitoisuuden.

Liutotin	Tulos (mg/g)	Katekiini, flavanoli (mg/g)	Luteoliini, flavoni (mg/g)	Apigeniini, flavoni (mg/g)	Naringeniini, flavanoni (mg/g)
Metanoli	267	0,144	0,093	0,392	0,054
Etanoli (99,5 %)	218	0,081	0,154	0,246	-
Etanoli (70 %)	258	0,117	0,146	0,305	-
Petrolieetteri	30,3	-	-	-	-

Muokattu lähteestä (Bimkr et al., 2011)

Suurin uuttotulos (267 mg/g) saatiin siis käyttämällä metanolia liuottimena ja pienin uuttotulos (30,4 mg/g) käyttämällä petrolieetteriä. Tämä viittaa siihen, että polaarinen liutotin toimii soxhlet-menetelmässä paremmin. (Bimkr et al., 2011)

Monet flavonoideja sisältävät kasvit toimivat ravinnon lähteenä. Täten niiden laaja käyttö flavonoidien tuotannossa voi johtaa elintarvikkeiden ehtymiseen. (Tariq et al., 2023) Monien kasvien luonnolliset elinympäristöt tuhoutuvat nopeastikin, mikä johtaa pahimmassa tapauksessa arvokkaiden kasvien sukupuuttoon (Filová, 2014). Esimerkiksi luonnonvarojen ylikulutus, haitalliset vieraslajit sekä ilmastonmuutos aiheuttavat kasvien elinympäristöjen monimuotoisuuden köyhtymistä.

Toinen perinteinen tapa tuottaa flavonoideja on kemiallinen synteesi. Se kuitenkin vaatii usein kemiallisesti ympäristölle vaarallisten katalyyttien käyttöä sekä sen käyttö rajoittuu flavonoideihin, joilla on yksinkertainen kemiallinen rakenne. (Zha et al., 2019) Monimutkaisempien flavonoidirakenteiden kemiallinen synteesi vaatisi kalliita ja aikaa vieviä menetelmiä, korkeita lämpötiloja sekä orgaanisten liuottimien käyttöä. (Tariq et al., 2023). Näiden perinteisesti miellettyjen menetelmien rinnalle on pyritty kehittämään uusia menetelmiä, joiden avulla flavonoideja pystytään syntetisoimaan kestävämmällä, taloudellisemmalla sekä turvallisemmalla tavalla.

2.2 Flavonoidien käyttökohteet

Flavonoidit ovat erittäin tärkeitä yhdisteitä kasvien fysiologisen toiminnan, kasvun, lisääntymisen ja selviytymisen kannalta. Vaikka flavonoidit usein määräävät kasveissa kukkien ja hedelmien värin, niitä löytyy lähes kaikista kasvien osista. Hedelmissä flavonoidit houkuttelevat pölyttäjiä, ja näin ne edesauttavat siementen ja itiöiden leviämistä sekä itämistä ja edelleen edistävät taimien kasvua ja kehitystä. Flavonoidit suojaavat kasveja biottiliselta sekä abioottiselta rasitukselta sekä toimivat ainutlaatuisena UV-säteilyn suodattimena. Flavonoideilla on lisäksi tärkeä rooli kasvien pakkasen ja kuivuuden kestokyvyssä, sekä ne toimivat myrkkyyä poistavina sekä antimikrobisina puolustavina yhdisteinä. (Panche et al., 2016)

Flavonoideilla on katsottu olevan myönteisiä vaikutuksia ihmisten ja eläinten terveyteen, ja kiinnostus kohdistuu erityisesti sairauksien hoitoon. Niillä on laaja kirjo terveyttä edistäviä vaikutuksia, ja ne ovat välttämätön komponentti erilaisissa farmaseuttisissa, lääketieteellisissä, kosmeettisissa ja ravitsemukseen liittyvissä komponenteissa. Flavonoidien myönteiset terveysvaikutukset johtuvat flavonoidien antioksidanttisista, anti-inflammatorisista sekä antimutageenisista ominaisuuksista yhdistettynä niiden kykyyn moduloida solun entsyymitoimintoja. (Panche et al., 2016) Flavonoideja pidetään myös taloudellisesti tärkeinä tuotteina, sillä niitä käytetään muun muassa lääkkeissä, aromeissa, hyönteismyrkyissä ja väriaineissa (Chandran et al., 2020). Taulukossa 2 on esitetty flavonoi-

dien kuusi alaryhmää sekä niiden tärkeimpiä vaikutuksia ihmisten terveyteen ja hyvinvointiin. Kaikkia kuutta flavonoidityyppiä on mahdollista saada monipuolisesta ruokavaliosta. Taulukossa on lisäksi eritelty yleisimmät flavonoidityyppien lähteet ravinnosta.

Taulukko 2. Flavonoidien alaryhmien vertailu

Nimi	Esimerkki	Lähde ravinnossa	Edut terveydelle
Flavonit	Luteoliini, apigeniini ²	Selleri, persilja, punainen paprika, kamomilla, minttu ¹	Anti-inflammatorisia, antikarsinogeenisia ja antioksidanttisia ominaisuuksia ²
Flavonolit	Kaempferoli, kversetiini, myrisetiini ²	Sipulit, lehtikaali, salaatti, tomaatti, omenat, viinirypäleet, marjat, tee, punaviini ¹	Antioksidanttiset ominaisuudet, sydän- ja verisuonitautien riskin pieneminen ²
Antosyaniidit	Syanidiini, pelargonidiini, delfinidiini, malvidiini ¹	Tee, hunaja, hedelmät, vihannekset, pähkinät, oliiviöljy, kaakao, marjat, mehut, punaviini ²	Sydän- ja verisuonitautien riskin pieneminen, kolesterolin hajoitus, näöntarkkuuden parannus, antioksidanttiset ominaisuudet ²
Isoflavonoidit	Genisteiini, daidzeiini ²	Palkokasvit, erityisesti soijapavut ¹	Syövän ehkäisy, vaihdevuosiin liittyvien häiriöiden ehkäisy, sydän- ja verisuonitautien riskien ehkäisy, antioksidanttiset vaikutukset ²
Flavanonit	Hesperetiini, naringeniini ²	Sitruhedelmät, kuten appelsiinit, greippi, sitruunat, viinirypäleet ¹	Vapaiden radikaalien poisto, antioksidanttisia, anti-inflammatorisia ominaisuuksia, sydän- ja verisuonitautien ehkäisy: veren rasva-arvojen sekä kolesterolin alentaminen ¹ , syövän ehkäisy, DNA-vaurioilta suojaaminen (UV-valon absorbointi) ²
Flavanolit (flavan-3-olit)	Katekiini	Banaani, omena, mustikka, persikka, pöyrnä ¹ , tee, punaviini, kaakao, kiivi, viljat ²	Pystyvät kumoamaan osan tupakkointiin liittyvästä verisuonten toiminnan heikkenemisestä (typpioksidipitoisuuden stimulointi veressä), proteiinien hapettumisen estäminen (vapaiden radikaalien poisto), syövän ehkäisy, antibiootivaikutteisuus ²

¹Panche et al. (2016); ²Brodowska (2017)

Epidemiologiset tutkimukset ovat osoittaneet käänteisen suhteen ravinnosta saatavien flavonoidien sekä sydän- ja verisuonisairauksien ja joidenkin syöpien esiintyvyyden ja riskin välillä. Niiden lisäksi on korostettu flavonoidien käytön edistysaskeleita keskushermostoon, liikalihavuuteen, diabetekseen, tulehduksiin, ruoansulatusjärjestelmään sekä hengityselimiin liittyvissä sairauksissa. (Badria & Ananga, 2020)

Flavonoidit suojaavat ihmiskehoa hapettavilta aineilta, kuten UV-säteilyltä, ympäristön saasteilta sekä elintarvikekemikaaleilta ja niiden aiheuttamilta vaurioilta (Chávez-González et al., 2020). Lähes jokaisen flavonoidien luokan kykyyn toimia antioksidanteina on kiinnitetty suurta mielenkiintoa. Vapaiden happiradikaalien poistaminen on yksi flavonoidien tärkeimmistä tehtävistä (Li et al., 2022). Kehon soluja ja kudoksia uhkaa jatkuvasti vapaiden radikaalien ja reaktiivisten happilajien aiheuttamat vauriot, joita syntyy normaalin happiaineenvaihdunnan aikana tai jotka aiheutuvat ulkoisista vaurioista (Panche et al., 2016). Flavonoidien kemiallinen rakenne sisältää vaihtelevan määrän fenolisia hydroksyyliiryhmiä, mikä aiheuttaa flavonoidien korkean kapasiteetin toimia antioksidanteina (Chávez-González et al., 2020). Ne osallistuvat kehon mekanismiin suoja-ten sitä näitä reaktiivisia happilajeja vastaan. Flavonoidien fenolinen hydroksyyliiryhmä voi yhdistyä vapaiden radikaalien kanssa toimien antioksidanteina ja täten estää niiden aiheuttamia oksidatiivisia vaurioita (Li et al., 2022).

