



Universidad de Oviedo

**Ingeniería genómica en *Streptomyces albidoflavus*
J1074 para la producción de flavonoides de interés
farmacológico**

Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular

Tesis Doctoral

Patricia Magadán Corpas

Oviedo, 2024

Contenido

I.	LISTA DE FIGURAS	
II.	LISTA DE ABREVIATURAS	
III.	RESUMEN DEL CONTENIDO DE LA TESIS DOCTORAL	
	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	Flavonoides	3
1.1.	Biosíntesis en plantas	3
1.2.	Diversidad estructural	4
1.2.1.	Oxigenasas de flavonoides	7
1.3.	Funciones biológicas.....	10
1.4.	Potencial terapéutico de los flavonoides	12
1.4.1.	Relación de los flavonoides con la microbiota intestinal ligado a la regulación de los procesos inflamatorios.....	15
1.5.	Interés industrial de los flavonoides.....	16
1.5.1.	Biosíntesis heteróloga.....	17
2.	<i>Streptomyces</i> spp. como factoría bacteriana de compuestos bioactivos.....	19
2.1.	Ciclo biológico.....	20
2.2.	Biosíntesis de compuestos bioactivos	22
2.3.	<i>Streptomyces albidoflavus</i> J1074 como factoría microbiana	24
3.	Ingeniería genética y Biología Sintética para la expresión heteróloga de compuestos bioactivos en <i>Streptomyces</i> spp.	26
3.1.	Elementos reguladores en Biología Sintética.....	27
3.1.1.	Regulación transcripcional	27
3.1.2.	Regulación traduccional	28
3.2.	Herramientas y técnicas de ingeniería genética	29
3.2.1.	El uso de plásmidos como vectores de clonación en Biología Sintética	29
3.2.2.	Técnicas de clonación de vectores plasmídicos.....	32
3.2.2.1.	Digestión con enzimas de restricción de tipo II.....	32
3.2.2.2.	Ensamblaje de tipo Gibson.....	33
3.2.2.3.	Clonación de tipo Golden Gate	34

3.2.3. Técnicas de mutación. CRISPR/Cas9	36
4. Estrategias de optimización de la producción de flavonoides y otros compuestos bioactivos o metabolitos secundarios	38
4.1. Optimización de las condiciones de cultivo	38
4.2. Suplementación con precursores metabólicos e intermediarios de ruta	39
4.3. Expresión o represión de rutas de precursores metabólicos	40
4.3.1. Sobreexpresión de enzimas endógenos y expresión de enzimas exógenos.....	40
4.3.2. Deleción o inhibición de genes y/o agrupamientos génicos	43
4.4. Optimización enzimática	44
4.5. Biosíntesis combinatoria (co-cultivos)	46
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	49
RESULTADOS. Capítulo 1	55
RESULTADOS. Capítulo 2	77
RESULTADOS. Capítulo 3	91
RESULTADOS. Capítulo 4	109
DISCUSIÓN	133
1. Desarrollo y aplicación práctica de una librería de vectores bifuncionales <i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> , basada en la arquitectura SEVA, para su uso en actinomicetos	136
2. Biosíntesis heteróloga de flavanonas, flavanonoles y auronoles por <i>S. albidoflavus</i> J1074..	138
3. Optimización de la biosíntesis de flavonoides en <i>S. albidoflavus</i> J1074.....	142
3.1. Optimización de las condiciones de fermentación y disponibilidad de precursores ...	142
3.2. Optimización a nivel enzimático y establecimiento de co-cultivos	146
4. Evaluación del potencial antiinflamatorio de los flavonoides apigenina, luteolina y xanthohumol en un modelo murino de colitis ulcerosa.....	149
5. Perspectivas futuras	153
CONCLUSIONES	155
REFERENCIAS.....	159
ANEXOS.....	189

I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis mixta de los flavonoides en las plantas. Ruta del shikimato (rojo); ruta de los fenilpropanoides (verde); ruta de los flavonoides (azul). Las flechas discontinuas indican la ausencia de representación de pasos intermedios.	4
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.....	4
Figura 3. Diversidad estructural de flavonoides en base a modificaciones en el anillo C (rojo).	5
Figura 4. Subclases minoritarias de flavonoides.....	7
Figura 5. Reacción química catalizada por el enzima F3H sobre naringenina para dar lugar a aromadendrina.	8
Figura 6. A) Estructura de un sistema CYP asociado a la membrana del retículo endoplásmico. El citocromo b5 actúa como donador de electrones favoreciendo la actividad de las CYP [Figura adaptada de Donato, 2004]. B) Reacción química catalizada por el enzima F3'H sobre naringenina para dar lugar a eriodictiol.	9
Figura 7. Reacciones de diversificación de los flavonoides catalizadas por enzimas oxigenasas tomando la flavanona naringenina como punto de partida. En verde las reacciones catalizadas por oxigenasas 2-OGD; en azul las reacciones catalizadas por oxigenasas CYP. Las modificaciones en las moléculas tras la acción de cada enzima se muestran en rojo.....	10
Figura 8. Factores desencadenantes de desequilibrios inflamatorios en el organismo y sus vías de actuación (rojo). Efectos terapéuticos y de prevención de enfermedades de los flavonoides (verde). Influencia recíproca entre los flavonoides y la microbiota intestinal, y su relación con efectos antiinflamatorios (azul) [Figura elaborada con BioRender].	13
Figura 9. Ruta biosintética de producción de naringenina a partir de L-tirosina por el uso de un enzima PAL con actividad TAL. Las flechas continuas muestran la ruta biosintética de flavanonas en plantas. Las flechas discontinuas representan la ruta biosintética esperada en la <i>E. coli</i> portadora del grupo de genes artificiales que incluyen PAL (actividad TAL), 4CL, CHS y CHI [Figura adaptada de Hwang et al., 2003].	18
Figura 10. Representación esquemática del ciclo de vida de actinomicetos esporulantes [Figura adaptada de Barka et al., 2016].	21
Figura 11. A) Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp. actualizado. B) Ciclo de desarrollo de <i>Streptomyces</i> spp. a lo largo del eje transversal de una placa de cultivo. A la derecha (negro) se muestra la nomenclatura tradicional de micelio aéreo y sustrato; a la izquierda (rojo) la nueva nomenclatura de las etapas MI y MII [Figura adaptada de Yagüe et al., 2013 y Yagüe et al., 2016].	22

Figura 12. Fechas del descubrimiento de los últimos antibióticos derivados de microorganismos. Gran cantidad de ellos están producidos por el género <i>Streptomyces</i> [Fuente: de-Lima-Procópio et al., 2012].	23
Figura 13. A) Esquema de los módulos intercambiables de los que consta la arquitectura SEVA, delimitados por sitios de restricción únicos. Ab ^R , resistencia antibiótica; T1 y T0, terminadores [Figura adaptada de Martínez-García et al., 2023]. B) Estructura trimodular de vectores bifuncionales adaptados a la arquitectura SEVA, mostrando los módulos correspondientes a: orígenes de replicación (Ori-1 y Ori-2 para cada uno de los dos tipos de microorganismos), resistencia antibiótica, y cargo para la inserción de los genes de interés [Figura adaptada de García-Gutierrez et al., 2020].	32
Figura 14. Comparación de las diferentes técnicas disponibles para el ensamblaje de fragmentos de ADN en vectores de clonación: A) Digestión con enzimas de restricción tipo II, B) Ensamblaje de tipo Gibson y C) Clonación de tipo Golden Gate [Figura elaborada con BioRender].	33
Figura 15. Representación del ensamblaje Golden Standard y los sitios de fusión para cada nivel y posición. Este ensamblaje abarca las partes genéticas básicas (niveles 0), que se ensamblan para generar unidades de transcripción (niveles 1), que a su vez pueden ensamblarse en circuitos genéticos más complejos (niveles 2). FS, sitios de fusión [Figura adaptada de Blázquez et al., 2023].	35
Figura 16. Representación del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 de <i>S. pyogenes</i> [Figura elaborada con Biorender].	36
Figura 17. Comparativa de las diferentes versiones de la endonucleasa Cas9: A) Cas9 nativa, B) Cas9 inactiva, portadora de las mutaciones D10A y H840A en los dominios catalíticos RuvC1 y HNH, respectivamente y C) Cas9 nicasa, portadora de la mutación D10A en el dominio catalítico RuvC1 [Figura elaborada con BioRender].	38
Figura 18. Biosíntesis de malonil-CoA. El malonil-CoA endógeno es sintetizado desde acetyl-CoA por la ACCasa. La expresión de los genes <i>matB/C</i> da lugar al transporte de malonato a la célula y la consiguiente formación de malonil-CoA. El acetyl-CoA es sintetizado por el complejo PDH desde piruvato y por la ACS desde acetato en <i>S. cerevisiae</i> . Además de las anteriores, en <i>E. coli</i> se usa la ruta ACK-Pta desde acetato. PanK cataliza la fosforilación del pantotenato a 4-fosfopantotenato, un precursor del CoA. Las flechas rojas representan las dos reacciones enzimáticas clave para el incremento directo en el malonil-CoA intracelular. Las flechas azules indican rutas de consumo de acetyl-CoA y malonil-CoA en la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos. La cerulenina inhibe la síntesis de ácidos grasos, tal como indica la línea gris discontinua. ACCasa, acetyl-CoA-carboxilasa; MatC, proteína transportadora de malonato al interior celular; MatB, malonil-CoA-sintetasa; PDH, piruvato-deshidrogenasa; ACS, acetyl-CoA-sintetasa; ACK, acetato-quinasa; Pta, fosfato-acetiltransferasa; PanK, pantotenato-quinasa [Figura adaptada de Isogai et al., 2022].	42

Figura 19. Representación del genoma de *S. albidoflavus* J1074 con la localización de las deleciones/sustituciones realizadas (cruces rojas), y el nombre de la cepa a la que dieron lugar, así como la localización de los sitios de integración Φ C31 y Φ BT1. La numeración hace referencia a la localización de los BGCs predichos por antiSMASH en el genoma. El círculo verde en el centro del genoma corresponde al origen de replicación. 138

Figura 20. A) Representación de las rutas biosintéticas de las flavanonas, flavanonoles y auronoles generados en este trabajo, así como de las cepas en las que se integraron los genes correspondientes a los enzimas implicados en dichas rutas. La flecha verde hace referencia a la cepa *S. albidoflavus* WT-ERI creada por integración del enzima F3'H/CPR en la cepa *S. albidoflavus* WT-NAR. Las flechas azules indican los diferentes enzimas integrados en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR para dar lugar a las cepas *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO, UO-FLAV-004-PcTAX y UO-FLAV-004-ALPH. La línea discontinua hace referencia a la actividad secundaria F2H del enzima F3H sobre naringenina y eriodictiol. Las flechas negras señalan la suplementación con flavanonoles a la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI. En rojo se muestran los niveles de producción obtenidos en cada caso, y entre paréntesis debajo de la figura de cada molécula se indica la masa de cada compuesto. **B)** Esquema del ensamblaje y lugar de integración de los enzimas de las rutas de biosíntesis de cada compuesto generado, en el genoma de *S. albidoflavus* J1074. 140

Figura 21. Representación de los flujos de actividad enzimática estudiados en *S. albidoflavus* J1074 para la producción de los flavanonoles aromadendrina y taxifolina, y para la biosíntesis *de novo* del auronol alfitonina. En rojo se muestran los niveles de producción de aromadendrina y taxifolina obtenidos tras el ensayo de las diferentes variantes del enzima F3H, así como el rendimiento de alfitonina logrado tras el co-cultivo. En gris se representan las vías de biosíntesis menos favorecidas y en verde la más favorecida. La línea naranja indica la cepa productora de taxifolina elegida para el co-cultivo con la cepa de *E. coli* portadora del enzima *ErCHI*. La línea discontinua hace referencia a la actividad secundaria F2H del enzima F3H sobre naringenina y eriodictiol. 148

Figura 22. Representación del tránsito de los flavonoides por el organismo tras su administración intraperitoneal [Figura elaborada con BioRender]..... 150

II. LISTA DE ABREVIATURAS

2-OGD	dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato
4CL	4-cumarato-CoA-ligasa
ACCasa	acetil-CoA-carboxilasa
ACS	acetil-CoA-sintetasa
ADH	arogenato-deshidratasa
ANS/LDOX	antocianidina-sintasa/leucoantocianidina-dioxigenasa
antiSMASH	antibiotics and Secondary Metabolites Analysis SHell
ARNcr	ARN CRISPR
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNsg	guía de ARN sintético
ARNt	ARN de transferencia
ARNtracr	ARN CRISPR transactivante
BGC	agrupamientos génicos biosintéticos
C4H	cinamato-4-hidroxilasa
CDS	secuencia codificante
CHI	chalcona-isomerasa
CHS	chalcona-sintasa
CoA	coenzima A
COX-2	ciclooxigenasa-2
CPR	NADPH-citocromo-P ₄₅₀ -reductasa
CRISPR/Cas9	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas/proteína 9 asociada a CRISPR
CRISPRi	CRISPR de interferencia
CYP	citocromo-P ₄₅₀ -hidroxilasa
DAI	índice de actividad de enfermedad
dCas9	Cas9 inactiva
E4P	eritrosa-4-fosfato
ECV	enfermedad cardiovascular
ERβ	receptor beta de estrógenos
F3'5'H	flavonoide-3',5'-hidroxilasa
F3H	flavanona-3-hidroxilasa
F3'H	flavonoide-3'-hidroxilasa
FAD	flavina adenina dinucleótido
Fe²⁺	hierro ferroso

Fe³⁺	hierro férrico
FLS	flavonol-sintasa
FMN	flavina mononucleótido
FNSI	flavona-sintasa I
FNSII	flavona-sintasa II
G/C	guanina/citosina
GG	Golden Gate
GS	Golden Standard
GT	glicosiltransferasa
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HDR	reparación homóloga dirigida
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HRT	marco de reparación homólogo
IFS	isoflavona-sintasa
IL	interleucina
kb	kilobase
LOX	lipooxigenasa
Mb	megabase
MoClo	Clonación Modular
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NRPS	sintetasa de péptidos no ribosomales
nt	nucleótido
OMT	O-metiltransferasa
oriT	origen de transferencia
PAL	fenilalanina-amonioliasa
PAM	motivo adyacente protoespaciador
PanK	pantotenato-quinasa
PBS	tampón fosfato salino
PEP	ácido fosfoenolpirúvico
PhAT	prefenato-aminotransferasa
PKS	policetónido-sintasa
R/M	restricción/modificación
RBS	secuencia de unión al ribosoma
RNS	especies reactivas del nitrógeno
ROS	especies reactivas del oxígeno

SD	secuencia de Shine Dalgarno
SEVA	Standard European Vector Architecture
SpCas9	nucleasa Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>
TAL	tirosina-amonioliasa
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
UNS	secuencias de nucleótidos únicas
UT	unidad transcripcional
UV	ultravioleta



Universidad de Oviedo

III. RESUMEN DEL CONTENIDO DE LA TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Ingeniería genómica en <i>Streptomyces albidoflavus</i> J1074 para la producción de flavonoides de interés farmacológico.	Inglés: Genomic engineering in <i>Streptomyces albidoflavus</i> J1074 for the production of flavonoids of pharmaceutical interest

2.- Autor	
Nombre: Patricia Magadán Corpas	
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado. Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Los flavonoides constituyen una amplia familia de compuestos polifenólicos derivados de plantas y reconocidos por sus múltiples aplicaciones terapéuticas en humanos. El aprovechamiento de su potencial por extracción directa desde fuentes vegetales es un proceso que a día de hoy resulta ineficiente. En cambio, la producción heteróloga de flavonoides en factorías microbianas ha emergido en los últimos años como un enfoque prometedor, presentándose como una estrategia valiosa por su sencillez, rapidez y viabilidad económica.

En este contexto, el género *Streptomyces* ha sido caracterizado como un hospedador óptimo para la expresión heteróloga de diversos metabolitos secundarios bioactivos, como los flavonoides, destacando por sus sistemas de secreción y su habilidad para producir una amplia gama de precursores, gracias a su capacidad intrínseca de expresión de agrupamientos génicos biosintéticos. Más en concreto, la especie *Streptomyces albidoflavus* J1074 demuestra propiedades adicionales de cara a su manipulación en laboratorio como hospedador heterólogo, incluyendo la ausencia del sistema *SalI* de restricción/modificación, su reducido genoma, o sus características de crecimiento. Sin embargo, hasta el momento, los rendimientos de producción heteróloga en este género se han mantenido notablemente bajos, presumiblemente debido a la disponibilidad limitada de precursores y cofactores, estos destinados a la biosíntesis de compuestos nativos, y/o a la falta de optimización a nivel enzimático y de ruta de los genes heterológamente expresados. Además, la falta de estandarización de las herramientas de ingeniería genética de uso en este género ha ralentizado los avances en este campo.

Las hidroxilaciones representan las modificaciones más frecuentes en la diversificación de los flavonoides, mejorando significativamente sus propiedades como compuestos antioxidantes y antiinflamatorios. El análisis del potencial antiinflamatorio de los flavonoides adquiere una especial relevancia considerando la significativa participación del proceso inflamatorio crónico en el desarrollo y avance de diversas enfermedades. Además, en los últimos tiempos, las investigaciones relacionadas con la interacción entre el microbioma y las enfermedades inflamatorias han experimentado un notable crecimiento, dado el papel crucial de la microbiota intestinal en la regulación del sistema inmunitario y su interconexión con multitud de órganos del cuerpo humano.



Universidad de Oviedo

En el presente estudio se ha investigado la capacidad de la especie bacteriana *S. albidoflavus* J1074 como hospedador heterólogo para la expresión de rutas biosintéticas de producción de varios tipos de flavonoides hidroxilados, evaluando a su vez la eficacia de diversas estrategias de optimización de la producción. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de una librería de vectores que permiten la estandarización en el ensamblaje *in vitro* para la edición genómica del hospedador y la expresión génica de rutas metabólicas de biosíntesis de estos compuestos, con aplicaciones potencialmente extensibles a otros actinomicetos. Adicionalmente, con el fin de estudiar el potencial antiinflamatorio y modulador de la microbiota intestinal de varios flavonoides, se ha realizado un estudio *in vivo* empleando un modelo murino de colitis ulcerosa, considerando la relevancia de esta patología dentro del espectro de enfermedades inflamatorias intestinales.

RESUMEN (en inglés)

Flavonoids comprise a broad family of plant-derived polyphenolic compounds recognized for their diverse therapeutic applications in humans. However, the direct extraction of these compounds from plant sources is currently rather inefficient. Conversely, heterologous production of flavonoids in microbial cell factories has emerged in recent years as a promising approach, offering a valuable strategy due to its simplicity, speed, and economic feasibility.

In this context, the genus *Streptomyces* has been identified as an optimal host for the heterologous production of diverse bioactive secondary metabolites, including flavonoids. This is primarily attributed to its secretion systems and its capacity to generate a broad spectrum of precursors. Such capabilities are facilitated by its innate proficiency in expressing biosynthetic gene clusters. Specifically, the species *Streptomyces albidoflavus* J1074 demonstrates additional advantageous properties for laboratory manipulation as a heterologous host, including the absence of the *SalI* restriction/modification system, its reduced genome, and favorable growth characteristics. However, to date, the yields from heterologous production in this genus have remained notably low, likely due to the restricted availability of precursors and cofactors, which are primarily channeled towards the biosynthesis of native compounds. This could also be attributed to insufficient optimization at the enzymatic level and pathway engineering of heterologously expressed genes. Moreover, the lack of standardization of genetic engineering tools for gene expression and genomic editing in this genus has slowed progress in this field.

Hydroxylations represent the most frequent modifications in the diversification of flavonoids, significantly enhancing their properties as antioxidant and anti-inflammatory compounds. The analysis of the anti-inflammatory potential of flavonoids gains particular importance considering the significant role of chronic inflammation in the development and progression of various diseases. Moreover, recent investigations into the interaction between the microbiome and inflammatory diseases have experienced considerable expansion, given the crucial role of the intestinal microbiota in regulating the immune system and its interconnection with numerous organs in the human body.

The current study has investigated the capacity of the bacterial species *S. albidoflavus* J1074 as a heterologous host for the expression of biosynthetic pathways producing various types of hydroxylated flavonoids, while simultaneously evaluating the efficacy of various production optimization strategies. This was facilitated by the development of a vector library that standardizes *in vitro* assembly for genomic editing of the host and the gene expression of metabolic pathways for these compounds, with potential applications extendable to other actinomycetes. Additionally, and in order to study the anti-inflammatory potential and microbiota-modulating effects of various flavonoids, an *in vivo* study



Universidad de Oviedo

was conducted using a murine model of ulcerative colitis, given the relevance of this pathology within the spectrum of inflammatory bowel diseases.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

INTRODUCCIÓN

1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos fitoquímicos que constituyen la subclase de polifenoles más grande y estudiada en los vegetales, con más de 10.000 moléculas diferentes (Liu et al., 2021). Son compuestos de bajo peso molecular procedentes del metabolismo secundario de los vegetales y se encuentran almacenados en las vacuolas de las células (Shen et al., 2022). Se distribuyen de manera ubicua en plantas vasculares, incluidas las angiospermas, gimnospermas y pteridófitas, en las que se encuentran en flores, hojas, frutos y raíces. En las plantas, los flavonoides se encuentran en estado libre (aglicones) o, más frecuentemente, unidos a azúcares (heterósidos).

1.1. Biosíntesis en plantas

Los flavonoides se originan mediante una ruta biosintética mixta, a través de la ruta metabólica del shikimato, la vía fenilpropanoide y la ruta de los flavonoides (**Figura 1**).

A partir de dos precursores metabólicos primarios, el ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (E4P), la ruta del shikimato engloba 7 pasos enzimáticos hasta llegar al corismato, producto final de esta vía. El corismato es posteriormente convertido en prefenato, precursor de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina. El prefenato da lugar a la L-fenilalanina por acción de los enzimas prefenato-aminotransferasa (PhAT) y arogenato-deshidratasa (ADH).

La ruta fenilpropanoide parte del aminoácido L-fenilalanina, el cual, a través de la acción del enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL), es desaminado para formar ácido cinámico. Posteriormente, el enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H), una monooxigenasa citocromo P₄₅₀, cataliza la hidroxilación del ácido cinámico en ácido *p*-cumárico, que se transforma en cumaroil-CoA por adición de una unidad de coenzima A (CoA) a través del enzima 4-cumarato-CoA-ligasa (4CL). El cumaroil-CoA juega un papel fundamental en la biosíntesis de flavonoides por la vía de los fenilpropanoides, ya que produce el esqueleto de cumarina con el que da comienzo la vía de los flavonoides. El enzima chalcona-sintasa (CHS) es el encargado de catalizar la reacción de condensación entre el cumaroil-CoA y 3 moléculas de malonil-CoA (derivado del acetil-CoA por acción del enzima acetil-CoA-carboxilasa o ACCasa), lo cual da lugar a los anillos fenilo A y B de la columna vertebral de la estructura de los flavonoides, y forma la chalcona de naringenina. A continuación, el enzima chalcona-isomerasa (CHI) cierra el anillo C de la estructura básica, dando como resultado la formación de naringenina (Tariq et al., 2023). Esta reacción también puede ocurrir por isomerización espontánea (Hwang et al., 2003). Tanto la chalcona de naringenina como la naringenina constituyen compuestos centrales en la biosíntesis de flavonoides, al ser precursores comunes de multitud de estos compuestos (Liga et al., 2023; Liu et al., 2021).

Introducción

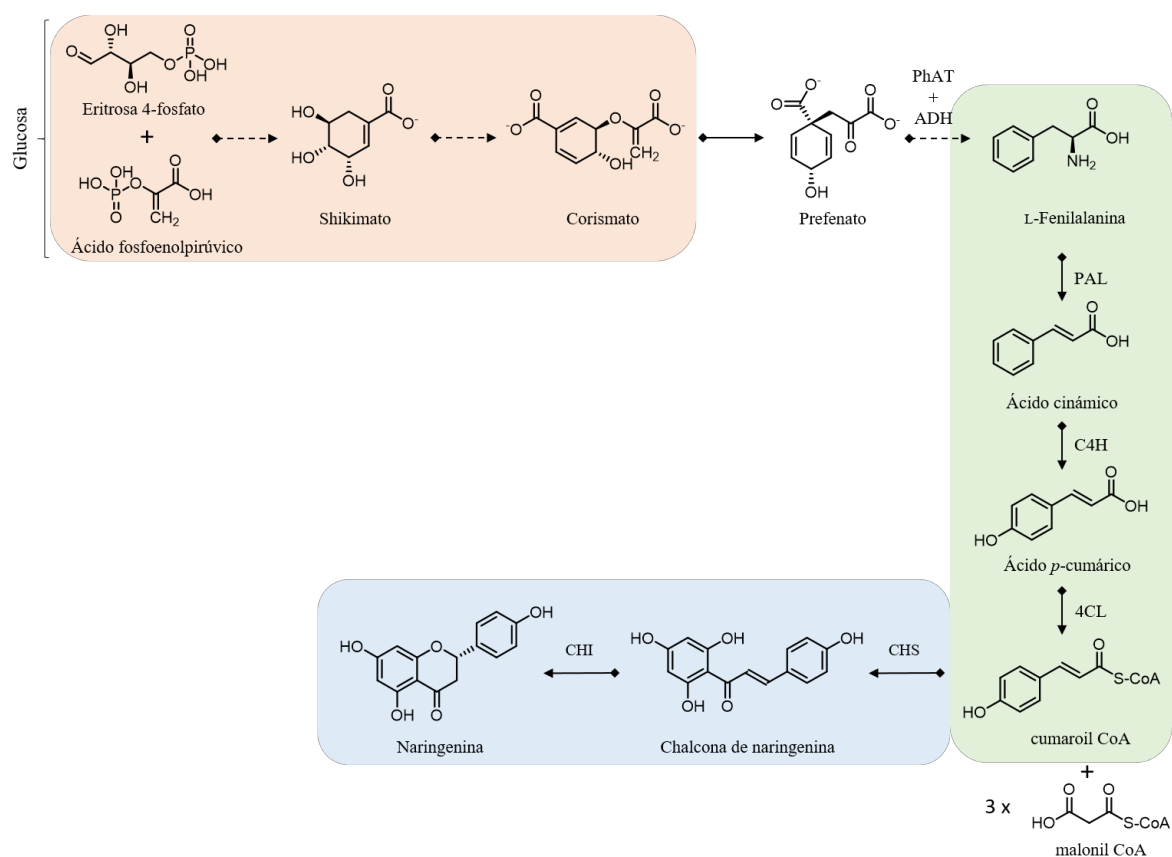


Figura 1. Ruta de biosíntesis mixta de los flavonoides en las plantas. Ruta del shikimato (rojo); ruta de los fenilpropanoides (verde); ruta de los flavonoides (azul). Las flechas discontinuas indican la ausencia de representación de pasos intermedios.

1.2. Diversidad estructural

Los flavonoides son compuestos fenólicos cuya estructura química básica es del tipo C6-C3-C6 (difencilpirano), con 2 anillos aromáticos (bencénicos), anillos A y B, unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno (anillo heterocíclico pirano), anillo C (**Figura 2**).

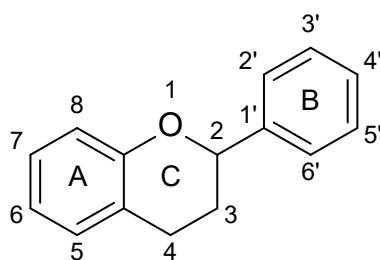


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides se agrupan a su vez en subclases dependiendo de modificaciones en el anillo C que incluyen el grado de saturación, su conformación con respecto al anillo B y su grado de oxidación. Por tanto, atendiendo a su estructura podemos diferenciar 6 subclases de flavonoides: isoflavonas, flavanonas, flavonas, flavonoles, antocianidinas, y flavan-3-oles o flavanoles (Shen et al., 2022) (**Figura 3**).

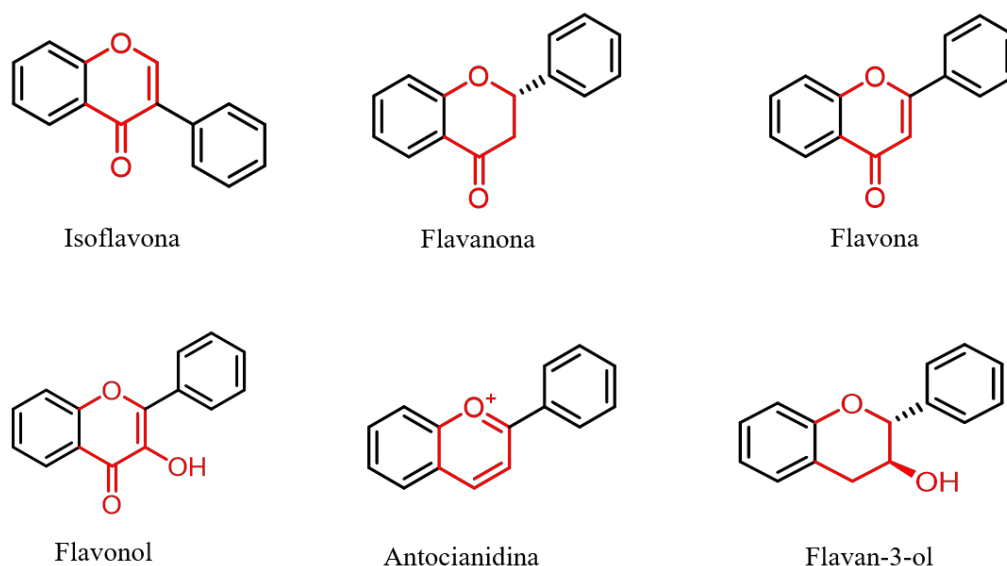


Figura 3. Diversidad estructural de flavonoides en base a modificaciones en el anillo C (rojo).

Además, el patrón de sustitución de los anillos A y B da lugar a la gran diversidad de moléculas existente dentro de cada una de estas subclases de flavonoides. Generalmente estas sustituciones son hidroxilaciones, metoxilaciones, acilaciones, O-glicosilaciones (de los grupos hidroxilos) o C-glicosilaciones (directamente en átomos de carbono del esqueleto básico de los flavonoides) catalizadas por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OGD), O-metiltransferasas (OMT), serina-carboxipeptidasas y glicosiltransferasas (GT), respectivamente. También las monooxigenasas citocromo-P₄₅₀, conocidas como citocromo-P₄₅₀-hidroxilasas (CYP), y las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, juegan un papel importante en la modificación y derivatización de la estructura básica de los flavonoides (Wang et al., 2021).

Más en detalle, las isoflavonas poseen, como principal variación de la estructura básica de los flavonoides, el anillo B unido a la posición C3, en lugar de a la C2 del anillo C, fruto de una reorganización llevada a cabo por una CYP. Las isoflavonas se encuentran frecuentemente acumuladas en plantas leguminosas, de entre las cuales, la soja y los productos derivados de ella, constituyen la mayor fuente de estos compuestos (Shen et al., 2022). Entre las isoflavonas más abundantes se encuentran la genisteína y la daidzeína.

Las flavanonas difieren de otros flavonoides en dos características asociadas al anillo C del esqueleto básico de los flavonoides, la ausencia de sustitución alguna en C3 y la oxidación en C4 (Hostetler et al., 2017). Se encuentran comúnmente en las especies del género *Citrus*, en las cuales esta subclase de flavonoides es la predominante. Los principales aglicones son la naringenina, el eriodictiol y la hesperetina (Zuiter, 2014).

Por su parte, las flavonas son sintetizadas a partir de las flavanonas por la introducción de un doble enlace entre las posiciones C2 y C3. Las flavonas se caracterizan además por su alto grado de diversidad química debida a modificaciones de su esqueleto (Jiang et al., 2016). En los alimentos las mayores concentraciones

de estos compuestos se encuentran en la manzanilla, el perejil, el té, la menta, el apio o la zanahoria. Los zumos de la familia de los cítricos tienen también concentraciones apreciables de flavonas (Hostetler et al., 2017). Las principales flavonas constituyentes de alimentos son la apigenina y la luteolina.

En cuanto a los flavanoles, estructuralmente tienen la característica añadida con respecto a las flavonas de poseer un grupo hidroxilo en posición C3. Estos compuestos son especialmente abundantes en el brócoli, las manzanas, las uvas, los tomates, la cebolla o el té verde. Ejemplos de moléculas pertenecientes a esta subclase son la quercetina, la miricetina o el kaempferol.