Flavonoideilla on lisäksi useita muita suojaavia tehtäviä ihmiskehossa. Monet flavonoidit ovat kehittyneet bioaktiivisiksi yhdisteiksi, joilla on antimikrobisia ja farmakologisia ominaisuuksia, ja ne voivat vaikuttaa esimerkiksi geenien ilmenemiseen tai proteiinien toimintaan. (Panche et al., 2016) Flavonoidit kykenevät vaikuttamaan kasvaimiin estämällä solujen lisääntymistä, indusoimalla kasvainsolujen apoptoosia eli hallittua solukuolemaa sekä estämällä syöpägeenien ilmentymistä. Kasveista eristettyjä flavonoideja on käytetty kliinisissä kasvainten hoidoissa parantamaan kemoterapeuttisten aineiden tehokkuutta ja vähentämään niiden myrkyllisiä sivuvaikutuksia. (Li et al., 2022) Flavonoidien antiviraalisten ja antibakteeristen ominaisuuksien vuoksi niitä käytetään laajasti ravitsemuksen, elintarvikeeturvallisuuden ja terveyden alalla.

3. FLAVONOIDIEN BIOSYNTESI

Evoluution aikana kehittynyt kasvien laaja biologinen monimuotoisuus on synnyttänyt valikoiman flavonoidirakenteita. Flavonoideihin liittyvät tutkimukset edistävät niin kasvi-, elintarvike-, lääke- kuin kemianteollisuutta, joten niiden tunnistamisella ja tuntemisella on tärkeä merkitys. Flavonoidien myönteisistä terveysvaikutuksista, sekä niiden käytöstä sairauksien ehkäisyssä ja hoidossa on tullut merkittävä tekijä, minkä vuoksi kiinnostus niiden biosynteesiin ja vaihtoehtoihin tuotantotapoihin on kasvanut merkittävästi. (Falcone Ferreyra et al., 2012)

Uusia menetelmiä flavonoidien tuotantoon halutaan kehittää, jotta voitaisiin mahdollistaa flavonoidien tehokas ja edullinen tuotanto. Täten voitaisiin parantaa flavonoidien tuotannon tuottonopeutta, laatua sekä kestävyttä. Uudet tekniikat voisivat tarjota myös mahdollisuuksia tuottaa harvinaisia tai jopa uusia flavonoideja, joita ei ole saatavilla nykyisillä menetelmillä. Uudet menetelmät vähentävät myös riippuvuutta perinteisistä lähteistä. Tässä kappaleessa käydään läpi eri tekniikoita, joilla flavonoideja voidaan tuottaa soluviljelmien avulla. Lisäksi esitellään flavonoidien luonnollinen biosynteesireitti kasveissa sekä aineenvaihdunnan muokkauksen tekniikoita, joilla flavonoidien biosynteesiä mikroorganismeissa saadaan toteutettua ja tehostettua.

3.1 Kasvien solu- ja kudosisviljelmät *in vitro*

Kasveja pidetään ihmisille turvallisina ja niitä onkin käytetty lääkeaineina sekä sairauksien hoidossa jo muinaisista ajoista lähtien. Kasvit ovat arvokkaita lääkeaineiden lähteitä ja niillä on erittäin keskeinen rooli maailmanlaajuisten terveysongelmien lieventämisessä. (Fazili et al., 2022) Flavonoidit ovat esimerkki kasvien toissijaisista metaboliiteista, joilla on tärkeitä tehtäviä signaalintimokkeina sekä puolustusaineina (Chandran et al., 2020).

Monet kasvit syntetisoivat suuren määrän sekundaarisia metaboliitteja, eli orgaanisia yhdisteitä, jotka eivät suoraan osallistu kasvin kasvuun ja kehitykseen, mutta niillä on merkittävä rooli kasvien selviytymisen ja lisääntymisen kannalta. Lääkekasvien saatavuus ovat vaarantumassa, sillä lääketeollisuus on erittäin riippuvainen niistä. Lisäksi lääkekasveista saatavia yhdisteitä on haastavaa syntetisoida kemiallisesti, minkä vuoksi *in vitro*-menetelmillä pyritään saavuttamaan kestäviä tapoja vastata markkinoiden kysyntään. (Fazili et al., 2022)

Bioteknologia tarjoaa mahdollisuuksia hyödyntää soluja, kudoksia, elimiä tai kokonaisia organismeja kasvattamalla niitä *in vitro* eli kontrolloiduissa aseptisissä olosuhteissa laboratoriossa (Phillips & Garda, 2019), sekä manipuloimalla niitä geneettisesti haluttujen yhdisteiden saamiseksi. Kasvien solu- ja kudosisviljelmiä (engl. plant tissue culture) pidetään erittäin potentiaalisina tekniikoina sekundaaristen metaboliittien, mukaan lukien flavonoidien tuotannossa (Filová, 2014). Näitä kasvien kudosisviljelmiä on mittavien etujensa vuoksi käytetty pääasiallisena alustana sekundaaristen metaboliittien tuotannossa (Chandran et al., 2020). Menetelmä on omavarainen eikä riipu maantieteellisistä tekijöistä tai vuodenaikojen aiheuttamasta vaihtelusta (Fazili et al., 2022). Lisäksi yhdisteet tuotetaan tarkkaan valvotuissa olosuhteissa markkinoiden vaatimusten mukaisesti (Ponmurugan & Kumar, 2011).

Kasvien kudosisviljelmillä tarkoitetaan kasvien solujen, kudosten ja elinten kasvattamista ja lisääntymistä aseptisessä ja valvotussa ympäristössä. Niitä käytetään laajamittaiseen kasvien lisääntymiseen. (Ponmurugan & Kumar, 2011) Kasvien kudosisviljelyjärjestelmä toimittaa kaikki tarvittavat ravinteet, energian ja veden kasvatusalustan (engl. basal medium) kautta. Valvottujen itämisolosuhteiden ansiosta valo- ja lämpötilaolosuhteet saadaan säädettyä kasvulle optimaaliseksi, ja kasvien kehitystä pystytään manipuloimaan ja kontrolloimaan kasvuun vaikuttavien säätelytekijöiden avulla tietyissä kasvu- tai kypsymisvaiheissa. (Phillips & Garda, 2019)

Kasvien kudosisviljelmät aloitetaan pienistä osista, joita kutsutaan eksplantaateiksi (engl. explant), jotka on otettu mistä tahansa kasvien osasta. Eksplantaatti poistetaan kasvusta kirurgisesti, sen pinta steriloidaan ja se asetetaan kasvatusalustalle emäviljelmän käynnistämiseksi. Käytännössä on onnistuttu käyttämään kaikkia kasvien osia eksplantaattien lähteenä. (Ponmurugan & Kumar, 2011) Kasvatusalustalla solu tai kudos alkaa kasvaa ja jakautua ja niitä voidaan erilaistaa olosuhteita sekä säätelytekijöitä muokkaamalla halutunlaisiksi lopputuotteiksi.

Soluviljelmien merkittävimpiä etuina pidetään siis bioaktiivisten sekundaaristen metaboliittien synteesiä, mikä toimii kontrolloidussa ympäristössä ilmasto- ja maaperäolosuhteista riippumatta. Ne tarjoavat jatkuvan ja luotettavan lähteen luonnontuotteille, kuten flavonoideille. Tasainen tuotanto ja korkeat saannot ovat tärkeitä tekijöitä, mutta solu- ja kudosisviljelmät mahdollistavat lisäksi sellaisten kasvien kasvattamisen, jotka sisältävät tiettyjä haluttuja yhdisteitä. (Filová, 2014) Kasvisoluviljelmien avulla voidaan parantaa luonnontuotteiden määrää elintarvike-, kosmetiikka- ja lääketeollisuudessa (Marsafari et al., 2020).