Las antocianidinas, a diferencia de otros flavonoides, poseen una carga positiva en el átomo de oxígeno del anillo C de la estructura básica de los flavonoides. Son compuestos inestables y, por tanto, no se acumulan como tales sino en su forma glicosilada, en cuyo caso se denominan antocianinas. Son compuestos de muy baja toxicidad, responsables de dar color a una amplia variedad de frutas, flores y vegetales, proporcionando tonos que van desde el rojo, púrpura y azul, hasta el negro en algunos casos. Debido a su baja toxicidad se fabrican comercialmente colorantes basados en antocianinas para su uso en alimentos (Wrolstad, 2004). Algunas fuentes comunes de antocianinas incluyen frutas como las uvas, las bayas (arándanos, fresas, frambuesas, etc.), las cerezas y las ciruelas, así como también vegetales como la berenjena y algunas variedades de repollo morado, como la lombarda. Hasta la fecha se han identificado en plantas más de 650 antocianidinas. Entre ellas, las más abundantes son: cianidina, delphinidina y pelargonidina (Shen et al., 2022).

Por último, la ausencia del grupo carbonilo en el C4 del anillo C diferencia a los flavan-3-oles, o flavanoles, de la mayoría de las otras subclases de flavonoides, caracterizándose estos además por la presencia de un grupo hidroxilo unido al C3 del anillo C. Como resultado, tienen dos carbonos quirales (C2 y C3) y, por tanto, 4 posibles diastereoisómeros ((+)-catequina (2R,3S), (-)-catequina (2S,3R), (+)-epicatequina (2S,3S) y (-)-epicatequina (2R,3R)). Entre los flavan-3-oles existen también sus derivados por unión de un grupo galato (galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato). Por otro lado, los flavan-3-oles son monómeros que, por condensación, pueden formar oligómeros o polímeros, dando lugar a las proantocianidinas o a los taninos (Aron y Kennedy, 2008; Shen et al., 2022). Los flavan-3-oles son abundantes en varias frutas, incluidas manzanas, cerezas, ciruelas y, especialmente, en pieles de frutas. Constituyen los pigmentos predominantes del vino, el té y el chocolate.

Además de estas 6 subclases principales de flavonoides (**Figura 3**), existen otras más minoritarias en la naturaleza (Boucherle et al., 2017) (**Figura 4**) como las chalconas, que son típicamente precursores de otros flavonoides y tienen el anillo C en forma de cadena abierta (Shen et al., 2022); los flavanonoles, derivados de las flavanonas e hidroxilados en C3, como la aromadendrina o la taxifolina; o las auronas, isómeros estructurales de las flavonas con un núcleo de 6:5 benzofuranona, en lugar de 6:6 cromona, y un grupo fenilo unido por un doble enlace exocíclico carbono-carbono (Boucherle et al., 2017). Los flavanonoles son considerados importantes metabolitos intermediarios y elementos clave como punto de ramificación en la ruta de biosíntesis de flavonoides (Liu et al., 2021). Las auronas, debido a su baja representación en la naturaleza, ya que solo están presentes en unas pocas especies de plantas como los

girasoles o la boca de dragón (Liu et al., 2021), han sido dejadas de lado a nivel de la investigación con respecto al resto de flavonoides. Sin embargo, en los últimos tiempos están empezando a ganar atención por sus propiedades biológicas (Mazziotti et al., 2021).

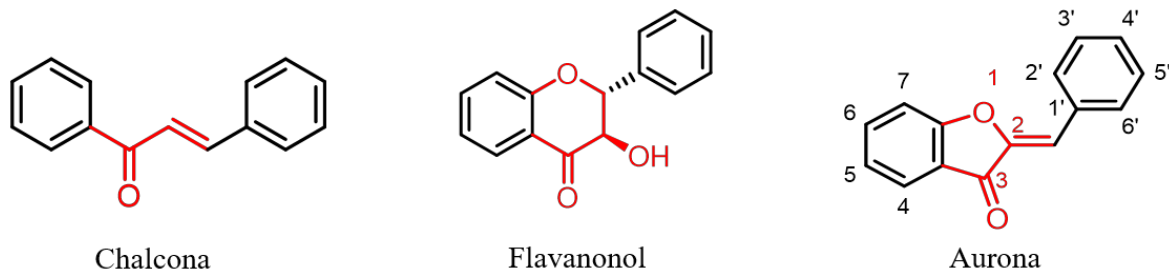
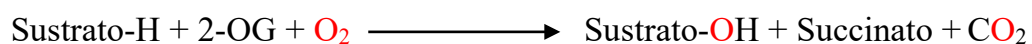


Figura 4. Subclases minoritarias de flavonoides.

1.2.1. Oxigenasas de flavonoides

Las hidroxilaciones son el proceso de modificación más frecuente utilizado en la diversificación de los flavonoides (Tariq et al., 2023). Estas modificaciones aumentan la solubilidad y estabilidad metabólica de los flavonoides, mejorando significativamente sus propiedades biológicas (Chu et al., 2016; Lv et al., 2019). Las hidroxilaciones están catalizadas por dos tipos de enzimas, las CYP y las 2-OGD. Éstas son dos clases diferentes de oxigenasas que catalizan diferentes reacciones de oxidación en el metabolismo de las plantas. Las CYP son un tipo de proteínas que presentan un grupo hemo y generalmente se encuentran ancladas a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico de las células vegetales; mientras que las 2-OGD son proteínas solubles que no contienen hierro hemo y se localizan en el citosol (Wang et al., 2021).

La superfamilia de las 2-OGD es una de las familias más grandes de proteínas en las plantas, catalizadoras de reacciones de oxidación tanto en el metabolismo primario (reparación de ADN, desmetilación de histonas y modificaciones post-traduccionales) como en el secundario (flavonoides, alcaloides, glucosinolatos, cumarinas y una gran variedad de hormonas vegetales) (Farrow y Facchini, 2014; Martínez y Hausinger, 2015; Tarhonskaya et al., 2014). Las 2-OGD requieren 2-oxoglutarato (2-OG) y oxígeno molecular (O_2) como co-sustratos, y hierro ferroso (Fe^{2+}) como cofactor. Durante la reacción de oxidación se forma el producto oxidado, junto con la descarboxilación concomitante del 2-oxoglutarato, produciendo succinato y dióxido de carbono (CO_2):



Cuatro enzimas 2-OGD participan en la ruta de diversificación de los flavonoides, catalizando reacciones de oxidación que incluyen, no solo hidroxilaciones, sino también desaturaciones, dando lugar a varias de las subclases de flavonoides mencionadas anteriormente. Estas enzimas son: flavona-sintasa I (FNSI), flavanona-3-hidroxilasa (F3H), flavanol-sintasa (FLS) y antocianidina-sintasa (ANS)/leucoantocianidina-dioxigenasa (LDOX). Las FNSI catalizan la oxidación de flavanonas para dar

Introducción

lugar a flavonas. Las flavanonas también pueden ser hidroxiladas en el C3 del anillo C por las F3H para formar los flavanonoles. Las FLS son responsables de la biosíntesis de flavonoles utilizando flavanonoles como sustrato. Mientras que las ANS/LDOX oxidan leucoantocianidinas para dar lugar a monómeros de antocianidinas (Wang et al., 2021).

Un ejemplo en detalle de una de las reacciones de hidroxilación catalizadas por este tipo de enzimas en la ruta de diversificación de los flavonoides lo encontramos en la conversión de naringenina (flavanona) en aromadendrina (flavanonol) por parte del enzima F3H (**Figura 5**).

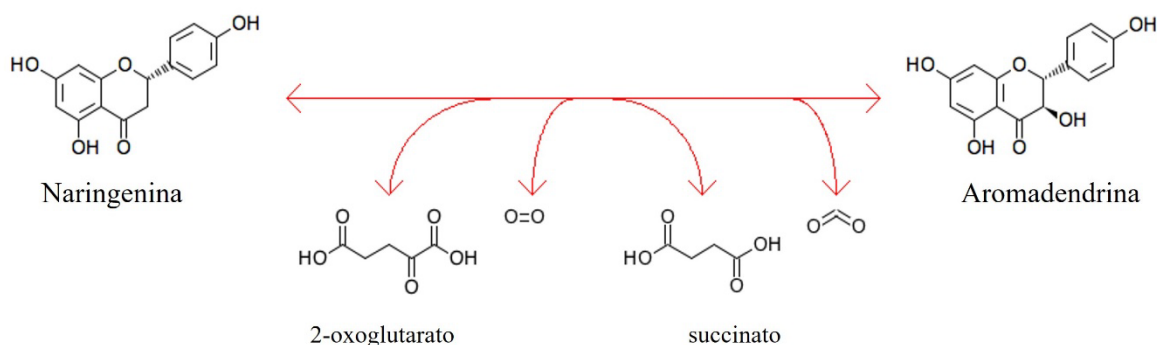
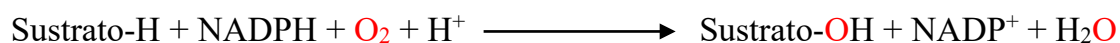


Figura 5. Reacción química catalizada por el enzima F3H sobre naringenina para dar lugar a aromadendrina.

Por su parte, las CYP pertenecen a la clase de enzimas oxidorreductasas, las cuales catalizan procesos de oxidación/reducción. La mayoría actúan como monooxigenasas, hemoproteínas con un átomo de hierro férrico (Fe^{3+}) en su centro activo al cual se une el sustrato. En plantas, se caracterizan por utilizar el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para reducir el oxígeno molecular hasta agua, a la vez que incorpora el otro átomo de oxígeno al sustrato (González-Mendoza, 2009):

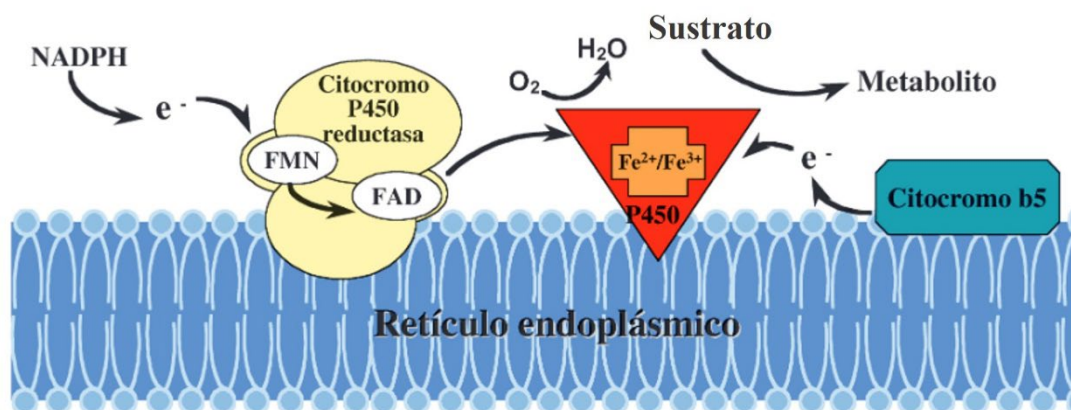


En la ruta de biosíntesis de flavonoides, la diversificación asociada al patrón de hidroxilación del anillo B viene determinado por dos tipos de CYP: la flavonoide-3'-hidroxilasa (F3'H) y la flavonoide-3',5'-hidroxilasa (F3'5'H).

Las CYP más abundantes en eucariotas requieren además de la presencia de una NADPH-citocromo- P_{450} -reductasa (CPR) que contiene las flavoproteínas flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN) como coenzimas para la transferencia de electrones. Las CYP y las CPR no están asociadas, encontrándose ambas ancladas de forma independiente a la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico en la célula vegetal (Donato, 2004) (**Figura 6A**).

Un ejemplo en detalle de este tipo de reacción en la ruta de los flavonoides lo encontramos en la conversión de naringenina (flavanona) en eriodictiol (flavanona) por hidroxilación del C3' del anillo B por parte del enzima F3'H (**Figura 6B**).

A



B

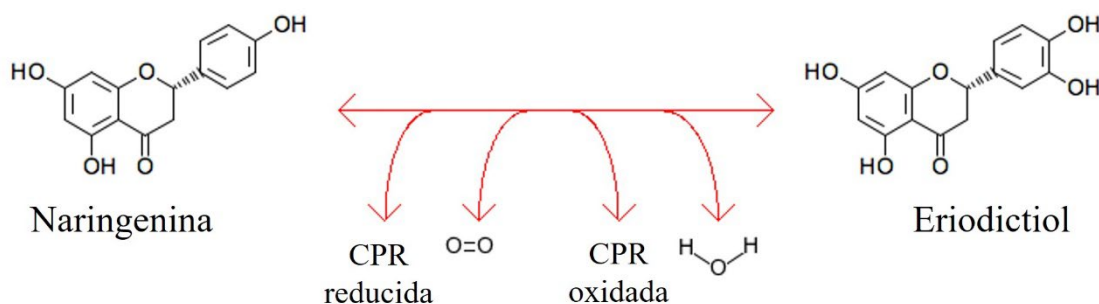


Figura 6. A) Estructura de un sistema CYP asociado a la membrana del retículo endoplásmico. El citocromo b5 actúa como donador de electrones favoreciendo la actividad de las CYP [Figura adaptada de Donato, 2004]. B) Reacción química catalizada por el enzima F3'H sobre naringenina para dar lugar a eriodictiol.

Otras CYP implicadas en la diversificación de flavonoides y catalizadoras de reacciones diferentes a las hidroxilaciones son la flavona-sintasa II (FNSII) y la isoflavona-sintasa (IFS). La FNSII cataliza la oxidación de flavanonas para dar lugar a flavonas; por su parte, la IFS cataliza la formación de isoflavonas a partir de flavanonas, por migración del anillo aromático del C2 al C3 del anillo C (Falcone Ferreyra et al., 2012).

En la **Figura 7** se muestran algunos ejemplos de la importancia de las reacciones catalizadas por estos dos tipos de oxigenasas en la diversificación de los flavonoides.

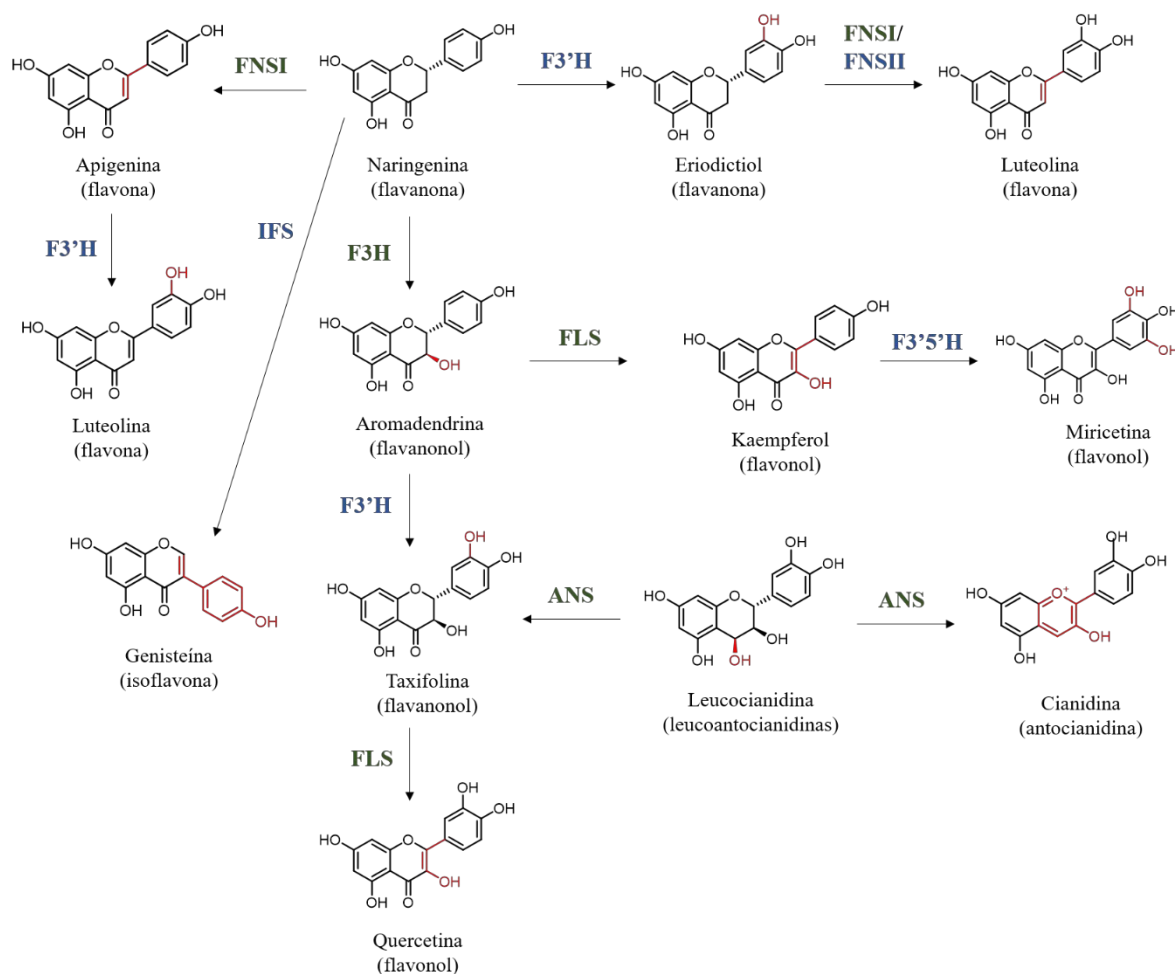


Figura 7. Reacciones de diversificación de los flavonoides catalizadas por enzimas oxigenasas tomando la flavanona naringenina como punto de partida. En verde las reacciones catalizadas por oxigenasas 2-OGD; en azul las reacciones catalizadas por oxigenasas CYP. Las modificaciones en las moléculas tras la acción de cada enzima se muestran en rojo.

1.3. Funciones biológicas

Las modificaciones que dan lugar a la gran diversificación de flavonoides son las que han permitido la adaptación de las plantas a los ambientes terrestres adversos. Los flavonoides están directamente implicados en el control del desarrollo de las plantas, así como en sus interacciones con factores tanto bióticos (relaciones con animales, plantas, microorganismos, hongos) como abióticos (temperatura, precipitaciones, luz ultravioleta (UV), etc.).

En cuanto a su participación en el desarrollo vegetal, gracias a su variada pigmentación, actúan como moléculas señalizadoras, atrayendo insectos con el fin de facilitar la polinización y la dispersión de las semillas (Wrolstad, 2004). También participan de forma directa en la germinación de las semillas (Zhang et al., 2022), así como en el metabolismo y el transporte de auxinas, las cuales son hormonas que intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (Liu et al., 2021).

El estrés abiótico que las plantas soportan tiene que ver con el daño a la capa de ozono a consecuencia de las crecientes concentraciones de gases clorofluorocarbonados emitidas. Esto ha llevado a un aumento en

la radiación UV, con el consiguiente incremento de los daños por estrés oxidativo en los tejidos vegetales. La elevada producción y baja actividad de eliminación de los radicales libres, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son altamente reactivas debido a la presencia de electrones desemparejados, junto con un bajo secuestro de iones de metales de transición, que también pueden participar en la formación de las ROS, resultan en este estrés oxidativo (Maleki et al., 2019).

Los radicales libres tienen impacto en las membranas celulares por peroxidación lipídica, y en proteínas y ácidos nucleicos por daño oxidativo. En este sentido, una de las estrategias utilizadas por las plantas para adaptarse al estrés han sido los polifenoles, especialmente los flavonoles (Laoué et al., 2022). Se han confirmado variaciones en la composición y la concentración de flavonoides entre poblaciones de la misma especie enfrentadas a diferentes condiciones climáticas (Di-Ferdinando et al., 2014), alcanzando concentraciones máximas de estos tras la exposición a elevaciones en la temperatura, radiación UV o sequía (Chaves et al., 1997). El incremento en la producción de flavonoles en la protección frente al incremento en las ROS se ha atribuido a su capacidad antioxidante en relación a la presencia del grupo hidroxilo en posición C3 del anillo C del esqueleto básico, así como al patrón de hidroxilación del anillo B (Verdan et al., 2011). Esto se debe a que los sustituyentes hidroxilo son capaces de donar átomos de hidrógeno que estabilizan a los radicales libres, actuando tanto en la inhibición de la generación de las ROS, como en su eliminación cuando ya están formadas (Dias et al., 2021; Laoué et al., 2022). Los mecanismos a través de los cuales realizan estas funciones incluyen la quelación de iones metálicos (hierro y cobre), la inhibición de enzimas que participan en la generación de radicales libres, o la activación de otros enzimas antioxidantes capaces de eliminarlos (Laoué et al., 2022). Muchos flavonoides tienen además propiedades fotoprotectoras, al poseer la capacidad de absorber longitudes de onda en el rango de las UV-A y UV-B (Falcone Ferreyra et al., 2012; Jiang et al., 2016; Pollastri y Tattini, 2011).

En cuanto a su relación con factores bióticos, una de las funciones mejor estudiadas es la interacción entre plantas y bacterias. Las plantas leguminosas establecen simbiosis con bacterias de tipo rizobio fijadoras de nitrógeno atmosférico, visibles por la formación de nódulos en las raíces. Esta relación es altamente específica y está controlada gracias a la producción de flavonoides por parte de la planta hospedadora, los cuales se unen a reguladores transcripcionales de la bacteria controlando el proceso de nodulación (Mathesius, 2018).

Se ha estudiado también la inducción de la biosíntesis de flavonas y flavanonas (luteolina y sakuranetina) como defensa frente al ataque de organismos patógenos. Estos flavonoides funcionarían entonces como fitoalexinas en la resistencia contra la infección, al poseer actividad antimicrobiana (Jiang et al., 2016; Wang et al., 2022). Los flavonoides también participan en acciones alelopáticas contra otras plantas, interfiriendo en su crecimiento y capacidad reproductiva. Las flavonas, además, son generadas como protección frente al ataque de herbívoros, con el fin de hacer desagradable su sabor (Agrell et al., 2003), o como inhibidores del crecimiento de las larvas en relaciones de mutualismo (Gallet et al., 2007).

1.4. Potencial terapéutico de los flavonoides

La variabilidad estructural que ofrecen los flavonoides es también la responsable de la diversidad farmacológica y el potencial terapéutico de estos compuestos (Maleki et al., 2019). Existen evidencias científicas de los beneficios que los flavonoides ofrecen a la salud humana, incluyendo su efecto en la prevención de ciertas enfermedades crónicas derivado de una dieta rica en estos compuestos (Fraga et al., 2019; Jucá et al., 2020; Rodríguez-García et al., 2019).

La principal propiedad de los flavonoides tiene que ver con su capacidad antioxidante en relación con la eliminación de radicales libres, cuyos mecanismos ya han sido descritos en el apartado anterior. Sin embargo, otras muchas actividades les han sido atribuidas, incluyendo antiinflamatorias, anticancerígenas, cardioprotectoras, antimicrobianas, antivirales, etc.

Normalmente la inflamación en tejidos animales es un proceso rápido y autolimitado en respuesta a un daño físico, una exposición química, o una infección microbiana. Sin embargo, en ocasiones, el proceso inflamatorio se cronifica (Dias et al., 2021). Se considera que numerosas condiciones crónicas no infecciosas, como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares (ECV), ciertos tipos de cáncer, los trastornos digestivos, o las enfermedades autoinmunes, podrían ser inducidas o verse empeoradas como resultado de daños a tejidos y cambios genómicos inducidos por una inflamación leve, pero mantenida en el tiempo, alrededor de un tejido u órgano. Existen varias causas y factores de riesgo que contribuyen a la inflamación crónica, incluyendo la obesidad, una dieta poco saludable, la inactividad física, el estrés crónico, toxinas ambientales, etc. (Ginwala et al., 2019) **(Figura 8)**.

Estos factores contribuyen a la cronicidad de la inflamación de diversas maneras. Por ejemplo, en la obesidad, la expansión de los adipocitos conduce a una hipoxia localizada en el tejido, debido a un suministro de sangre insuficiente, que estimula la infiltración de macrófagos y otros leucocitos. Estos últimos adoptan un fenotipo pro-inflamatorio liberando citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o las interleucinas IL-6 o IL-1 β . Además, el exceso de tejido adiposo provoca una mayor liberación de ácidos grasos libres, entre ellos el ácido araquidónico, que es precursor de las prostaglandinas, potentes mediadores inflamatorios **(Figura 8)**.

El estrés crónico está asociado con la incapacidad de las células inmunitarias para responder a las señales hormonales que normalmente regulan la inflamación. Una liberación mantenida de cortisol (antiinflamatorio) desensibiliza a los linfocitos a sus efectos, lo cual lleva a una respuesta inmunitaria descontrolada. De este modo, la función de las células inmunitarias se ve alterada, aumentando la producción de mediadores y citoquinas pro-inflamatorias. Durante la respuesta inmune inflamatoria se producen también ROS, especies reactivas del nitrógeno (RNS), y diferentes proteasas que pueden provocar daño tisular, fibrosis y proliferación celular, colaborando aún más a la cronicidad de la inflamación (Maleki et al., 2019) **(Figura 8)**.

El tratamiento de la inflamación se convierte entonces en una de las potenciales estrategias para el tratamiento o la mejora de todos los desórdenes anteriormente mencionados. En este contexto, se han

descrito propiedades antiinflamatorias de los flavonoides a través de diferentes mecanismos, entre ellos, la inhibición de la actividad de enzimas reguladores y factores de transcripción relacionados con el control de mediadores implicados en el proceso inflamatorio. De este modo, los flavonoides pueden regular la actividad de las proteín-quinasas, inhibiendo la activación del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y, por tanto, bloqueando la expresión de genes pro-inflamatorios y la liberación de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular implicadas en la inflamación (Hou y Kumamoto, 2010; Peng et al., 2018) (**Figura 8**).

Los flavonoides también tienen el potencial de inhibir enzimas implicados en el metabolismo del ácido araquidónico, como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) o la lipooxigenasa (LOX), disminuyendo la liberación de mediadores inflamatorios como son las prostaglandinas, los tromboxanos o los leucotrienos (Fürst y Zündorf, 2014; González Mosquera et al., 2018; Maleki et al., 2019). Además, tienen efecto como moduladores de la actividad de las células mediante la inhibición de la activación celular, maduración, señalización y secreción, disminuyendo la proliferación y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como las IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Fürst y Zündorf, 2014; Maleki et al., 2019) (**Figura 8**).

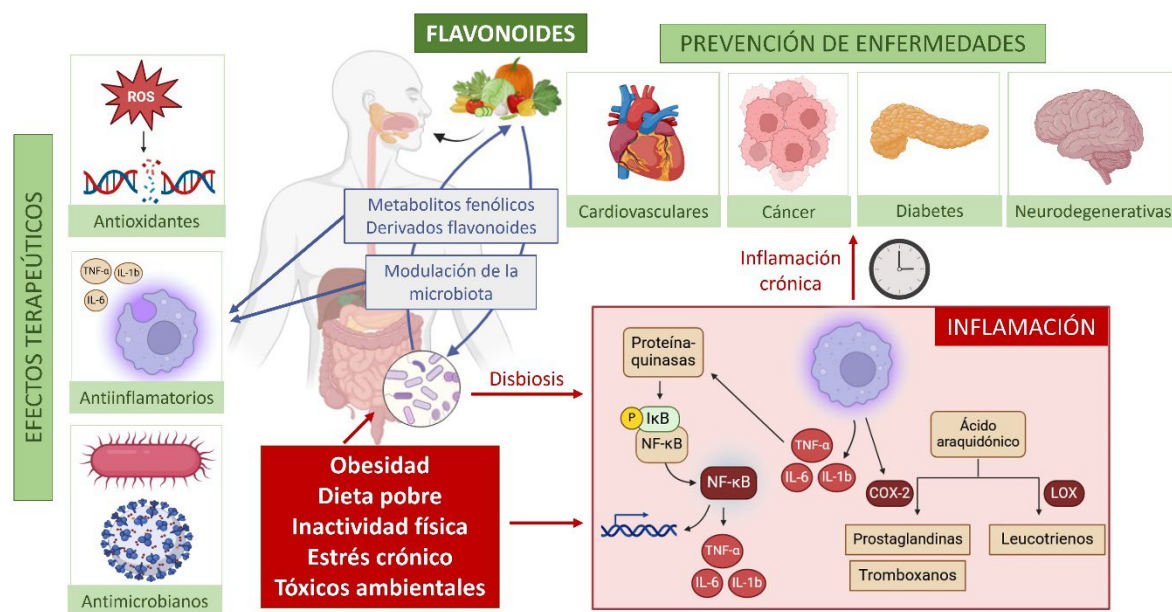


Figura 8. Factores desencadenantes de desequilibrios inflamatorios en el organismo y sus vías de actuación (rojo). Efectos terapéuticos y de prevención de enfermedades de los flavonoides (verde). Influencia recíproca entre los flavonoides y la microbiota intestinal, y su relación con efectos antiinflamatorios (azul) [Figura elaborada con BioRender].

En relación con la estructura de los flavonoides, ciertas modificaciones favorecen su actividad antiinflamatoria, como son el grado de insaturación del anillo C, la presencia del grupo carbonilo en C4, y el número y la posición de los grupos hidroxilo. En concreto, la presencia del grupo catecol (hidroxilaciones en C3' y C4') en el anillo B de los flavonoides les confiere una potente actividad antiinflamatoria, constituyendo ejemplos de flavonoides portadores de este grupo catecol la luteolina o la quercetina (Ginwala et al., 2019).

Con respecto a las ECV, la alteración vascular y la disfunción endotelial se asocian con inflamación y estrés oxidativo, lo cual tiene un efecto directo en la fisiopatología de la hipertensión o la aterosclerosis (Siti et al., 2015). La mayoría de los estudios observacionales han encontrado que el consumo de flavonoides puede tener una influencia importante en la disminución del riesgo de ECV, a través de los mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes ya desarrollados previamente, y también mediante actividades vasodilatadoras o el aumento de las lipoproteínas de alta densidad o HDL (Rees et al., 2018).

La desregulación metabólica asociada a la diabetes induce una respuesta pro-inflamatoria de los macrófagos del tejido adiposo y la vasculatura. En este sentido, se ha visto que los flavonoides pueden modular el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, aliviar tanto el estrés oxidativo como las vías de señalización sensibles al estrés, así como los procesos inflamatorios. Se ha observado la reducción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en animales diabéticos, mejorando significativamente la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, y la resistencia a la insulina (Abuhashish et al., 2013; Jadhav y Puchchakayala., 2012; Sirovina et al., 2013; Visnagri et al., 2014).

La reducción de esas mismas citoquinas asociada a los efectos de los flavonoides se ha asociado también a efectos neuroprotectores (Ginwala et al., 2019). Más aún, la efectividad de los flavonoides ha sido estudiada en la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Park et al., 2007) como la demencia (Song et al., 2024), el Parkinson (Gao et al., 2012) o el Alzheimer (Currais et al., 2014). Se ha descrito que los alimentos con alto contenido en flavonoides disminuyen el riesgo de este tipo de enfermedades, mostrando efectos beneficiosos sobre el sistema nervioso central y periférico (Ullah et al., 2020).

Dentro de la complejidad del cáncer, la inflamación tiene un impacto importante en varios estadios del desarrollo del tumor. Varios factores ambientales de riesgo para el desarrollo del cáncer, como infecciones crónicas, tabaco, u obesidad, están asociadas en algún grado con la inflamación crónica (Grivennikov et al., 2010). En esta línea, estudios *in vitro* han demostrado potenciales propiedades protectoras de los flavonoides contra el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer (Effat et al., 2024; Li et al., 2024; Navone et al., 2023). Algunos de los mecanismos descritos a través de los cuales ejercen estos efectos, además de los ya mencionados en relación con la disminución de las ROS y las propiedades antiinflamatorias, son: regulación a la baja de la proteína p53 mutante (que lleva a la división descontrolada de las células cancerosas), detención del ciclo celular e inducción de la apoptosis de las células dañadas (Darband et al., 2018), e inhibición de la angiogénesis (Ginwala et al., 2019). Los flavonoides actúan también contra la sobreexpresión del enzima telomerasa en las células cancerígenas, impidiendo su replicación (Tawani y Kumar, 2015).

Además, se ha descrito la capacidad de las isoflavonas funcionando como fitoestrógenos. Al poseer una estructura similar al estradiol-17 β y a otros estrógenos animales, son capaces de simular su actividad y ejercer efectos tanto estrogénicos como anti-estrogénicos (Kumar y Pandey, 2013). Las isoflavonas pueden utilizarse así como terapia alternativa para una amplia gama de trastornos hormonales, incluidos varios tipos de cáncer, más concretamente los de mama y próstata, así como en enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, o en síntomas menopáusicos (Křížová et al., 2019).