3.2 Mikrobisolutehtaat

Liiallinen riippuvuus uusiutumattomista luonnonvaroista on johtanut vakavasti otettaviin ongelmiin, kuten ympäristön saastumiseen, äärimmäisiin sääolosuhteisiin sekä uusiutumattomien luonnonvarojen ehtymiseen, mikä uhkaa ihmiskunnan lisäksi koko maapalloa. On ratkaisevan tärkeää puuttua näihin ongelmiin muuttamalla nykyiset petrokemialliset prosessit kestäviksi ja ympäristöystävällisiksi. (Cho et al., 2022)

Edistysaskeleet synteettisessä biologiassa sekä modernit aineenvaihdunnan muokkauksen menetelmät ovat tarjonneet uusia mahdollisuuksia luonnontuotteiden synteetissä. Nämä lähestymistavat tarjoavat kustannustehokkaita, ympäristöystävällisiä sekä yksinkertaisia strategioita flavonoidien tuotantoon suuremman mittakaavan tavoitteiden saavuttamiseksi. Flavonoidien teollinen tuotanto perustuu pääasiassa kasvikudosisviljelmiin, mutta niistä saatavat saannot ovat pieniä. Lisäksi perinteinen erotus- ja puhdistusprosessi on kallis. Täten keinotekoisesti rakennetuilla mikrobisolutehtailla on osoitettu olevan ainutlaatuisia etuja luonnontuotteiden syntetisoinnissa. (Li et al., 2022) Mikrobisolutehtaat ovat muunneltuja mikro-organismeja, joissa on biosynteettisiä reittejä, jotka on virtaviivaistettu tuottamaan kiinnostavia kemikaaleja uusiutuvista hiililähteistä (Cho et al., 2022).

Kemikaalien ja materiaalien biopohjaiseen tuotantoon käytetään useimmiten mikro-organismeja, sillä niitä voidaan viljellä suljetuissa säiliöissä kontrolloiduissa olosuhteissa. Mikrobi tuotanto suoritetaan tyypillisesti alhaisessa lämpötilassa ja paineessa, ilman myrkyllisiä katalyyttejä tai liuottimia. (Ko et al., 2020) Lisäksi mikrobien biosynteesi on huomattavasti ympäristöystävällisempää verrattuna esimerkiksi kemialliseen synteettiin, sillä mikrobiviljelmät tuottavat spesifisiä flavonoidituotteita. Mikrobien käyttö itsessään ei myöskään vaadi orgaanisia liuottimia (Tariq et al., 2023).

Mikrobisolutehtaat ovat ympäristöystävällisiä, ne mahdollistavat helpon jatkokäsittelyn ja tarjoavat vakaan tuotannon. Mikrobikantoja voidaan kasvattaa helposti ja tarjolla on edistyneitä aineenvaihdunnan muokkaustyökaluja. (Zha et al., 2019) Vuonna 2003 raportointiin ensimmäistä kertaa onnistuneesta flavonoidien biosynteesistä, ja siitä lähtien mikro-organismeihin on onnistuttu rakentamaan erilaisia flavonoidien biosynteesireittejä (Sheng et al., 2020). Lähestymistavalla on potentiaalia tuottaa uusia flavonoidijohdannaisia, joilla voidaan tuottaa esimerkiksi uusia farmaseuttisia tai ravitsemukseen liittyviä sovelluksia. (Zha et al., 2019)

Muokattujen mikro-organismien tehokkaan flavonoidien tuotannon lähtökohtana on, että solut säilyvät elinvoimaisina. Solujen elinkelpoisuuteen vaikuttavat negatiivisesti muun muassa erilaiset stressitekijät, kuten tuotteen toksisuus sekä metabolinen epätasapaino.

Myrkyllisten kemikaalien kerääntyminen voi häiritä aineenvaihduntaprosesseja eri vaiheissa ja täten vahingoittaa rakenteita, kuten solukalvoja ratkaisevasti. Joustavalla reitit-suunnittelulla sekä genomien modifikaatiolla voidaan auttaa mikro-organismeja torjumaan näitä tekijöitä. Myös adaptiivisella evoluutiolla sekä fysikaalisella tai kemiallisella mutageneesillä on pyritty lisäämään solujen sietokykyä myrkyllisille tuotteille. (Li et al., 2022) Kun mikrobisolutehtaan biosynteettiset reitit on suunniteltu ja rakennettu halutunlaiseksi, voidaan systeemin aineenvaihdunnan muokkauksen eri strategioilla muokata kantaa sen suorituskyvyn parantamiseksi niin, että se täyttää teolliset standardit (Cho et al., 2022).

Erilaisista mikrobiologisista isäntäkannoista *Escherichia coli* -bakteeria on käytetty useiden luonnontuotteiden tuottamiseen, sillä se on yksi parhaiten tutkituista organismeista ja sillä on useita etuja mikrobien solutehtaana. Etuja ovat esimerkiksi korkea kasvuvauhti, geeni- ja genomiteknikan välineiden saatavuus, vakiintuneet suuren solutiheyden kasvatustekniikat sekä erilaiset aineenvaihdunnan muokkauksen tekniikat. (Yang et al., 2020) Toinen yleisesti käytetty, tehokkaana solutehtaana toimiva isäntäkanta on *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva. Sitä käytetään laajalti bioteknisissä sovelluksissa, sillä se on yleisesti turvallisena pidetty ja täten sopii laajamittaiseen käyttöön. Sen molekyyli- ja solubiologiaa on tutkittu perusteellisesti, sekä käytettävissä on runsaasti geenitekniikan välineitä. Se kestää hyvin teollisia tuotanto-olosuhteita. (Lian et al., 2018) Käyttämällä näitä kahta hyvin tutkittua ja geneettisesti muokattavissa olevia organismeja, on pystytty rakentamaan aineenvaihdunnan reittejä, jotka johtavat flavonoidiyhdisteiden tuotantoon taloudellisemmalla ja kestävämmällä tavalla.

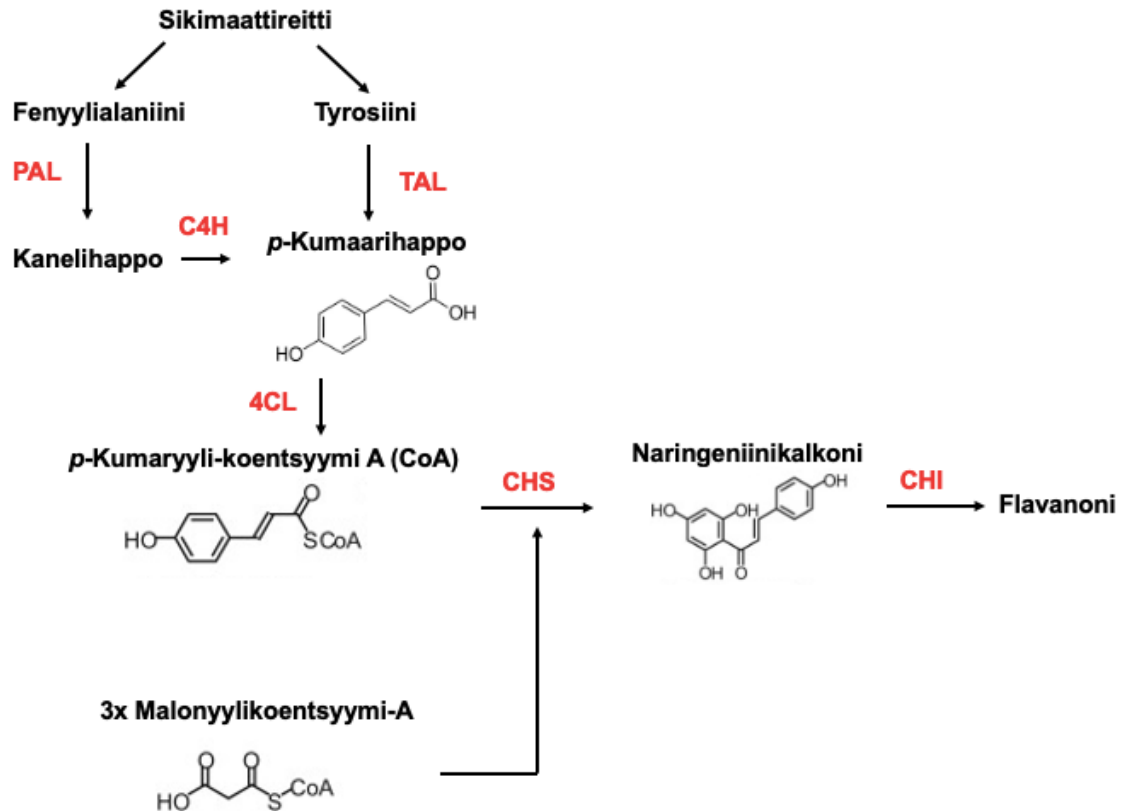
3.3 Flavonoidien biosynteesireitti kasveissa ja tärkeimmät entsyymit

Evoluution aikana kasvit ovat kehittäneet monimutkaisia aineenvaihduntareittejä tuottaakseen monenlaisia aromaattisia yhdisteitä (Yonekura-Sakakibara et al., 2019). Erityisen tärkeää tehokkaan mikrobialustan rakentamiseksi monimuotoisten flavonoidien tuottamiseksi vaatii laajaa ymmärrystä aineenvaihduntareitin entsyyimeistä niiden luonnollisissa elinympäristöissään, sekä niiden ilmentymisestä muokatuissa mikrobeissa (Zha et al., 2019). Entsyymien valinta ja suunnittelu ovat keskeisiä vaiheita aineenvaihduntareitien rakentamisessa, sillä ne määrittävät aineenvaihduntareaktioiden tehokkuuden, mikä puolestaan vaikuttaa koko reitin kokonaismetaboliaan (Cho et al., 2022). Optimaalisten

tuotantoreittien suunnittelu flavonoidien tuottamiseksi edullisista, turvallisista sekä uusiutuvista luonnonvaroista on ensimmäinen askel synteettisten aineenvaihduntareittien luomiseksi (Wu et al., 2014).