En cuanto a su efectividad frente a microorganismos infecciosos (**Figura 8**), los flavonoides han sido descritos como antibacterianos, interviniendo en la alteración de la membrana y en la inhibición de ciertos procesos, como la formación de biopelículas, la síntesis de ATP, la síntesis de los ácidos nucleicos, la síntesis de la envoltura celular, así como en la cadena de transporte de electrones (Rafał et al., 2018). También tienen efecto como antifúngicos, actuando en la disrupción de la membrana plasmática, induciendo disfunciones mitocondriales, e inhibiendo la formación de la pared celular, la división celular y la síntesis de ARN y proteínas (Al Aboody y Mickymaray, 2020). Además, los flavonoides pueden bloquear la unión y entrada de virus en las células, interfiriendo tanto con la replicación o traducción viral como con su liberación (Goris et al., 2021; Lalani y Poh, 2020).

1.4.1. Relación de los flavonoides con la microbiota intestinal ligado a la regulación de los procesos inflamatorios

Factores desencadenantes de la inflamación crónica, como el estrés o la dieta, también pueden afectar al microbioma intestinal, alterando su composición (**Figura 8**). A su vez, cada vez más evidencias apoyan la relación entre una comunidad microbiana intestinal alterada (disbiosis) y el desarrollo y progresión de diferentes enfermedades inflamatorias. La disbiosis es un término que describe una alteración cuantitativa y/o cualitativa en la composición de la microbiota. El microbioma intestinal juega un papel importante en el correcto desarrollo del sistema inmunitario. Cuando hay un estado disbiótico, la afectación del microbioma se traduce en una activación/expansión aberrante y permanente de las células del sistema inmune, lo cual lleva a un estado de inflamación y, por tanto, al desarrollo de patologías tanto en el propio intestino, como pueden ser la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, como en otras partes del cuerpo. Por ejemplo, la artritis reumatoide se caracteriza por una respuesta inmune constante que desencadena una inflamación crónica (Maciel-Fiuza et al., 2023; Miao et al., 2022). Otros órganos alejados del intestino, como la piel, el cerebro, o los pulmones, también pueden verse afectados por la disbiosis intestinal. Esto sugiere que la microbiota intestinal interacciona con el sistema inmune de forma sistémica, resultando entonces de gran interés el estudio del efecto *in vivo* de los flavonoides en la modulación de la microbiota intestinal en relación al tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Los flavonoides y la microbiota intestinal interactúan de dos maneras (**Figura 8**). Por un lado, los flavonoides son capaces de modular la estructura de la microbiota intestinal (Açar et al., 2023). En este sentido, un estudio metabolómico del efecto del tratamiento con el flavonol kaempferol en ratones inducidos con artritis reumatoide, ha demostrado su efectividad en la remodelación de la comunidad microbiana intestinal, afectando también, en consecuencia, a mecanismos relacionados con la respuesta inmune y la inflamación (Aa et al., 2020). En otra investigación se ha estudiado la asociación entre la ingesta de flavonoides y la microbiota intestinal en un grupo de individuos con fibrosis quística. En dicho estudio, la ingesta de flavonoides se relacionó con variaciones en la microbiota, mostrando potenciales consecuencias positivas para el metabolismo, las funciones inmunes y la inflamación (Li y Somerset, 2018). En relación con la neuroinflamación, un estudio en un modelo inducido en rata ha estudiado la administración intragástrica de la flavona baicaleína como efectiva en la inhibición de las vías de

señalización pro-inflamatorias, y en la modulación de la diversidad y la composición de la microbiota intestinal, disminuyendo la abundancia relativa de grupos taxonómicos bacterianos asociados a la inflamación (Song et al., 2024). Numerosos trabajos han mostrado también la recuperación del equilibrio de la microbiota intestinal mediada por flavonoides en las enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) en modelos animales *in vivo*. En estos estudios se observa un aumento en la abundancia relativa de géneros y especies con características antiinflamatorias, mientras que los microorganismos comúnmente asociados con actividades pro-inflamatorias se ven disminuidos. En este escenario, además de la remodelación de la microbiota, los flavonoides también son capaces de disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Ai et al., 2017; Li et al., 2021; Xue et al., 2023) **(Figura 8)**.

Por otro lado, la microbiota puede metabolizar los flavonoides, dando lugar a otros derivados flavonoides y/o a metabolitos fenólicos bioactivos (Açar et al., 2023). A este respecto, las isoflavonas, tras su ingesta, son metabolizadas por enzimas de la microbiota intestinal, lo cual las convierte en compuestos más biodisponibles. El metabolito (S)-equol es producido a partir de la isoflavona daidzeína y está considerado como el metabolito derivado de isoflavonas con mayor actividad estrogénica y antioxidante (Vázquez et al., 2021). Varios estudios *in vivo* en ratones reportan el efecto del (S)-equol sobre los mecanismos inflamatorios por medio de la activación del receptor beta de estrógenos (ER β). El (S)-equol actúa inhibiendo la sobreproducción de biomarcadores inflamatorios expresados por macrófagos, células de microglía y tejido adiposo. Además, mejora los procesos inflamatorios implicados en la patogénesis de la artritis reumatoide y el síndrome metabólico (Lin et al., 2016; Yokosuka et al., 2021) **(Figura 8)**. Sin embargo, la capacidad de los humanos para convertir las isoflavonas ingeridas en la dieta en (S)-equol depende de una microbiota intestinal que contenga los microorganismos capaces de llevar a cabo esa transformación, la cual tiene lugar en 4 pasos enzimáticos. Este fenotipo productor de (S)-equol está presente solo en un 25-50% de la población (Vázquez et al., 2021). Otro ejemplo se encuentra en la conversión de los flavanones aromadendrina y taxifolina en los auronoles maesopsina y alfitonina, respectivamente. Los auronoles son derivados hidratados de auronas con un grupo hidroxilo en posición C2. Esta conversión tiene lugar en el tracto gastrointestinal humano como parte del metabolismo bacteriano de degradación de los flavonoides por microorganismos anaerobios intestinales (Braune et al., 2016). Los auronoles han demostrado ser interesantes compuestos con destacable potencial terapéutico (Elsinghorst et al., 2011; Kim et al., 2017; Pozzesi et al., 2011; Thuy et al., 2016).

1.5. Interés industrial de los flavonoides

Dada la amplia variedad de propiedades farmacológicas que presentan los flavonoides, existe una creciente demanda por lograr su producción a escala industrial para su uso en medicina, farmacología, alimentación (nutracéuticos), o cosmética. El valor neto para los mercados globales de flavonoides se estima actualmente en más de 200 millones de dólares al año (Tariq et al., 2023). Sin embargo, a pesar de que las plantas constituyen la fuente natural de los flavonoides, su extracción a gran escala a partir de ellas supone un reto.

Uno de los obstáculos a superar para su extracción es la baja eficiencia de producción de estos metabolitos secundarios en las plantas, ya que se acumulan solo bajo determinadas condiciones ambientales. Además, las amplias extensiones de terreno necesarias para los cultivos suponen altos costes de mantenimiento. Estos factores, sumados a la influencia que los cambios climáticos pueden tener en los cultivos, hacen impredecible su producción (Sajid et al., 2021). También hay que tener en cuenta que su extracción a partir de las plantas da lugar a una mezcla de varios flavonoides, por lo que los procedimientos necesarios para el aislamiento, extracción, y purificación de un tipo en particular de flavonoide son muy complejos (Fowler y Koffas, 2009). Estos procesos de extracción dependen también de la estabilidad de los flavonoides, la naturaleza de los solventes, la cantidad de extracto requerida, y las técnicas y equipamiento necesarios para la extracción (Chouhan et al., 2017; Liga et al., 2023). Los métodos de extracción más tradicionales tienen la desventaja de necesitar grandes cantidades de solventes, largos tiempos de procesamiento, pérdidas de solvente por evaporación, baja selectividad, y la necesidad de purificar el extracto (Liga et al., 2023).

La síntesis química también se ha propuesto como método alternativo de producción de flavonoides. Sin embargo, esta implica largas y duras condiciones de reacción que incluyen el uso de agentes químicos tóxicos (Kumar y Pandey, 2013; Sun et al., 2022). Además, a pesar de la presencia del centro estereogénico en muchas de sus estructuras, la mayoría de las estrategias sintéticas ignoran la estereoquímica de los flavonoides, pasando por alto que diferentes estereoisómeros poseen diferentes actividades biológicas (Pereira et al., 2023).

1.5.1. Biosíntesis heteróloga

La producción heteróloga en factorías microbianas ha adquirido una relevancia significativa como una estrategia valiosa y atractiva para la biosíntesis de flavonoides, representando una vía sencilla, rápida y económicamente viable, que en los últimos años ha emergido como un extenso campo de investigación. Este éxito se atribuye principalmente a la rápida tasa de crecimiento de los microorganismos, su cultivo simplificado, y la amplia disponibilidad de técnicas avanzadas de ingeniería microbiana disponibles hoy en día. Estas técnicas permiten una manipulación genética versátil, complementada por el amplio acceso a herramientas bioinformáticas (Ibdah et al., 2018; Zha et al., 2018; Zha y Koffas, 2017). A través de técnicas de ingeniería genética, se introducen y expresan en estas factorías microbianas secuencias de ADN no nativas, resultando en la producción de enzimas capaces de sintetizar el compuesto deseado. Con el apoyo de precursores ya existentes en el microorganismo anfitrión, este sistema enzimático diseñado por bioingeniería emula y reproduce la ruta biosintética de los flavonoides presente en las plantas (Cress et al., 2013; Milke et al., 2018).

Las bacterias, como hospedadores biotecnológicos, tienen la ventaja de tener un crecimiento rápido y la capacidad de expresar los genes heterólogos de manera policistronica, disminuyendo así la complejidad en el diseño de los circuitos genéticos (Isogai et al., 2022). La primera ocasión en la que se logró la producción de flavonoides mediante expresión heteróloga se realizó en la bacteria *Escherichia coli* en

2003. En ella, a partir de L-fenilalanina y L-tirosina se obtuvo la producción de las flavanonas pinocembrina y naringenina, respectivamente, a través de la expresión heteróloga de los enzimas PAL, 4CL, CHS y CHI (Hwang et al., 2003). Un aspecto notable en este estudio, y ampliamente utilizado posteriormente, fue la utilización de un enzima PAL con actividad añadida tirosina-amonoliasa (TAL) proveniente de la levadura *Rhodotorula rubra*, la cual permitió la biosíntesis de naringenina partiendo de L-tirosina (**Figura 9**). El uso de este enzima PAL con actividad TAL cataliza la biosíntesis del ácido *p*-cumárico directamente desde L-tirosina, esta última ya hidroxilada en la posición *para* del anillo aromático (Kaneko et al., 2003). De esta manera, se suprimió la necesidad del paso de hidroxilación del ácido cinámico, el cual es llevado a cabo por el enzima C4H, una CYP naturalmente asociada a la membrana del retículo endoplásmico de las plantas y demandante de una CPR asociada para su correcto funcionamiento. La expresión de estas CYP en bacterias resulta problemática ya que carecen de membranas a las que anclarse.

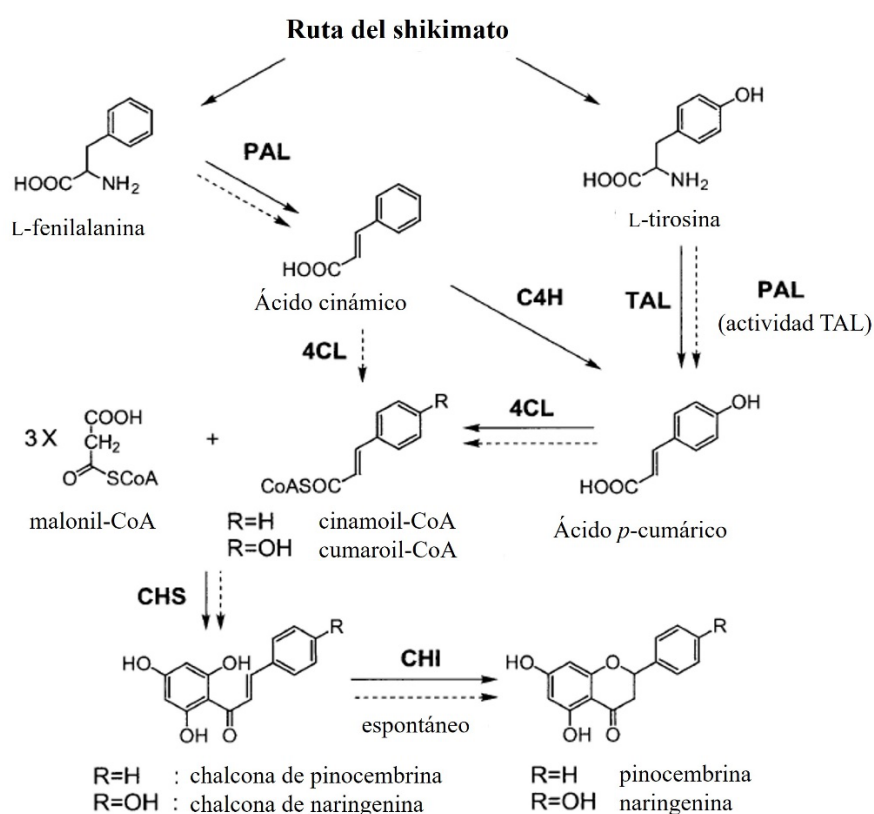


Figura 9. Ruta biosintética de producción de naringenina a partir de L-tirosina por el uso de un enzima PAL con actividad TAL. Las flechas continuas muestran la ruta biosintética de flavanonas en plantas. Las flechas discontinuas representan la ruta biosintética esperada en la *E. coli* portadora del grupo de genes artificiales que incluyen PAL (actividad TAL), 4CL, CHS y CHI [Figura adaptada de Hwang et al., 2003].

Las flavanonas, principalmente la naringenina, constituyen los puntos de inicio para la posterior diversificación de flavonoides. Flavonas, flavanonoles, flavonoles, antocianidinas, flavan-3-oles e isoflavonas son sintetizados vía flavanonas. Multitud de estudios de bioconversión se han llevado a cabo en la bacteria *E. coli* a través de la expresión de enzimas de modificación. Como ejemplo, mediante la expresión de los enzimas 4CL, CHS, CHI, F3H y FLS se produjo la biosíntesis de aromadendrina y

kaempferol a partir de ácido *p*-cumárico (Leonard et al., 2006). En otro estudio, la L-tirosina y la L-fenilalanina fueron utilizadas en *E. coli* como precursores para la producción de apigenina y chrisina, respectivamente, por acción de los enzimas PAL, 4CL, CHS, CHI y FNSI (Li et al., 2019).

Además de *E. coli*, otras bacterias han sido ensayadas exitosamente como factorías microbianas de producción de flavonoides a partir del uso de secuencias enzimáticas nativas de plantas. Pertenecientes al género *Streptomyces*, las especies *S. albidoflavus*, *S. coelicolor* y *S. venezuelae* han sido ampliamente utilizadas para la biosíntesis, tanto *de novo* como a partir de precursores, de varios flavonoides, como naringenina, eriodictiol, apigenina, chrisina, luteolina, aromadendrina, kaempferol, quercetina, miricetina, fustina o garbanzol (Marín et al., 2021, 2018, 2017; Park, 2010; Park et al., 2009).

Las levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, han sido también utilizadas como hospedadores para la producción *de novo* de varios flavonoides, debido a ciertas ventajas que les ofrece el hecho de ser organismos eucariotas. Entre estas ventajas se encuentra la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales de proteínas eucariotas, lo que resulta en una mejor expresión de fitoproteínas. Además, a diferencia de las bacterias y gracias a su abundante estructura de membrana, las levaduras tienen una mayor capacidad para expresar los enzimas CYP provenientes de plantas, varios de los cuales son catalizadores clave en las rutas biosintéticas de flavonoides (Du et al., 2020; Lv et al., 2019; Shah et al., 2019; Suástegui y Shao, 2016). Usando *S. cerevisiae* como hospedador para producción heteróloga, se ha conseguido la producción de flavonoides como naringenina, eriodictiol, kaempferol, dihidromiricetina, catequina, taxifolina, quercetina o genisteína (Gao et al., 2020; Li et al., 2020; Lyu et al., 2019; Mark et al., 2019; Rodríguez et al., 2017; Sun et al., 2021; Tartik et al., 2023; Trantas et al., 2009; Zhang et al., 2021). Existen estudios recientes de la producción *de novo* de naringenina, eriodictiol y taxifolina en la levadura no convencional *Yarrowia lipolytica*, proponiéndose esta también como un hospedador prometedor para la biosíntesis de flavonoides (Lv et al., 2019).

2. *Streptomyces* spp. como factoría bacteriana de compuestos bioactivos

Filogenéticamente el género *Streptomyces* forma parte del filo *Actinomycetota* (actinobacterias), un grupo de bacterias Gram-positivas cuyo material genético (ADN lineal) es rico en contenido guanina/citosina (G/C) (70%) en comparación con otras bacterias como *Escherichia coli* (50%). Poseen una forma filamentosa similar a los hongos, y se encuentran presentes en varios ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos (de-Lima-Procópio et al., 2012; Koshla et al., 2023). Constituyen los microorganismos más numerosos del suelo, donde secretan múltiples enzimas hidrolíticas que degradan sustratos orgánicos complejos (Berini et al., 2020). Durante su crecimiento, *Streptomyces* spp. produce metabolitos secundarios, compuestos que no son estrictamente necesarios para el crecimiento o la reproducción, pero que, sin embargo, proporcionan al organismo una ventaja competitiva. Estos metabolitos secundarios desempeñan un papel crucial en varias funciones biológicas que benefician a la bacteria. Entre estas

funciones se incluyen el secuestro de metales esenciales, como el hierro, a través de la producción de sideróforos; la protección contra la radiación UV mediante la pigmentación; la inhibición del crecimiento de especies competidoras a través de la producción de antibióticos; o la comunicación inter e intraespecífica a través de metabolitos de señalización (Quinn et al., 2020). El interés otorgado a este género se debe precisamente a su capacidad para producir estos valiosos metabolitos secundarios bioactivos, los cuales tienen un amplio uso en medicina como inmunosupresores, antihipertensivos, antivirales o anticancerígenos, pero, sobre todo, como antibióticos. Adicionalmente, muchos de estos compuestos poseen también actividad como herbicidas y antifúngicos (Barka et al., 2016; Challis, 2014; Khan et al., 2011; Nett et al., 2009; Omura et al., 2001; Patzer y Braun, 2010). De este modo, el género *Streptomyces* produce entre el 70% y el 80% de las sustancias bioactivas naturales conocidas por sus efectos farmacéuticos o aplicaciones agroquímicas, mientras que cerca del 50% de las especies aisladas del género *Streptomyces* son reconocidas como productoras de antibióticos (Bérdy, 2005; Manteca et al., 2008).

2.1. Ciclo biológico

Streptomyces spp. se caracteriza por poseer un ciclo de vida complejo, asemejándose más al de un hongo que al de una bacteria. El ciclo da comienzo con la formación de un micelio inicial que corresponde a la fase vegetativa, y su consiguiente diferenciación en un micelio aéreo esporulante correspondiente a la fase reproductora.

Este ciclo biológico complejo presenta varias etapas, caracterizadas por cambios tanto morfológicos como fisiológicos (**Figura 10**). El ciclo de vida comienza con la germinación de una espora tras encontrar las condiciones óptimas de oxígeno, nutrientes y agua (Hirsch y Ensign, 1978). Para ello, la espora emite un tubo germinativo que se expande a través del crecimiento apical y la ramificación hifal, hasta formar un micelio sustrato constituido por un haz de hifas multinucleadas, el cual se embebe en el sustrato (Hardisson et al., 1978). El modelo clásico del ciclo de vida del género *Streptomyces* se basa en la idea de que la diferenciación se produce verticalmente (de abajo hacia arriba), e implica la formación de dos tipos diferentes de micelio. En primer lugar, crece un micelio vegetativo o sustrato, el cual, cuando se requiere dispersión debido, por ejemplo, al agotamiento de nutrientes, sufre un proceso de muerte celular programada. Las hifas se empiezan a diferenciar para formar un micelio reproductor aéreo, para finalmente dar lugar a la formación de esporas individuales (Fernández y Sánchez, 2002). Las hifas aéreas son inicialmente multinucleadas, sin embargo, eventualmente desarrollan estructuras esporogénicas que se diferencian en cadenas de esporas unigenómicas septadas. Estas pre-esporas están recubiertas de una capa fibrosa, dando lugar a esporas hidrofóbicas, pigmentadas, e individuales (Flårdh, 2003). Las esporas constituyen el estado de letargo, y tienen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo, hasta que las condiciones ambientales proporcionen humedad y concentraciones óptimas de nutrientes para germinar (Claessen et al., 2006).

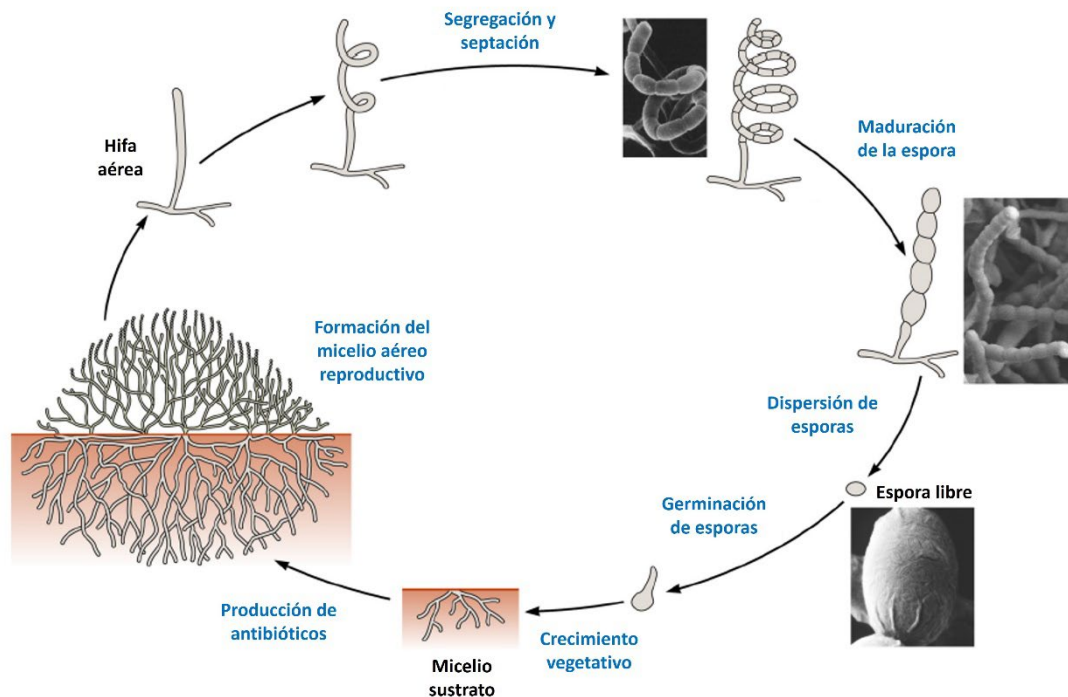


Figura 10. Representación esquemática del ciclo de vida de actinomicetos esporulantes [Figura adaptada de Barka et al., 2016].

Más tarde, mediante estudios transcriptómicos y proteómicos, se comprobó la existencia de una serie de pasos previos en el proceso de diferenciación de estas bacterias con desarrollo miceliar (Manteca et al., 2007; Yagüe et al., 2016, 2013) (**Figura 11**). Una vez que las esporas germinan, un primer micelio joven, monogénico y septado (MI) se desarrolla. El MI compartimentalizado es el verdadero micelio vegetativo de *Streptomyces* spp., en el que se desarrolla el metabolismo primario y se activan los mecanismos de conjugación, recombinación y mutagénesis. El MI es el predominante en la naturaleza, sin embargo, en condiciones de laboratorio es muy transitorio. Tras un primer proceso de muerte celular programada, en el que participan enzimas líticas específicas (nucleasas, proteasas y muramidasa), células vivas y muertas coexisten en este MI. El proceso de muerte celular programada ocurre desde las partes más internas a las más externas de la colonia, así, las células periféricas dan paso al micelio multinucleado secundario (MII), en el que se identifican dos etapas.

En la primera etapa, definida como MII temprano, el micelio crece dentro del sustrato (esta fase corresponde al micelio sustrato clásico) hasta que empieza a generar una cubierta envolvente hidrofóbica que permite al micelio crecer fuera del sustrato, formando el MII tardío (micelio aéreo) (Manteca et al., 2007). Ambos, MII temprano y tardío (micelios sustrato y aéreo del modelo clásico), corresponden a la fase reproductora, y están implicados en la esporulación y producción de metabolitos secundarios. En esta etapa se activan los mecanismos de variabilidad genética, secuencias de inserción, y transposones, previos a la fase de esporulación, quedando así patente las diferencias fisiológicas entre las hifas en fase MI y MII. Antes de que la esporulación suceda tiene lugar un segundo proceso de muerte celular programada que afecta tanto al micelio sustrato como al aéreo. Durante la etapa MII se producen gran cantidad de

antibióticos (metabolitos secundarios) que actúan como mecanismos de defensa contra otros microorganismos, con el fin de asegurar la supervivencia de la bacteria (Yagüe et al., 2013).

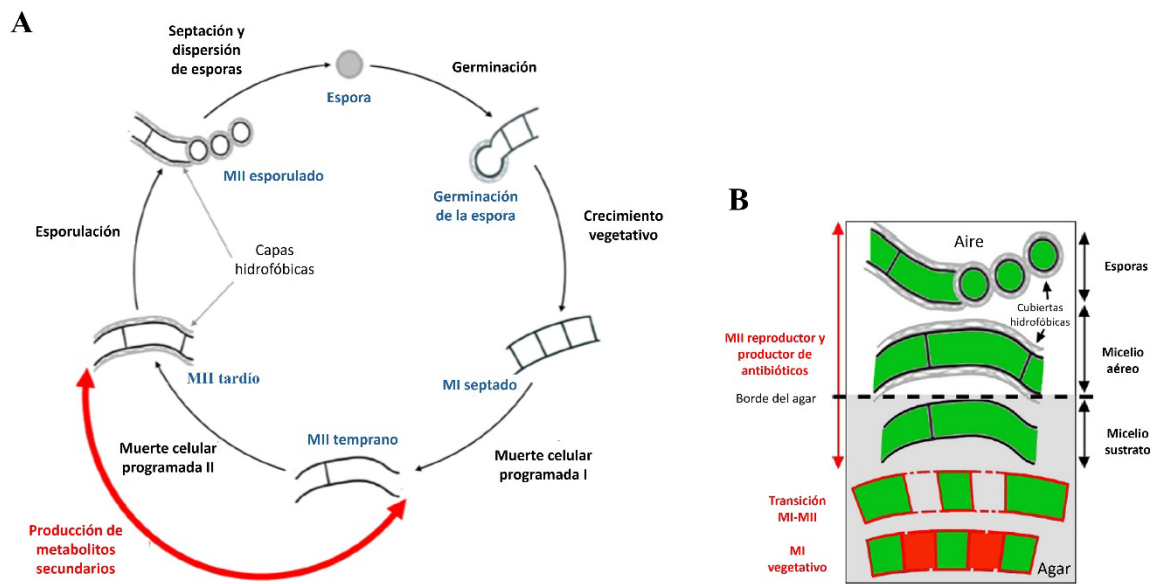


Figura 11. A) Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. actualizado. **B)** Ciclo de desarrollo de *Streptomyces* spp. a lo largo del eje transversal de una placa de cultivo. A la derecha (negro) se muestra la nomenclatura tradicional de micelio aéreo y sustrato; a la izquierda (rojo) la nueva nomenclatura de las etapas MI y MII [Figura adaptada de Yagüe et al., 2013 y Yagüe et al., 2016].

2.2. Biosíntesis de compuestos bioactivos

El potencial del género *Streptomyces* como productor de compuestos naturales se ve reflejado en el número promedio de agrupamientos génicos biosintéticos (BGCs) de su genoma. Este número ha sido predicho por el programa informático de minería genómica antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolites Analysis SHell) (Blin et al., 2017) en un promedio de 36,5. Esto supone que dedican sobre un 10% de su genoma a la biosíntesis de metabolitos secundarios bioactivos con propiedades como antibióticos, antitumorales, antifúngicos, inmunosupresores, etc. (Kallifidas et al., 2018; Lee et al., 2021). Los BGCs están constituidos por grupos de genes físicamente cercanos y relacionados, que participan en una vía metabólica común y específica de biosíntesis de metabolitos los cuales, a menudo, requieren ser exportados al medio extracelular. La expresión de los genes dentro de los BGCs está generalmente co-regulada (Crits-Christoph et al., 2021). *Streptomyces* spp. sintetiza sus compuestos bioactivos más abundantes (policetonidos y péptidos no ribosomales) utilizando grandes complejos enzimáticos como las policetonido-sintasas (PKSs), las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs), o una combinación de ambas (PKS-NRPSs). Estos grandes complejos multienzimáticos utilizan varios dominios para lograr modificaciones químicas que pueden producir una amplia gama de antibióticos, constituyendo estos los principales metabolitos secundarios producidos por los estreptomicetos (Felnagle et al., 2008; Risdian et al., 2019). La biosíntesis de los policetonidos por parte de las PKSs sigue reacciones de condensación para su elongación similares a las de la biosíntesis de los ácidos grasos, usando como precursor, entre otros, el malonil-CoA. Las PKSs se clasifican en 3 tipos principales (I, II y III), cada uno con

características distintas en cuanto a su estructura, mecanismo de biosíntesis, y tipos de productos que generan. En concreto, las de tipo III son un grupo de enzimas multifuncionales del tipo CHS que se encuentran presentes principalmente en plantas, aunque también en algunas bacterias como es el caso del género *Streptomyces* (Hertweck, 2009).

Hoy en día el 80% de los antibióticos comerciales provienen del género *Streptomyces* (de-Lima-Procópio et al., 2012; Grosset y Singer, 2013) (**Figura 12**). La historia de los antibióticos comenzó con Fleming en 1928 gracias al descubrimiento de la penicilina, producida por un hongo. Desde entonces, las actividades antimicrobianas de los antibióticos producidos por microorganismos han sido ampliamente estudiadas (Harir et al., 2018). La historia de los antibióticos derivados de *Streptomyces* spp. comenzó con el descubrimiento de la estreptomomicina, aislada de *S. griseus* en 1944. Este descubrimiento fue impulsado por la urgente necesidad, durante la Segunda Guerra Mundial, de encontrar antibióticos que pudieran llenar el vacío dejado por la penicilina, siendo esta ineficaz contra la tuberculosis y algunos patógenos Gram-negativos (Wainwright, 1991). En posteriores ensayos a gran escala, la estreptomomicina demostró ser efectiva contra la tuberculosis, la peste bubónica, la fiebre tifoidea y el cólera (Schatz et al., 2005; Wainwright, 1991; Waksman et al., 2010; Waksman y Schatz, 1946). A raíz de esto, los científicos intensificaron la búsqueda de antibióticos dentro de este género.

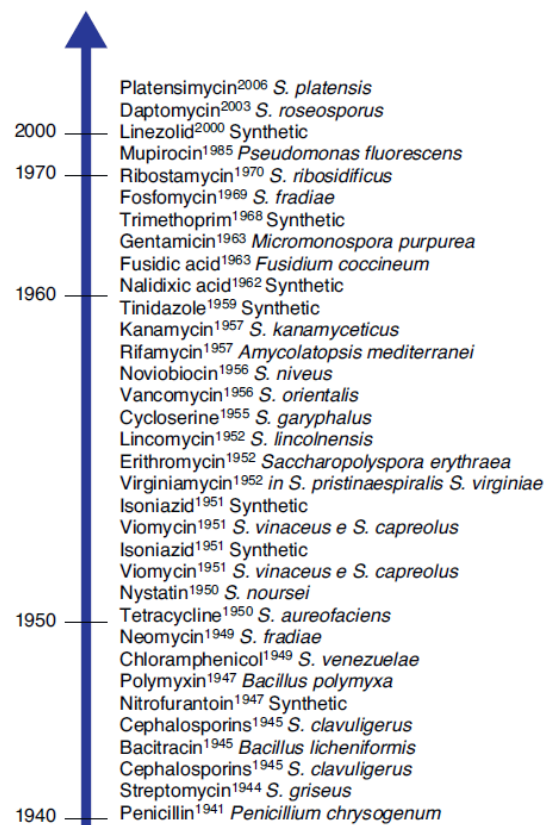


Figura 12. Fechas del descubrimiento de los últimos antibióticos derivados de microorganismos. Gran cantidad de ellos están producidos por el género *Streptomyces* [Fuente: de-Lima-Procópio et al., 2012].