Mikrobisolutehtaiden käyttäminen esiasteiden muuntamisessa kohdeflavonoideiksi on ollut tehokas strategia laajamittaisen tuotannon kehittämisessä. Riittävä lähtöaineiden tarjonta vaikuttaa myönteisesti mikrobisolutehtaiden flavonoidien synteesiin, joten suoraan fermentointiprosessiin lisätään esiasteita, jotta saavutetaan korkea flavonoidien pitoisuus. (Wang et al., 2020) Luonnonvaraisessa kannassa esiasteita on rajallisesti ja niiden määrä rajoittaa tuotantoa, minkä vuoksi lähtöaineiden saannon ratkaiseminen on tärkeää flavonoidien pitoisuuden lisäämisessä (Li et al., 2022). Flavonoidien biosynteesi kasveissa alkaa fenyylialaniinista tai tyrosiinista, jotka ovat sikimaattireitin (engl. shikimate pathway) tuotteita. Sikimaattireitti on keskeinen aineenvaihduntareitti, joka johtaa tryptofaanin, tyrosiinin sekä fenyylialaniinin muodostumiseen. Tämä reitti esiintyy yksinomaan kasveissa ja mikro-organismeissa. (Averesch & Krömer, 2018)

Biosynteesi alkaa joko fenyylialaniinin deaminaatiolla kanelihapoksi fenyylialaniiniammoniakkilyaasin (PAL) vaikutuksesta tai tyrosiinin deaminaatiolla p-kumaarihapoksi tyrosiiniammoniakkilyaasin (TAL) vaikutuksesta. Tämän jälkeen kanelihappo tai kumaarihappo muunnetaan vastaavaksi CoA-esteriksi (p-Kumaryyli-koentsyymi A) (Sheng et al., 2020) 4-kumaraatti-CoA-ligaasin (4CL) vaikutuksesta. Tämän jälkeen CoA-esteri kondensoidaan malonyyli-CoA:lla suhteessa 1:3 kalkonisyntaasin (CHS) avulla (naringeniini)kalkoniksi. Mikro-organismien aineenvaihdunnan muokkauksessa CHS:n katalysoima reaktio on erittäin kriittinen vaihe ja tekniikan kehittämisessä on keskitytty kyseiseen reaktioon. Kalkoni voidaan edelleen isomerisoida muodostamaan (2S)-flavononeja, joita kalkoni-isomeraasi (CHI) katalysoi. CHI:n katalysoima reaktio on nopeutta rajoittava vaihe flavonoidien biosynteesissä ja niiden tehokas ilmentyminen mikro-organismeissa on välttämätöntä mikrobisolutehtaiden rakentamiseksi flavonoidien tuotantoa varten. Flavononeja voidaan modifioida erilaisilla entsyymeillä, kuten hydroksylaaseilla, glykosyyli transferaaseilla ja metyyli transferaaseilla tuottamaan edelleen erilaisia flavonoideja. (Zha et al., 2019) Kuvassa 3 on kuvattu edellä esitetty flavonoidien biosynteesireitti kasveissa.



Kuva 3. Flavonoidien biosynteesireitti kasveissa. Punaisella merkityt ovat seuraavat entsyymit: PAL (fenyylialaniiniammoniakkilyaasi); TAL (tyrosiiniammoniakkilyaasi); C4H (cinnamaatti-4-hydroksylaasi); 4CL (4-kumaraatti-CoA-ligaasi); CHS (kalkonisyntaasi); CHI (kalkoni-isomeraasi). Perustuu lähteisiin (Zha et al., 2019; Sheng et al., 2020; Saito et al., 2013).

Viime aikoina tehdyt edistysaskeleet entsyymitekniikassa ovat avanneet uusia väyliä entsyymien ominaisuuksien räätälöintiin halutun aktiivisuuden, spesifisyyden ja stabiiliisuuden saavuttamiseksi. Suunnittelussa voidaan hyödyntää niin kutsuttua rationaalista suunnittelua (engl. rational design). (Cho et al., 2022) Se perustuu proteiinien rakenteen ja toiminnan välisten suhteiden ymmärtämiseen sekä potentiaalisten mutanttien ennustamiseen. Sen tarkoituksena on yksinkertaistaa entsyymitoimintojen suunnitteluprosessia kehittyneiden algoritmien sekä entsyymien katalyyttisten mekanismien syvemmän ymmärtämisen myötä. (Song et al., 2023) Esimerkkejä ovat esimerkiksi niin kutsutut fuusiotagit (engl. fusion tags), joiden avulla voidaan ratkaista entsyymien alhaista stabiiliisuutta tai liukoisuutta.

Vaihtoehtoisesti entsyymien suorituskyvyn parantamiseksi voidaan käyttää suunnattua evoluutiota. (Cho et al., 2022) Suunnatulla evoluutiolla tarkoitetaan kokeellisesti tapahtuvaa geneettisen monimuotoisen luomista, seulontaa sekä valintaa. Luonnollisen evoluution tavoitteena on eloonjääminen ja lisääntyminen, kun taas suunnatussa evoluutiossa mutaatio- ja rekombinaationopeudet ovat paljon korkeammat halutun biologisen

toiminnon seulomiseksi. (Wang et al., 2021) Suunnattuun evoluutioon kuuluu siis muta-toitujen entsyymikirjastojen luominen sekä varianttien seulominen iteroinnin avulla (Cho et al., 2022).

3.4 Mikro-organismien aineenvaihdunnan muokkaus

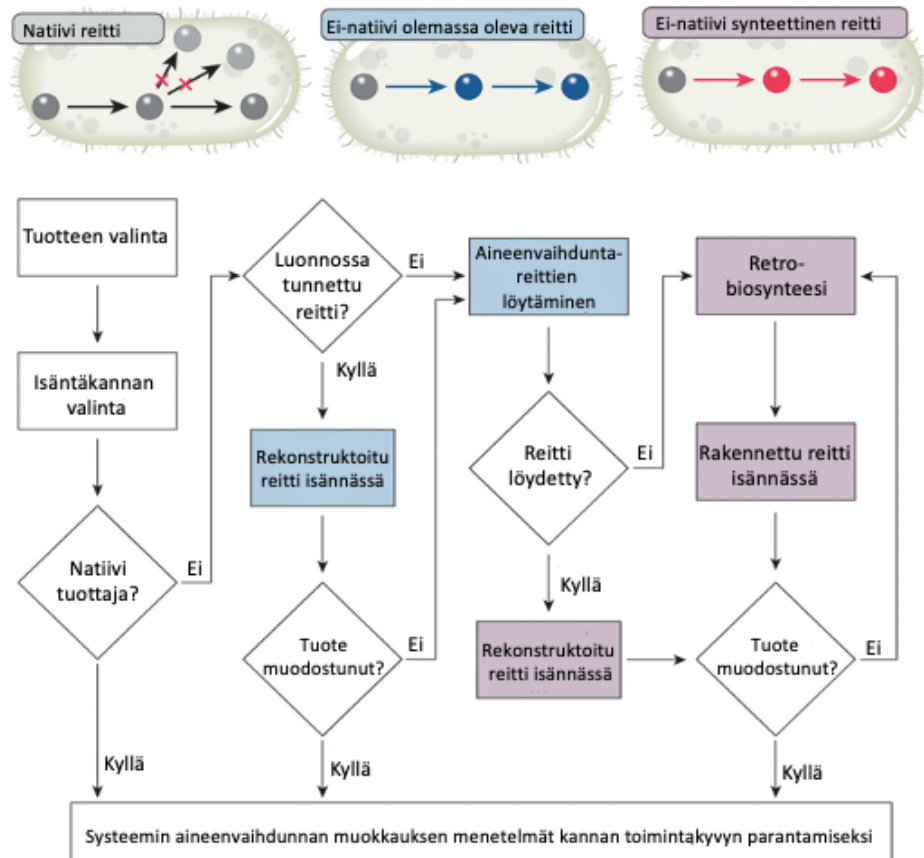
Mikro-organismien aineenvaihdunnan muokkauksen (engl. metabolic engineering) pää-tavoitteena on nimensä mukaisesti muokata solujen aineenvaihduntaa haluttujen yhdis-teiden tuottamiseksi geenitekniikan avulla. Tavoitteena on systemaattinen aineenvaih-duntareittien analysointi molekyylibiologisilla tekniikoilla solujen ominaisuuksien sekä tuotteen parantamiseksi. Aineenvaihdunnan muokkausta voidaan soveltaa solujen omi-naisuuksien kohdistettuun parantamiseen modifioimalla spesifisiä biokemiallisia reakti-ointia tai tuomalla käyttöön uusia geenejä hyödyntämällä eri tekniikoita, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikkaa. (Kumar & Prasad, 2011) Yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttämällä voi-daan manipuloida eri organismien aineenvaihduntareittejä. Isäntäorganismeina voivat toimia bakteerit, sienet, kasvi- ja eläinsolut ja sen valintaa ohjaa kiinnostavien aineen-vaihduntareittien ominaisuudet. (Wuest et al., 2011)

Kiinnostusta aineenvaihdunnan muokkausta kohtaan on herättänyt kaupalliset sovelluk-set, joissa parannellut menetelmät kantojen kehittämiseksi voivat lisätä hyödyllisten me-taboliittien tuotantoa (Kumar & Prasad, 2011). Viime aikoina flavonoidien tuotanto mik-robien avulla on herättänyt runsaasti huomiota alhaisen energiatarpeen, tuotteen kor-kean puhtauden sekä vähäisten sulfaattien, nitraattien ja nitriittien jätepäästöjen vuoksi.

Synteettisen biologian tekniikat ovat mullistaneet aineenvaihdunnan muokkausta mah-dollistaen biopohjaisen tuotannon perustamisen lukuisissa muokatuissa mikrobeissa. Viime vuosikymmeninä on onnistuttu muodostamaan erilaisia flavonoidireittejä useissa mikrobilajeissa. (Tariq et al., 2023) Muokattuja mikrobeja ovat olleet muun muassa *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Streptomyces venezuelae* ja *Corynebacterium glutamicum*, joista *E. coli* sekä *S. cerevisiae* ovat yleisesti käytettyjä isäntiä, sillä niiden aineenvaihdunta tun-netaan parhaiten ja molekulaariset työkalut niiden muokkaamiseen on vakiintuneet (Cho et al., 2022). Vaikka esimerkiksi näillä kannoilla on onnistuttu syntetisoimaan menestyk-sekkäästi erilaisia flavonoidiyhdisteitä, tuotantokyky, mukaan lukien saanto ja tuotanto-nopeus, eivät ole täyttäneet vielä teollisia vaatimuksia. (Zha et al., 2019)

Aineenvaihdunnan muokkauksella muutetaan mikro-organismien toimintaa lisäämällä ei-synnynnäisiä DNA-sekvenssejä, mikä johtaa sellaisten entsyymien tuotantoon, jotka voivat syntetisoida kohdeyhdistettä. Aineenvaihdunnan muokkauksessa flavonoidien biosynteesiä varten tulee ensin käydä läpi seuraavat vaiheet: isäntäkannan valinta, olosuhteiden optimointi, kohteen tunnistus geneettistä manipulointia varten sekä kasvien biosynteesireitteihin liittyvien entsyymien ymmärtäminen. (Tariq et al., 2023) Kun mikro-organismeja eristetään ensimmäistä kertaa luonnosta, niitä ei ole optimoitu haluttuun toimintaan. Jotta ne saataisiin hyödyntämään uusiutuvasta biomassasta peräisin olevia hiililähteitä ja tuottamaan haluttua lopputuotetta, tulee niiden aineenvaihduntaa muokata haluttujen tavoitteiden saavuttamiseksi.

Metabolisen suunnittelun avulla mikro-organismi voidaan saada hyödyntämään uusiutuvaa hiililähdettä substraattina ja tuottamaan haluttua kemikaalia, vaikka se ei olisi sen aineenvaihdunnalle ominaista. Aineenvaihduntareitit voidaan karkeasti jakaa kolmeen luokkaan sen perusteella, ovatko polut isäntäorganismille synnynnäisiä (natiiveja tai ei-natiiveja) ja ovatko ne luonnosta löytyviä vai täysin synteettisiä (kuva 4). (Cho et al., 2022) Perinteisesti on keskitytty optimoimaan luonnollisia reittejä, mutta synteettisen ja laskennallisen biologian viimeaikaiset edistysaskeleet ovat mahdollistaneet uusien ja spesifisten metaboliareittien suunnittelun haluttujen kemikaalien tuottamiseksi (Choi et al., 2019). Synteettisten polkujen avulla pystytään tuottamaan muita kuin luonnollisia kemikaaleja tai jopa sellaisia luonnontuotteita, joiden biosynteettisiä reittejä ei tunneta (Cho et al., 2022).



Kuva 4. Kaaviokuva biosynteettisten polkujen suunnittelun periaatteista. Siniset laatikot kuvaavat ei-natiivia olemassa olevaa reittiä ja punaiset vastaavasti ei-natiivia syntetisointireittiä. Syntyperäiset eli natiivit polut ovat biosynteettisiä polkuja, jotka ovat olemassa eristetyssä mikrobi-isännässä ja jotka pystyvät tuottamaan haluttua tuotetta luonnollisesti ilman tarvetta ottaa käyttöön vieraita biosynteettisiä polkuja. Ei-syntyperäiset eli ei-natiivit olemassa olevat polut ovat rekonstruoituja biosynteettisiä reittejä, jotka eivät ole isäntäorganismille luonnollisia, mutta hyödyntävät luonnossa olemassa olevia polkuja. Ei-syntyperäisiä syntetisointireittejä ei löydy luonnosta, vaan ne käyttävät syntetisointireittejä ja polkuja. Muokattu lähteestä (Cho et al., 2022).

Kaikki flavonoidit sisältävät difenyylipropaanirungon (C6-C3-C6), joka esitettiin kuvassa 1. (2S)-naringeniinin sekä (2S)-pinosembriinin rakenteet ovat hyvin samankaltaisia kuin nämä flavonoidien difenyylipropaanirungon rakenteet. Täten niitä voidaan modifioida muodostamaan erilaisia flavonoideja erilaisilla kemiallisilla tai biologisilla katalysointiprosesseilla, kuten glykosylaatiolla, metylaatiolla, hydroksylaatiolla, prenylaatiolla sekä polymerisaatiolla. (Li et al., 2022) Tällaiset yhdisteet ovat eräänlaisia molekulaarisia tukirankoja (eng. scaffolds), jotka mahdollistavat entsyymien toiminnallisen kasaamisen lähekkäin. Erityisesti naringeniinin tuottaminen bioreaktoreissa on ollut tehokasta ja täten sen syntetisointi on herättänyt erityistä kiinnostusta. Naringeniini on flavanoni ja se on monien flavonoidien, kuten flavonolien, antosyaanien flavonien ja isoflavonien yleinen

esiaste (Yonekura-Sakakibara et al., 2019). Naringeniinilla katsotaan olevan tärkeä vaikutus ihmisten terveyteen esimerkiksi antioksidanttina, tulehdusta ehkäisevänä ja DNA:ta korjaavana yhdisteenä. Kuitenkin vain 15 % suun kautta nautitusta naringeniinista imeytyy parhaassa tapauksessa ihmisen ruuansulatuskanavassa. Esimerkiksi lasillisesta appelsiinimehua saadaan noin 0,5 µmol naringeniinia. (Venkateswara Rao et al., 2017)

Kuten edellä mainittiin, flavonoidien tuotannossa yleisesti käytettyjä isäntäkantoja ovat *E. coli* ja *S. cerevisiae*, jotka ovat perusteellisesti tutkittuja sekä geneettisesti hyvin käsiteltävissä olevia organismeja. Nämä mikrobi-isännät eivät kuitenkaan kykene tuottamaan luonnostaan flavonoideja, sillä niiden systeemistä puuttuu fenyylipropanoidireitti. (Shah et al., 2019) Kantojen aineenvaihduntaa muokkaamalla on kuitenkin onnistuttu tuottamaan aikaisemmin mainittuja useimpien flavonoidien esiasteita, joista niin edelleen voidaan modifioida useimpia flavonoidiyhdisteitä. Taulukossa 3 on esitetty *E. coli*- ja *S. cerevisiae* -kantojen avulla bioreaktoreissa tuotettujen flavonoidien saantoja. Kun isäntäkanta on saatu tuottamaan naringeniiniä tai pinosembriiniä, seuraava vaihe on tuotannon tehostaminen soveltamalla aineenvaihdunnan muokkauksen strategioita (Wu et al., 2014).