Hasta la década de 1970 todavía era relativamente fácil aislar nuevos compuestos de *Streptomyces* spp., sin embargo, desde 1985 solo se han descubierto 3 nuevos antibióticos (Davies, 2006; Martens y Demain, 2011; Wang et al., 2006). El último de estos, en 2006, fue la platensimicina, que actúa como potente inhibidor de la biosíntesis de los lípidos, siendo estos componentes indispensables de las membranas celulares. En concreto, este antibiótico actúa selectivamente sobre los enzimas de condensación β -cetoacil-ACP-sintasas I/II (FabB/F), esenciales para la elongación de los ácidos grasos. Este compuesto ha mostrado actividad contra bacterias Gram-positivas resistentes a otros antibióticos, como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). La platensimicina es producida por *S. platensis*, una cepa del género *Streptomyces* que fue aislada de una muestra de tierra recogida en Sudáfrica. Su identificación se llevó a cabo por investigadores del grupo Merck tras un cribado de más de 250.000 productos naturales (Wang et al., 2006).

La principal limitación actual existente para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos reside en el hecho de que la mayoría de los BGCs que dan lugar a estos están solo débilmente expresados, o no expresados en absoluto en condiciones estándar de laboratorio. Esto es debido a que su biosíntesis está altamente regulada a través de la integración de múltiples señales nutricionales y ambientales percibidas por reguladores transcripcionales pleiotrópicos y específicos de vía, y desencadenadas normalmente por señales ambientales (Jönsson et al., 2024; Kallifidas et al., 2018). Por ello, estos productos naturales no llegan a acumularse. A modo de ejemplo, el descubrimiento de la platensimicina tuvo lugar en paralelo al descubrimiento de su mecanismo de acción. Se necesitaron técnicas de silenciamiento génico, por ARN antisentido, dirigido específicamente contra el enzima FabF, con el fin de reducir sus niveles de expresión y así poder obtener resultados tras el cribado de una librería de productos naturales (Manallack et al., 2008).

Una opción para acceder al potencial biosintético oculto del género ha sido la activación de estos BGCs, a través de estrategias que incluyen modificaciones en el medio de cultivo, o tratamientos químicos. Sin embargo, estos métodos resultan en una activación no directa de estos BGCs, al depender de las redes reguladoras nativas del hospedador (Lee et al., 2019). A este respecto, están tomando importancia los estudios sobre la regulación de la producción de estos compuestos, por un lado, con el fin de revelar cómo los estreptomicetos limitan o silencian la expresión de la mayoría de los BGCs implicados en el metabolismo especializado y, por otro, para proporcionar nuevos conocimientos y herramientas para generar cepas superproductoras de compuestos de importancia industrial (Dolya et al., 2023). Otra estrategia abordada recientemente ha sido la expresión heteróloga dirigida de estos BGCs en hospedadores manipulables genéticamente.

2.3. *Streptomyces albidoflavus* J1074 como factoría microbiana

Los propios miembros del género *Streptomyces* han sido propuestos entre los hospedadores óptimos para la expresión heteróloga de compuestos bioactivos del metabolismo secundario, junto con otros organismos como *E. coli*, *Bacillus* o las levaduras. Esto es debido a varios motivos: (1) su ausencia de

patogenicidad; (2) su bien establecida tecnología de fermentación; (3) la abundancia de precursores, cofactores, y enzimas disponibles que poseen para la biosíntesis de metabolitos secundarios, dada su versátil naturaleza de expresión de BGCs endógenos; (4) los sistemas de modificación de metabolitos secundarios, entre ellos fosforilaciones, acetilaciones, farnesilaciones y glicosilaciones y (5) la existencia de rutas de secreción de proteínas (Anné y Van Mellaert, 1993; Brawner et al., 1991; Hwang et al., 2021; Lee et al., 2019).

En concreto, la cepa *S. albidoflavus* J1074 (antes *S. albus* J1074) ha demostrado poseer ciertas características que la hacen destacar como hospedador heterólogo por encima del resto de especies del género. La primera mención a la cepa *S. albus* J1074 tuvo lugar en 1980 (Chater y Wilde, 1980; Klappenbach et al., 2000), en referencia a una cepa derivada de la cepa *S. albus* G deficiente en el sistema *SalI* de restricción/modificación (R/M) (*SalGI*), por exposición a radiación UV. La interrupción del sistema R/M *SalI* por un elemento de inserción simple le permite ser manipulado genéticamente para introducir ADN exógeno de manera sencilla (Zaburanyi et al., 2014). Además, sus características de crecimiento rápido y disperso, junto con la capacidad de esporulación en medio líquido, también convierten a *S. albidoflavus* J1074 en una cepa modelo para llevar a cabo experimentos de expresión heteróloga (Zaburanyi et al., 2014). Esta cepa posee el contenido en G/C más alto conocido en estreptomicetos, un 73,3%, y un fenotipo auxótrofo para los aminoácidos valina e isoleucina. El genoma de *S. albidoflavus* J1074, con 6,8 megabases (Mb), es uno de los genomas del género *Streptomyces* más pequeños, ya que tiende a reducir el número de grupos ortólogos de genes. La región central que contiene los genes esenciales comprende prácticamente la totalidad del genoma, mientras que los “brazos” son mucho más pequeños en comparación con *S. coelicolor*, con longitudes de 0,3 Mb (brazo izquierdo) y 0,4 Mb (brazo derecho). En cuanto al contenido y localización de los BGCs en la cepa *S. albidoflavus* J1074, antiSMASH detecta un total de 23 BGCs cuya distribución no es uniforme, de modo que 7 de ellos están en los “brazos” del genoma, mientras que los 15 restantes se encuentran en la extensa región central que contiene los genes esenciales. De los 23 BGCs, 4 se estiman relacionados con la biosíntesis de terpenos, 11 con policetónidos o péptidos no ribosomales, 2 con sideróforos y los restantes con lantibióticos u otros tipos de compuestos (Zaburanyi et al., 2014).

El grupo de J.A. Salas, en la Universidad de Oviedo, fue el primero en utilizar esta cepa como hospedador para la expresión de los genes responsables de conferir resistencia al antitumoral mitramicina, originalmente sintetizado por *S. argillaceus*, y al antibiótico oleandomicina, producido por *S. antibioticus* (Fernández et al., 1996; Rodríguez et al., 1993). Más tarde, el mismo grupo consiguió la producción de estefimicina, tras expresar heterológamente los genes de biosíntesis de este policetónido de *S. steffisburgensis* junto a los genes de biosíntesis de L-ramnosa, ausentes en la cepa *S. albidoflavus* J1074 (Gullón et al., 2006). Este sistema fue utilizado más tarde para la generación, por biosíntesis combinatoria, de 12 nuevos derivados de la estefimicina, de los cuales 2 demostraron una actividad antitumoral aumentada entre 2 y 24 veces con respecto a la actividad de la estefimicina, en ensayos contra líneas celulares de adenocarcinoma de mama, colon y cáncer de pulmón (Olano et al., 2008).

S. albidoflavus J1074 se ha utilizado como hospedador para la expresión heteróloga de muchos otros BGCs nativos del género *Streptomyces*, productores de metabolitos secundarios. El BGC productor de frederamicina, de la cepa *Streptomyces griseus* ATCC 49344, fue expresado tanto en vectores de alto número de copias (Wendt-Pienkowski et al., 2005) como de copia simple, integrativos en el sitio de integración del fago Φ C31 (Chen et al., 2008). La ruta de biosíntesis completa del policetónido antimetastásico iso-migrastatina, de *S. platensis* NRRL18993, fue clonada y expresada en *S. albidoflavus* J1074, *S. lividans* K4-114, *S. coelicolor* M512, y *S. avermitilis* SUKA5, consiguiendo la primera de ellas producir niveles similares a la cepa parental, mientras que los niveles de producción de las otras 3 cepas se mantuvieron entre 2 y 10 veces por debajo (Feng et al., 2009). También se llevó a cabo la expresión heteróloga en *S. albidoflavus* J1074 de los genes necesarios para la producción de los antibióticos actinorrodina, natural de *S. coelicolor* (Kallifidas et al., 2018), y holomicina, producido por *S. clavuligerus* ATCC 27064 (Huang et al., 2011). Un caso interesante lo constituye la expresión del BGC de las landomicinas, antibióticos aislados de varias especies del género *Streptomyces*, cuya expresión en *S. albidoflavus* J1074 dio lugar a 4 compuestos nuevos, 2 de los cuales (fridamicina F y G) se originaron por interacción entre la ruta biosintética expresada heterológamente y la red metabólica del hospedador heterólogo (Myronovskyi et al., 2016).

Una aplicación particularmente relevante de *S. albidoflavus* J1074 de cara a la expresión en este organismo de rutas metabólicas procedentes de organismos no pertenecientes al género *Streptomyces*, fue la expresión de la ruta biosintética del compuesto antitumoral tiocoralina, clonada a partir de una cepa marina de la especie *Micromonospora*, perteneciente al grupo de los actinomicetos (Lombó et al., 2006). Este estudio también puso de manifiesto la importancia de asegurar la expresión heteróloga de genes reguladores de las rutas de biosíntesis, para lograr la consecución del producto final deseado. Más recientemente se han conseguido expresar heterológamente en *S. albidoflavus* J1074 los genes correspondientes a los enzimas de diferentes rutas de biosíntesis y diversificación de varios flavonoides, aunque con rendimientos notablemente bajos (Marín et al., 2021, 2018, 2017) presumiblemente debido a la disponibilidad limitada de precursores y cofactores.

3. Ingeniería genética y Biología Sintética para la expresión heteróloga de compuestos bioactivos en *Streptomyces* spp.

En comparación con la producción de metabolitos secundarios en el hospedador nativo, la expresión heteróloga dirigida de estas rutas tiene varias ventajas, entre ellas: (1) permite la expresión de genes de hospedadores nativos no cultivables o de crecimiento lento, (2) supera la difícil manipulación genética del hospedador nativo, y (3) evita la red regulatoria innata del anfitrión nativo (Xu y Wright, 2019).

La Biología Sintética surge con el fin de superar las limitaciones respecto a la activación indirecta de los genes, y se define como un ciclo de Diseñar-Construir-Ensayar-Aprender (de las siglas en inglés DBTL). En el paso de “Diseñar” se identifica el problema y se seleccionan la ruta nativa a expresar y el hospedador

deseados; en el componente “Construir” se seleccionan, sintetizan, y ensamblan las partes genéticas en el vector elegido, para incorporarlas al hospedador heterólogo; en el paso “Ensayar” se transfiere el vector diseñado al hospedador heterólogo elegido y se validan las cepas diseñadas para la producción de los compuestos objetivo; finalmente, el componente “Aprender” analiza los datos obtenidos en el paso anterior e informa las iteraciones posteriores del ciclo (Lee et al., 2019; Petzold et al., 2015).

Una vez superado el primer paso de diseño de este ciclo, habiendo elegido tanto el hospedador heterólogo (*Streptomyces albidoflavus* J1074 en este caso) como la ruta a expresar (rutas de biosíntesis de flavonoides de plantas), varias partes genéticas sintéticas (elementos reguladores y genes) así como herramientas y técnicas de ingeniería genética son necesarias para la regulación de la expresión génica. En este sentido, varias estrategias han sido desarrolladas para llevar a cabo ingeniería genética en el género *Streptomyces* haciendo uso de la Biología Sintética.

3.1. Elementos reguladores en Biología Sintética

La Biología Sintética implica el uso de elementos reguladores sintéticos, como promotores, regiones de unión al ribosoma (RBS), o terminadores, de modo que estos son ajenos al sistema regulador del hospedador y se permite su control tanto temporal como espacial, para conseguir la expresión heteróloga dirigida de rutas de metabolismo secundario de compuestos (Lee et al., 2019).

La elección de los elementos reguladores de las rutas genéticas es lo que va a influenciar su eficiencia de expresión. Los elementos reguladores pueden ser divididos, por un lado, en los necesarios para la transcripción (promotores y terminadores) y, por otro, para la traducción (RiboJ y RBS).

3.1.1. Regulación transcripcional

En la regulación transcripcional, el promotor (sitio de unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción) es el elemento que determina el nivel de expresión génica. Promotores ampliamente usados en ingeniería genética, como el del operon *lac* o el T7, no son válidos para su uso en *Streptomyces* spp. debido al alto contenido en G/C. Sin embargo, existe una amplia librería de promotores disponibles para su uso en este género.

Los promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Con los promotores constitutivos se consiguen unos niveles de expresión génica mantenidos, independientemente de la fase de crecimiento; por su parte, los promotores inducibles permiten un control más regulado de la expresión génica, activándose o reprimiéndose en presencia de ciertas señales o compuestos, y son frecuentemente utilizados cuando existe toxicidad por parte de los compuestos resultantes de los genes heterólogos a expresar.

Los promotores constitutivos son ampliamente utilizados en *Streptomyces* spp. El más utilizado de ellos es el promotor fuerte *ermE**, derivado del promotor del gen de resistencia a la eritromicina *ermE* de *S. erythraeus* con una delección en la región *ermEp1* (Bibb et al., 1994, 1985; Kieser et al., 2000). Los promotores SF14 (SF14p, del fago I19) y *kasO* (*kasOp*, promotor del gen *kasO* codificante de un activador

transcripcional de la familia SARP) descubiertos en el genoma de *S. ghanaensis* y *S. coelicolor* A3, respectivamente (Labes et al., 1997; Wang et al., 2013), y *gapdhp* y *rpsLp*, obtenidos del genoma de *S. griseus* (Shao et al., 2013), también transcriben los genes de forma constitutiva de manera similar o más fuertemente que el promotor *ermE**.

En un estudio se eliminó la regulación nativa sobre el *kasOp* por medio de ingeniería genética, resultando en la generación de 4 promotores mutantes de entre los que surgió el *kasOp**, con actividad incrementada en especies del género *Streptomyces* con respecto a los promotores *ermE** y SF14 (Wang et al., 2013). El *kasOp** se usó más adelante como molde para la construcción de 2 librerías de promotores mutados aleatoriamente. La primera de ellas contenía derivados del *kasOp** con nucleótidos (nt) aleatorizados aguas abajo de la secuencia consenso -10, mientras que la segunda contenía derivados de *kasOp** con una región espaciadora mutada entre las secuencias consenso -10 y -35. De los 180 promotores resultantes de ambas librerías, 44 (SP1–SP44) fueron secuenciados con el fin de facilitar sus aplicaciones, incluyendo 6 promotores que demostraron una actividad más fuerte que el *kasOp** (Bai et al., 2015).

En otro estudio se generó en *S. lividans* TK24 una librería de 56 promotores sintéticos (D4 a 21) para su uso en actinomicetos, basada en la aleatorización de secuencias que rodean las secuencias consenso -10 y -35 del promotor constitutivo *ermEp1*. Estos promotores demostraron un amplio rango de actividad transcripcional (entre 2% y 319%) con respecto al promotor *ermEp1* (100%) (Siegl et al., 2013). Basándose en datos de transcriptómica, se realizó en *S. albidoflavus* J1074 una selección de secuencias promotoras de genes altamente expresados, resultando en la elección de 10 promotores más fuertes que el *ermE** (200-1300%) (Luo et al., 2015).

El terminador también es una parte importante de los circuitos genéticos, de cara a prevenir la transcripción de genes aguas abajo. En este sentido, 2 terminadores transcripcionales bidireccionales: Fd, originario del fago fd de *E. coli*, y TD1, originario del fago Φ 29 de *Bacillus subtilis*, son reconocidos eficazmente en especies del género *Streptomyces* (Pulido et al., 1987; Ward et al., 1986). Con el fin de incrementar el repertorio de terminadores fuertes para *Streptomyces* spp., dada la escasa variedad existente, un estudio en *S. lividans* testó la fuerza de 6 terminadores sintéticos, resultando el más potente de ellos el terminador bidireccional *tsbiB*, el cual permitía solo un 4% de expresión de regiones aguas abajo de su localización (Horbal et al., 2018).

3.1.2. Regulación traduccional

La regulación transcripcional por sí sola no es suficiente para diseñar un sistema de expresión génica eficiente en *Streptomyces* spp., siendo también necesaria la regulación de la traducción. La eficiencia en la traducción está determinada por la secuencia RBS. La secuencia RBS incluye la secuencia de Shine Dalgarno (SD), la cual corresponde a una secuencia consenso característica (AGGAGG) complementaria al extremo 3' de la región 16S del ARN ribosómico (ARNr) de la subunidad ribosomal 30S en procariotas. Las variaciones y la accesibilidad de esta secuencia SD influyen la habilidad de unión del ribosoma, determinando la eficiencia de la traducción (Lee et al., 2019).