Taulukko 3. Flavonoidien biosynteesi mikro-organismeilla bioreaktoreissa: *E. coli* ja *S. cerevisiae* -bakteereilla saadut (2S)-naringeniinin ja (2S)-pinosembriinit pitoisuudet

Isäntäkanta	Substraatti	Tuote	Titteri (mg/l)
<i>E. coli</i>	Glukoosi	(2S)-Naringeniini	588
	Glukoosi	(2S)-Pinosembriini	526
<i>S. cerevisiae</i>	Glukoosi	(2S)-Naringeniini	1100
	p-Kumaarihappo	(2S)-Naringeriini	649

Muokattu lähteestä (Li et al., 2022)

Viime vuosina lisääntyneen tiedon sekä kehittyneen aineenvaihdunnan muokkaustekniikan myötä on onnistuttu rakentamaan yhä useampia ja kehittyneempiä mikrobisolutehtaita tuottamaan flavonoideja niiden suorista esiasteista tai uusiutuvista hiililähteistä. Mikrobisolutehtailla on useita kilpailuetuja, kuten nopea kasvunopeus, turvallisuus, taloudellisesti kannattavat substraatit, viljelyn helppous sekä haluttujen metaboliittien korkea pitoisuus verrattuna alkuperäiseen isäntään (Tariq et al., 2023), mutta siitä huolimatta tekniikalla on lisäksi useita rajoitteita. Jotta mikro-organismien flavonoidireittiä voitaisiin huomattavasti parantaa, on edelleen useita haasteita ratkaistavana. Flavonoidien biosynteesipolkuun osallistuvat entsyymit ovat usein redox-riippuvaisia, ja niillä on

alhainen entsyymiaktiivisuus sekä huono selektiivisyys, mikä rajoittaa flavonoidien tuotantotehokkuutta. Lisäksi flavonoidien biosynteesireitti sisältää pitkiä reaktiovaiheita sekä monimutkaisia säätelyjärjestelmiä. (Sheng et al.,2020)

Lisäksi tuotantotehokkuutta rajoittavat merkittävästi solunsisäisten esiasteiden, kuten *p*-kumaarihapon ja malonyyli-CoA:n alaiset konsentraatiot. Nämä esiasteet toimivat usein välttämättöminä välituotteina tukemassa solujen kasvua, minkä vuoksi hiilen määrä on tärkeää jakaa keskusaineenvaihduntareittien ja biosynteesireittien välillä. (Sheng et al.,2020) *E. coli* sisältää hyvin vähän vapaata malonyyli-CoA:ta. Sen aineenvaihdunnassa vain pieni osa asetyyli-CoA:sta muunnetaan malonyyli-CoA:ksi asetyyli-CoA-karboksylaasin (ACC) avulla. Malonyyli-CoA:n pitoisuuden kasvattamiseksi on pyritty kasvattamaan avainentsyymi ACC:n aktiivisuutta. Erääksi tehokkaaksi keinoksi on todettu ACC-alayksiköiden tuonti *E. coli* -bakteeriin rasvahappojen tuotannon tehostamiseksi. Täten rekombinaatti *E. coli*, jossa on vierasta CoA:ta koodaava geeni, voisi kasvattaa solunsisäistä CoA:n määrää, mikä lisäisi asetyyli-CoA:n saatavuutta. Kun väliaineeseen lisätään pantoteenihappoa, joka on CoA-biosynteesireitin lähtöaine, ACC muuttaa ylimääräisen asetyyli-CoA:n malonyyli-CoA:ksi, mikä johtaa useiden solujen rasvahappojen ylituotantoon. (Kaku et al., 2022)

Flavonoidien biosynteesireitillä *p*-kumaarihapon esiasteena toimivat fenyylialaniini sekä tyrosiini, jotka syntetisoituvat sikimaattireitin kautta, joka on tarkasti säädely reitti. Aminohappojen biosynteesireitillä toimivat korismaattimutaasit estävät fenyylialaniinin sekä tyrosiinin takaisinkytkentää. Näiden entsyymien säätely estää siis fenyylialaniinin ja tyrosiinin ylituotantoa solussa, minkä vuoksi ne ovat rajoittavia tekijöitä flavonoidien tuotannossa. Täten aromaattisten aminohappojen negatiivisen säätelyn poistaminen on yksi keino esiasteiden biosynteesin ja täten *p*-kumaarihapon määrän tehostamiseksi. Flavonoidien tuotannon tehokkuutta pystytään siis parantamaan viemällä modifikaatioentsyymeitä flavanoneja eli useimpien flavonoidien esiastetta mikrobeihin. (Isogai et al., 2022)

4. FLAVONOIDIEN TUOTANNON TULEVAISUUS

Tulevaisuudessa kasveista saatavat fyto-kemikaalit, mukaan lukein flavonoidit, ovat merkittävässä asemassa ilmastonmuutoksen, uusien viljelyjärjestelmien, elintarvikkeiden laatuun ja turvallisuuteen liittyvien haasteiden ratkaisussa (Albert et al., 2023). Mikro-organismien aineenvaihdunnan muokkaus mahdollistaa kemikaaleja ja materiaaleja tehokkaasti tuottavien mikrobikantojen kehittämisen, mutta vaatii runsaasti taloudellisia kustannuksia, jotta kannoista saataisiin teollisesti kilpailukykyisiä (Choi et al., 2019).

Luonnosta saatavien flavonoidien kysyntä markkinoilla kasvaa jatkuvasti, ja maailmanlaajuisten markkinoiden arvioidaan olevan 1,2 miljardia dollaria vuoteen 2024 mennessä (Marsafari et al., 2020). Tämä monitieteellinen ala kehittyy nopeasti systeemibiologian, synteettisen biologian sekä evolutiivisen tekniikan edistymisen myötä (Choi et al., 2019). Useimpien rakennettujen tuotantojärjestelmien kapasiteetti ei kuitenkaan vielä täytä teollisen mittakaavan vaatimuksia. Flavonoidituotantoa mikro-organismeissa rajoittaa esimerkiksi riippuvuus kalliista esiasteista sekä alhainen malonyyli CoA:n solunsisäinen pitoisuus. Erilaiset synteettisen biologian ja evoluutiotekniikan menetelmät tarjoavat näkökulmia kantojen ja prosessien optimointiin ja ratkaisuja pyritään löytämään jatkuvasti. (Wu et al., 2014)

Vaikka aineenvaihdunnan muokkauksen avulla on saatu monia erilaisia mikrobikantoja tuottamaan erilaisia kemikaaleja ja materiaaleja onnistuneesti, vielä useat tärkeät kemikaalit odottavat laajamittaista tuotantoa. Kehittäminen on toistaiseksi haastavaa, sillä vastaavista biosynteettisistä reiteistä sekä entsyymeistä ei ole riittävästi tietoa, ja reitit ovat pitkiä sekä monimutkaisia. (Choi et al., 2019) Vaikka on onnistuttu kehittämään menetelmiä, joiden avulla yksivaiheisia reaktioita pystytään ennustamaan, ei kokonaisten synteesisireittien suunnittelu ole vielä suoraviivaista. Kun halutun kemiallisen yhdisteen reaktiovaiheiden määrä kasvaa, myös mahdollisten reaktioyhdistelmien määrä kasvaa eksponentiaalisesti. (Cho et al., 2022)

Isäntäkantojen aineenvaihdunnan tehokkuuden parantamiseksi tulee ottaa huomioon neljä teknisesti rajoittavaa tekijää: nopeutta rajoittavat entsyymit, geneettinen säätely, aineenvaihduntavirta sekä sekundaaristen metaboliittien varastointi solussa niin, että niillä ei ole soluun kertyessä inhiboivaa vaikutusta. Nämä tekijät huomioimalla sekä yh-

distämällä erilaisiin suunnittelustrategioihin saadaan muokattua muunnellun aineenvaihduntareitin saantoa sekä tuotantonopeutta niin, että siitä voitaisiin saada taloudellisesti kilpailukykyistä verrattuna kasveista eristämiseen. (Wang et al., 2011)

Pelkkä aiheenvaihduntareittien entsyymien löytäminen ei riitä ohjaamaan synteesiä halutun kemikaalin tuottoon, vaan entsyymien toiminta isännässä on tutkittava perusteellisesti. Vielä aineenvaihduntapolkujen entsyymien ilmentymisolosuhteita, stabiilisuutta, sijaintia, aktiivisuutta sekä kineettisiä ominaisuuksia ei tunneta tarpeeksi hyvin. Se vaikeuttaa entsyymien käyttäytymisen ymmärtämistä ja täten aineenvaihduntareittien suunnittelua paremman toiminnallisuuden sekä laajemman mittakaavan tuotannon ja pitoisuuksien saavuttamiseksi. (Zha et al., 2019) Entsyymien kehityksessä on otettu suuria edistysaskeleita proteiinien suunnittelun kehityttyä. Ne mahdollistavat muun muassa ei-luonnollisten entsyymisekvenssien tuottamisen (Repecka et al., 2021) sekä mahdollistavat 3D-proteiinirakenteen selvittämisen (AlQuraishi, 2019). Mikrobisolutehtaiden kehityksen myötä uskotaan, että tulevaisuudessa niiden avulla pystytään tuottamaan sellaisia kemikaaleja ja materiaaleja, jotka tällä hetkellä tuotetaan uusiutumattomista luonnonvaroista (Cho et al., 2022).

Metaboliareittien tehokkuuden parantamiseksi on testattu monoviljelmien sijaan mikrobikonsortioita. Perinteiseen strategiaan verrattuna konsortioiden käyttö vähentää merkittävästi yksittäisen mikrobikannan biosynteesityötä sekä siihen liittyvää metabolista taakkaa. Se rajoittaa myös ei-toivottujen sivutuotteiden muodostumista. (Tariq et al., 2023) Nämä seikat ovat erityisen tärkeitä sellaisissa biosynteesissä, joissa reitit ovat pitkiä ja monimutkaisia. Tässä työssä esiteltujen biosynteettisten reittien lisäksi on tutkittava ja suunniteltava myös eri hiililähteiden hyödyntämistä laajemman mittakaavan tuotantoa ajatellen. Viime aikoina on ollut kiinnostusta käyttää hiililähteenä esimerkiksi elintarvikkejätettä, hiilidioksidia ja metaania. Erilaisten jätehiililähteiden käyttö edistää lisäksi hiili-neutraaliustavoitteita (Cho et al., 2022)

Yhtenä potentiaalisena tulevaisuuden mahdollisuutena pidetään ligniinin hyödyntämistä flavonoidien tuotannossa. Ligniini on aromaattinen polymeeri, jolla on tärkeä tehtävä soluseinien muodostumisessa, erityisesti puun ja kaarnan soluissa. Ligniini edesauttaa kasvien rakennetta ja auttaa puolustautumaan tuholaisista ja taudinaiheuttajia vastaan, minkä vuoksi se tarjoaa useita bioteknisiä mahdollisuuksia. (Ralph et al., 2019) Sitä pidetään luonnon runsaimpana alihyödynnettynä luonnonvarana. Ligniiniimonomeerit toimivat flavonoidien suorina esiasteina, joten sillä on runsaasti potentiaalia toimia tulevaisuudessa flavonoidien tuotannossa. Tämä menetelmä vaatii ligniiniä hajottavien kantojen, kuten *Pseudomonas putidan* tai *Rhodococcus jostii* hyödyntämistä. Ligniiniä hajottavaa kantaa viljellään yhdessä flavonoideja tuottavan kannan kanssa, jolloin toinen

kanta voi muuntaa ensimmäisestä kannasta vapautuvat fenyylipropanoidit flavonoideiksi. (Xu et al., 2020)

Mikrobisolutehtaiden lisäksi on lupaaviksi menetelmiksi tulevaisuudessa esitetty erilaisen biosensorijärjestelmien käyttöä. Geneettisesti koodatut biosensorit mahdollistavat laajemmat välineet solujen kontrollointiin ja kantojen suunnitteluun, mikä saattaa tulevaisuudessa vähentää kantojen optimointiin ja evoluutioon liittyviä ponnisteluja. Lisäksi lisääntynyt hiivojen käyttö isäntinä tarjoaa uusia genomien muokkaustyökaluja, kuten CRISPR-Cas9 -järjestelmän käytön, mikä mahdollistaa geneettisten kohteiden laajemmat tutkimisen. (Marsafari et al., 2020) Kyky aiheuttaa kohdennettuja mutaatioita CRISPR:n (engl. clustered regularly-interspaced short palindromic repeats) avulla mahdollistaa muun muassa viljelykasvien flavonoidipitoisuuden parantamisen (Albert et al., 2023).

Eräänä potentiaalisena menetelmänä pidetään myös flavonoidien, uuttamista maatalousteollisuuden jätteestä. Sen käyttöä varten tulee kuitenkin ratkaista puhdistukseen ja eristämiseen liittyviä ongelmia. (Rodriguez et al., 2017) Tutkijat pyrkivät lisäksi löytämään uusia mikrobilajeja, jotka pystyvät tuottamaan haluttuja yhdisteitä tehokkaasti. Vaikka flavonoidien tuottamisessa mikro-organismien avulla teollisessa mittakaavassa on vielä rajoituksensa, uskotaan kaupallisesti saatavilla olevien flavonoidien määrän kasvavan lähivuosina nopeasti tekniikan kehittymisen ansiosta. (Tariq et al., 2023)

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Kasvanut kiinnostus terveellisiä elintapoja sekä ennaltaehkäisevien ravintoaineiden ja lääkkeiden kehitystä kohtaan on kasvattanut flavonoidien kysyntää viime vuosina runsaasti. Flavonoidit muodostavat laajan ryhmän kasvien sekundaarisia metaboliitteja, joilla on tärkeä merkitys kansanterveydelle.

Ensimmäisen tutkimuskysymyksen johdattamana työn tavoitteena oli selvittää, mitkä ovat flavonoidien luonnolliset tuotantotavat ja miksi halutaan löytää uusia menetelmiä. Tutkimukset ovat osoittaneet flavonoidien hyödyllisyyden sairauksien ehkäisyssä sekä hoidossa. Toistaiseksi kuitenkin flavonoidien saatavuus perinteisin menetelmin kasveista eristämällä tai kemiallisella synteesillä ei ole vakaata, ympäristöystävällistä, eikä niiden avulla pystytä vastaamaan kasvaneeseen kysyntään. Uusien tekniikoiden avulla olisi myös mahdollista saada syntetisoitua harvinaisia tai jopa uusia flavonoidiyhdisteitä.

Työn tavoitteena oli lisäksi perehtyä flavonoidien tuottamiseen bioteknisin menetelmin, sekä selvittää miksi ja miten näitä tekniikoita kehitetään sekä perehtyä eri tekniikoihin tuottaa flavonoideja mikro-organismien avulla. Flavonoidien tuottaminen mikro-organismeilla on jatkuvasti kehittyvä tutkimuksen ala, joka tulevaisuudessa tarjoaa mahdollisuuksia uusien lääkkeiden, ravintolisien sekä funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiseen. Synteettisen biologian nopea kehittyminen tarjoaa kattavasti geneettisiä työkaluja mikrobi-isäntien kehittämiseen flavonoidien tuottamiseksi. Mikrobikannat voidaan saada tuottamaan haluttua tuotetta muokkaamalla sen aineenvaihduntaa kontrolloiduissa olosuhteissa. Flavonoideja on onnistuttu syntetisoimaan bioreaktoreissa jo kohtalaisia pitoisuuksia esimerkiksi *E. coli*- ja *S. cerevisiae*-isäntäkantojen avulla, ja pitoisuuksia pyritään kasvattamaan edelleen aineenvaihdunnan muokkauksen sekä synteettisen biologian kehittyneiden tekniikoiden myötä.

Mikrobien käyttöä suositaan kemikaalien ja materiaalien biopohjaisessa tuotannossa, sillä niiden käyttö on kontrolloitua sekä ympäristöystävällistä. Mikrobituotanto voidaan suorittaa tarkkaan kontrolloiduissa, miedoissa olosuhteissa, eikä niiden käyttö vaadi vaarallisten kemikaalien käyttöä tai vaativia puhdistus- tai jatkoprosesseja. Menetelmät on eivätkään riipu maantieteellisistä tekijöistä tai vuodenaikojen aiheuttamasta vaihtelusta Mikrobikantojen muokkaukseen on tarjolla kehittyneitä menetelmiä, joiden avulla kantojen aineenvaihduntaa saadaan manipuloitua halutun lopputuloksen saavuttamiseksi.

Tuotanto ei ole kuitenkaan vielä saavuttanut teollista mittakaavaa, sillä tietoa eri entsyymeistä ja aineenvaihduntareiteistä ei ole riittävästi. Työn lopullisena tavoitteena oli selvittää, miten flavonoidien tuotannosta saataisiin teollisesti kannattavaa ja miltä niiden tuotannon tulevaisuus näyttää. Kasveissa luonnollisesti esiintyvien biosynteesireittien siirtäminen mikro-organismeihin vaatii halutun tuotteen reitin ilmentämistä isäntäkannassa sekä reitin muuntelua saannon ja tuotantonopeuden kasvattamiseksi, jotta teollisen mittakaavan tuotannosta saataisiin taloudellisesti kannattavaa. Kirjallisuuden perusteella ei kuitenkaan vielä voitu yksiselitteisesti esittää ratkaisua siihen, miten flavonoidien tuotannosta mikro-organismeilla saataisiin teollisesti kannattavaa.

Mikro-organismien hyödyntäminen flavonoidien tuotannossa tarjoaa kuitenkin mahdollisuuden vastata tulevaisuudessa flavonoidien kasvaneeseen kysyntään kestäväällä tavalla. Metaboliamuokkauksen tekniikat ovat osoittaneet, että mikro-organismien avulla on mahdollista tehostaa prosesseja alkuperäisestä kannansuunnittelusta aina teolliseen tuotantoon asti. Jatkotutkimuksia tulisi siis vielä tehdä, jotta kaikki työn tavoitteet voitaisiin saavuttaa. Kun esteet on selätetty, mikrobisolutehtaat ovat mahdollisesti tulevaisuuden tehtaita kemikaalien, polttoaineiden sekä materiaalien kestävässä tuotannossa. Tulevaisuudessa flavonoidit tulevat olemaan ratkaisevassa asemassa kroonisten sairauksien ehkäisyssä ja hoidossa sekä sen myötä terveydenhuollon kantokyvyn parantamiseksi.

LÄHTEET

- A. Badria, F., Ananga, A. (Eds.), 2020. Flavonoids - A Coloring Model for Cheering up Life. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77859>
- Albert, N.W., Lafferty, D.J., Moss, S.M.A., Davies, K.M., 2023. Flavonoids – flowers, fruit, forage and the future. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 53, 304–331. <https://doi.org/10.1080/03036758.2022.2034654>
- AlQuraishi, M., 2019. End-to-End Differentiable Learning of Protein Structure. *Cell Systems* 8, 292-301.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.03.006>
- Averesch, N.J.H., Krömer, J.O., 2018. Metabolic Engineering of the Shikimate Pathway for Production of Aromatics and Derived Compounds—Present and Future Strain Construction Strategies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6, 32. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00032>
- Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.M., Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M., 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing* 89, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.002>
- Brodowska, K.M., 2017. Natural Flavonoids: Classification, Potential Role, And Application Of Flavonoid Analogues. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.545778>
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., Sharma, K., 2020. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Chávez-González, M.L., Sepúlveda, L., Verma, D.K., Luna-García, H.A., Rodríguez-Durán, L.V., Iliina, A., Aguilar, C.N., 2020. Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids. *Processes* 8, 434. <https://doi.org/10.3390/pr8040434>
- Cho, J.S., Kim, G.B., Eun, H., Moon, C.W., Lee, S.Y., 2022. Designing Microbial Cell Factories for the Production of Chemicals. *JACS Au* 2, 1781–1799. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00344>
- Choi, K.R., Jang, W.D., Yang, D., Cho, J.S., Park, D., Lee, S.Y., 2019. Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic

Engineering. Trends in Biotechnology 37, 817–837.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.003>

Dianursanti, Nugroho, P., Prakasa, M.B., 2020. Comparison of maceration and soxhletation method for flavonoid production from *Spirulina platensis* as a sunscreen's raw material. Presented at the international conference on emerging applications in material science and technology: iceamst 2020, Namakkal, India, p. 020006.
<https://doi.org/10.1063/5.0002806>

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., Casati, P., 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* 3.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>

Fazili, M.A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., Geelani, S.N., 2022. In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bull Natl Res Cent* 46, 35. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z>

Filová, A., 2014. Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. *Research Journal of Agricultural Science*.

Isogai, S., Tominaga, M., Kondo, A., Ishii, J., 2022. Plant Flavonoid Production in Bacteria and Yeasts. *Front. Chem. Eng.* 4, 880694.
<https://doi.org/10.3389/fceng.2022.880694>

Kaku, M., Ishidaira, M., Satoh, S., Ozaki, M., Kohari, D., Chohnan, S., 2022. Fatty Acid Production by Enhanced Malonyl-CoA Supply in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 79, 269.
<https://doi.org/10.1007/s00284-022-02969-4>

Ko, Y.-S., Kim, J.W., Lee, J.A., Han, T., Kim, G.B., Park, J.E., Lee, S.Y., 2020. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production. *Chem. Soc. Rev.* 49, 4615–4636.
<https://doi.org/10.1039/D0CS00155D>

Kumar, R.R., Prasad, S., 2011. Metabolic Engineering of Bacteria. *Indian J Microbiol* 51, 403–409. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0172-8>

Li, H., Lyv, Y., Zhou, S., Yu, S., Zhou, J., 2022. Microbial cell factories for the production of flavonoids—barriers and opportunities. *Bioresource Technology* 360, 127538.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127538>

Lian, J., Mishra, S., Zhao, H., 2018. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metabolic Engineering* 50, 85–108. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.011>

Marsafari, M., Samizadeh, H., Rabiei, B., Mehrabi, A., Koffas, M., Xu, P., 2020. Biotechnological Production of Flavonoids: An Update on Plant Metabolic Engineering, Microbial Host Selection, and Genetically Encoded Biosensors. *Biotechnol. J.* 15, 1900432. <https://doi.org/10.1002/biot.201900432>

Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Phillips, G.C., Garda, M., 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 55, 242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>

Ponmurugan, P., Kumar, S.K., 2011. *Applications of Plant Tissue Culture*. New Age International Ltd, Daryaganj, INDIA.

Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W., 2019. Lignin structure and its engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 56, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>

Repecka, D., Jauniskis, V., Karpus, L., Rembeza, E., Rokaitis, I., Zrimec, J., Poviloniene, S., Laurynenas, A., Viknander, S., Abuajwa, W., Savolainen, O., Meskys, R., Engqvist, M.K.M., Zelezniak, A., 2021. Expanding functional protein sequence spaces using generative adversarial networks. *Nat Mach Intell* 3, 324–333. <https://doi.org/10.1038/s42256-021-00310-5>

Rodríguez, A., Strucko, T., Stahlhut, S.G., Kristensen, M., Svenssen, D.K., Forster, J., Nielsen, J., Borodina, I., 2017. Metabolic engineering of yeast for fermentative production of flavonoids. *Bioresource Technology* 245, 1645–1654. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.043>

Rodríguez De Luna, S.L., Ramírez-Garza, R.E., Serna Saldívar, S.O., 2020. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *The Scientific World Journal* 2020, 1–38. <https://doi.org/10.1155/2020/6792069>

Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., Fernie, A.R., 2013. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and

genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>

Shah, F.L.A., Ramzi, A.B., Baharum, S.N., Noor, N.M., Goh, H.-H., Leow, T.C., Oslan, S.N., Sabri, S., 2019. Recent advancement of engineering microbial hosts for the biotechnological production of flavonoids. *Mol Biol Rep* 46, 6647–6659. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05066-1>

Sheng, H., Sun, X., Yan, Y., Yuan, Q., Wang, J., Shen, X., 2020. Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Flavonoids. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 589069. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.589069>

Song, Z., Zhang, Q., Wu, W., Pu, Z., Yu, H., 2023. Rational design of enzyme activity and enantioselectivity. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1129149. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1129149>

Tariq, H., Asif, S., Andleeb, A., Hano, C., Abbasi, B.H., 2023. Flavonoid Production: Current Trends in Plant Metabolic Engineering and De Novo Microbial Production. *Metabolites* 13, 124. <https://doi.org/10.3390/metabo13010124>

Teoh, E.S., 2016. Secondary Metabolites of Plants, in: *Medicinal Orchids of Asia*. Springer International Publishing, Cham, pp. 59–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5

Venkateswara Rao, P., SDVS Kiran, Rohini, P., Bhagyasree, P., 2017. Flavonoid: A review on Naringenin. *J. Pharmacogn. Phytochem.*

Wang, J., Ledesma-Amaro, R., Wei, Y., Ji, B., Ji, X.-J., 2020. Metabolic engineering for increased lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* – A Review. *Bioresource Technology* 313, 123707. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123707>

Wang, Y., Chen, S., Yu, O., 2011. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 949–956. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3449-2>

Wang, Y., Xue, P., Cao, M., Yu, T., Lane, S.T., Zhao, H., 2021. Directed Evolution: Methodologies and Applications. *Chem. Rev.* 121, 12384–12444. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00260>

Wu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J., 2014. Systems metabolic engineering of microorganisms to achieve large-scale production of flavonoid scaffolds. *Journal of Biotechnology* 188, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.016>

Wuest, D.M., Hou, S., Lee, K.H., 2011. Metabolic Engineering, in: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, pp. 617–628. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00229-4>

Xu, P., Marsafari, M., Zha, J., Koffas, M., 2020. Microbial Coculture for Flavonoid Synthesis. *Trends in Biotechnology* 38, 686–688. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.01.008>

Yang, D., Park, S.Y., Park, Y.S., Eun, H., Lee, S.Y., 2020. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Natural Product Biosynthesis. *Trends in Biotechnology* 38, 745–765. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.11.007>

Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y., Nakabayashi, R., 2019. The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. *Front. Plant Sci.* 10, 943. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00943>

Zha, J., Wu, X., Gong, G., Koffas, M.A.G., 2019. Pathway enzyme engineering for flavonoid production in recombinant microbes. *Metabolic Engineering Communications* 9, e00104. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00104>