La influencia de los cambios a este nivel en la eficiencia de inicio de la traducción quedó remarcada tras el ensayo de una librería de 70 secuencias RBS sintéticas expresadas en *S. lividans* TK24. La construcción de esta librería se llevó a cabo usando la secuencia consenso SD (GGAGG) (Komarova et al., 2002), mientras que 10 nt aguas arriba y 6 nt aguas abajo de la secuencia SD fueron aleatoriamente sintetizados. Como resultado, se obtuvo una variación en el nivel de expresión del mismo gen bajo el control del mismo promotor de entre 3 veces mayor que el control, hasta la total ausencia de traducción (Horbal et al., 2018). En este estudio, también se señala la importancia crítica en la distancia entre el dominio SD y el codón de inicio del gen a expresar, que idealmente debe de ser de entre 6 y 9 nt para conseguir una traducción óptima en *Streptomyces* spp., debido a limitaciones configuracionales. Además, una secuencia RBS óptima para un gen puede no serlo para otro. En este sentido, también son relevantes los primeros 30-60 nt del gen de interés, los cuales influyen la energía de plegado del ARN mensajero (ARNm) y, por tanto, el acceso y unión del ribosoma a este. En otro estudio en *S. venezuelae* se caracterizaron 15 secuencias RBS nativas, de entre las cuales las más fuertes fueron seleccionadas y aleatorizadas resultando en la creación de 174 secuencias RBS sintéticas con actividades de hasta 200 veces más fuertes que su secuencia RBS parental, siendo la más potente de ellas la denominada SR41 (Bai et al., 2015).

Otro elemento regulador utilizado en la Biología Sintética que permite la mejora en la expresión de genes en circuitos genéticos son los aisladores, siendo el ribozima autoescindible RiboJ el más conocido de ellos. El RiboJ se posiciona entre el promotor y la RBS. Su función principal es disociar la expresión de un gen de las secuencias que lo preceden, tales como promotores y otros elementos reguladores. Esto se realiza con el objetivo de minimizar las variaciones en la expresión génica que puedan surgir, debido a interacciones imprevistas e indeseadas. Dichas interacciones podrían resultar en la formación de estructuras secundarias en el ARNm, que a su vez podrían impedir o dificultar la unión del ribosoma. Consecuentemente, esto facilita una mayor predictibilidad y la modularidad de los elementos genéticos (Bai et al., 2015), así como una mejora en la eficiencia en la traducción de proteínas en sistemas sintéticos (Clifton et al., 2018).

3.2. Herramientas y técnicas de ingeniería genética

Para el uso de las distintas partes genéticas (elementos reguladores y genes) en la reconstrucción y expresión heteróloga de las rutas de metabolitos secundarios se requieren herramientas y técnicas eficientes de ingeniería genética.

3.2.1. El uso de plásmidos como vectores de clonación en Biología Sintética

Varios replicones (plásmidos) del género *Streptomyces* han sido utilizados para la construcción de vectores de uso en clonación, ya que, a excepción del plásmido RSF1010, el cual posee un amplio rango de hospedadores, ningún plásmido de bacterias Gram-negativas ni Gram-positivas de bajo o alto contenido en G/C es capaz de replicarse en *Streptomyces* spp. Los diferentes replicones de *Streptomyces* spp. utilizados en vectores de clonación difieren en sus tamaños, modo de replicación, número de copias y rangos de hospedadores. De este modo, los orígenes de replicación de plásmidos nativos de este género

ampliamente utilizados para construir vectores de clonación incluyen 2 tipos: los replicativos, los cuales pueden ser de alto o bajo número de copias, como por ejemplo pIJ101 (alto número de copias, 300), pJV1, pSG5 (sensible a temperaturas $>34^{\circ}\text{C}$, número de copias entre 20-50) o SCP2* (bajo número de copias); y los integrativos, como SLP1 o pSAM2, ambos integrados en el cromosoma en una secuencia específica y altamente conservada (Kieser et al., 2000).

Los vectores integrativos, en ocasiones, son preferidos a los replicativos, ya que permiten una rápida integración, estabilidad segregacional y una expresión predecible (número de copias conocido) de las rutas biosintéticas expresadas. Se han caracterizado varios sitios de integración de fagos existentes en el genoma de *Streptomyces* spp. La integración de ADN ajeno mediada por bacteriófagos se produce por recombinación específica de sitio, mediada por la acción de un enzima integrasa que actúa entre el locus *attB*, ubicado en el cromosoma del hospedador, y el correspondiente sitio *attP*, ubicado en el ADN de integración (Phelan et al., 2017). Tomando ventaja de este sistema se puede realizar ingeniería de vectores, de modo que estos contengan el sitio *attP* adecuado, y el correspondiente gen de la integrasa del bacteriófago, para dirigir el ADN exógeno al cromosoma hospedador (sitio *attB*). Muchas cepas de *Streptomyces* spp. contienen 1 o más de los 3 sitios *attB* más comunes (*attB*^{VWB}, *attB*^{ΦC31} y *attB*^{ΦBT1}), que pueden ser usados para la construcción de vectores que permitan integraciones múltiples y estables en el cromosoma (Li et al., 2019).

Para su uso como vectores útiles, es necesario, además, añadir marcadores que permitan realizar la selección de las cepas que hayan incorporado ese vector (cepas transformadas). Estos marcadores son genes que codifican proteínas de resistencia a antibióticos (apramicina, tiostreptona, estreptomina, kanamicina, etc.). Una ventaja añadida de los vectores integrativos en el contexto de la expresión génica es que, al tratarse de una integración de ADN estable, el uso del antibiótico de selección se limita exclusivamente a verificar que la inserción del ADN ha tenido lugar, lo cual resulta también económicamente más viable. Por el contrario, con los vectores replicativos es necesario mantener una presión de selección continua con el antibiótico, ya que sino el vector, y por tanto los genes a expresar, se perderán.

La construcción de vectores bifuncionales capaces de replicarse tanto en *E. coli* como en *Streptomyces* spp. supone una ventaja de cara a la clonación, ya que tanto la transformación de los vectores portadores de los circuitos genéticos de interés como la comprobación de las cepas portadoras de vectores correctamente ensamblados se lleva a cabo de una forma más sencilla y rápida en *E. coli*, mientras que la expresión de los genes se lleva a cabo en *Streptomyces* spp., el hospedador heterólogo definitivo. Esto hace necesaria la incorporación al vector de clonación de un origen de replicación de *E. coli*, el cual también podrá ser de alto (pUC), medio (pBBR1), o bajo (RK2) número de copias.

La transferencia intergenérica de vectores (conjugación), desde *E. coli* a cepas de *Streptomyces* spp., funciona tanto para vectores replicativos como integrativos. Para ello será necesario añadir al vector de clonación un origen de transferencia (*oriT*) que permitirá llevar a cabo la conjugación (movilización del vector) entre ambas bacterias. Generalmente, los vectores contienen el *oriT* del plásmido RP4, y requieren

que las funciones de transferencia sean suministradas por la cepa donante de *E. coli* (Kieser et al., 2000). Además, con el fin de mejorar la eficiencia en la conjugación, se puede añadir el gen *traJ*, el cual forma parte del relaxosoma (complejo de proteínas que facilita la transferencia del plásmido durante la conjugación), y cuya función es la de dirigir al relaxosoma hacia el *oriT*.

Los vectores modulares representan una herramienta clave en la Biología Sintética, diseñados para facilitar la manipulación y combinación de componentes genéticos (orígenes de replicación, resistencias antibióticas, etc.) con alta precisión y flexibilidad. La modularidad de estos vectores permite la reorganización de distintos módulos genéticos, permitiendo una combinación y reconfiguración fácil entre distintos proyectos y laboratorios. Este enfoque modular mejora significativamente la eficiencia y la versatilidad en el diseño de los vectores de clonación.

Los elementos genéticos previamente descritos son ensamblados *in vitro* para dar lugar a un vector de clonación definitivo. En este contexto, la plataforma SEVA (de las siglas en inglés Standard European Vector Architecture) realiza este ensamblaje de modo que los componentes quedan delimitados por sitios de restricción únicos e inusuales. Esta configuración permite que dichos elementos funcionen como módulos intercambiables. De este modo, como ejemplo, en situaciones donde se requiere modificar exclusivamente la resistencia antibiótica de un vector, solo será necesario llevar a cabo una reacción de restricción-ligación.

Esta plataforma ha permitido la implementación de un estándar para el ensamblaje físico de vectores plasmídicos, así como un repositorio de secuencias y construcciones funcionales disponibles para la comunidad científica, con el fin de optimizar la elección de la configuración de los vectores utilizados en procariontes (Martínez-García et al., 2023). Los módulos intercambiables de la estructura SEVA (**Figura 13A**), delimitados por sitios de restricción únicos, son: el/los origen/es de replicación (flanqueado por las enzimas *FseI* y *AseI*), la resistencia antibiótica (*SwaI-PshAI*) y el “carga” (lugar del vector donde se ensamblan los genes a expresar) (*PacI-SpeI*) (Silva-Rocha et al., 2013). Por lo tanto, un requisito asociado a este sistema es que cada módulo debe ser editado para eliminar los sitios de restricción considerados como únicos en esta plataforma.

En un trabajo previo, realizado en nuestro grupo de investigación, se desarrolló una librería de vectores bifuncionales, adaptando la plataforma SEVA a su uso en actinomicetos y en bacterias Gram-negativas (García-Gutiérrez et al., 2020) (**Figura 13B**). Para la construcción de esta colección se utilizaron variaciones de 3 tipos de orígenes de replicación del género *Streptomyces* (pIJ101, SCP2* e integrasa *attP^{ΦC31}*), 3 tipos de orígenes de replicación de *E. coli* (RK2, pBBR1 y pUC), y 5 resistencias antibióticas (cloranfenicol, kanamicina, apramicina, estreptomycin y ampicilina).

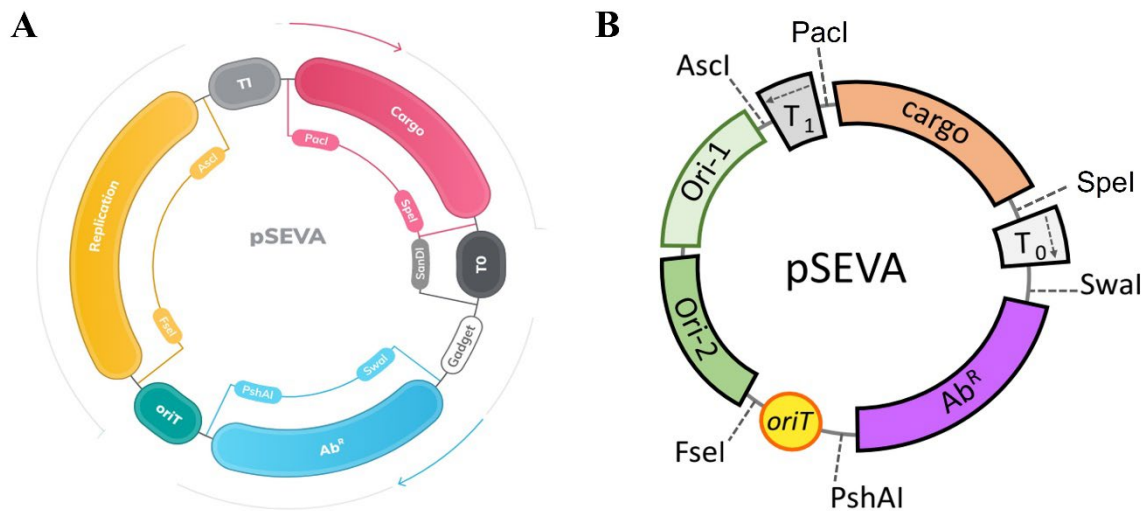


Figura 13. **A)** Esquema de los módulos intercambiables de los que consta la arquitectura SEVA, delimitados por sitios de restricción únicos. Ab^R , resistencia antibiótica; T1 y T0, terminadores [Figura adaptada de Martínez-García et al., 2023]. **B)** Estructura trimodular de vectores bifuncionales adaptados a la arquitectura SEVA, mostrando los módulos correspondientes a: orígenes de replicación (Ori-1 y Ori-2 para cada uno de los dos tipos de microorganismos), resistencia antibiótica, y cargo para la inserción de los genes de interés [Figura adaptada de García-Gutierrez et al., 2020].

3.2.2. Técnicas de clonación de vectores plasmídicos

Para el ensamblaje *in vitro* de los diferentes componentes del vector plasmídico, así como de los circuitos genéticos de interés dentro de estos vectores, se pueden utilizar diversas técnicas.

3.2.2.1. Digestión con enzimas de restricción de tipo II

Para la clonación clásica por restricción-ligación se utilizan habitualmente dos tipos de enzimas: enzimas de restricción, y enzimas ADN ligasas. Las endonucleasas, o enzimas de restricción, son enzimas que realizan una escisión específica de secuencias en un enlace fosfodiéster del ADN; mientras que las ligasas de ADN son enzimas que unen fragmentos de ADN mediante la formación de un enlace fosfodiéster. Los enzimas de restricción utilizados en la digestión tradicional son los de tipo II, conocidos por su capacidad de reconocer secuencias de ADN específicas y cortar dentro de esas mismas secuencias.

La clonación por digestión con enzimas de restricción de tipo II, seguida de ligación, parte de un fragmento amplificado por PCR, en el que el gen o fragmento de interés está flanqueado por los sitios de restricción elegidos, o bien de un vector que ya contiene el gen o fragmento de interés flanqueado por dichos sitios de restricción. El proceso tiene lugar en dos etapas, en primer lugar, la digestión tanto del fragmento de PCR (o vector que contiene el gen de interés) como del vector de destino (el cual también debe poseer esos mismos sitios de restricción) con los enzimas de restricción elegidos. En segundo lugar, la ligación del gen o fragmento de interés dentro del vector de destino (**Figura 14A**).

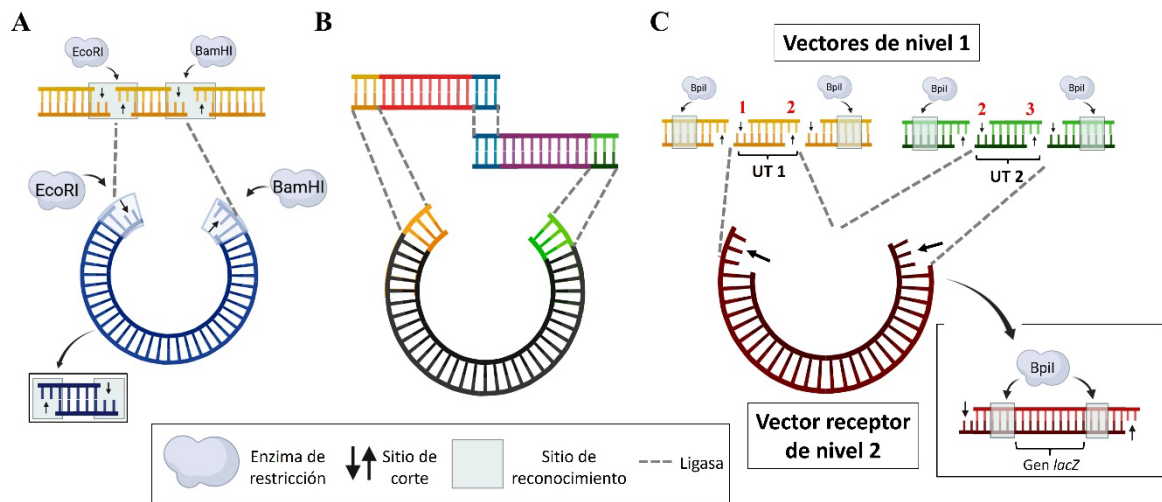


Figura 14. Comparación de las diferentes técnicas disponibles para el ensamblaje de fragmentos de ADN en vectores de clonación: **A)** Digestión con enzimas de restricción tipo II, **B)** Ensamblaje de tipo Gibson y **C)** Clonación de tipo Golden Gate [Figura elaborada con BioRender].

La ventaja de este tipo de clonación por restricción-ligación convencional es que actualmente existen más de 200 enzimas de restricción diferentes disponibles comercialmente. También, muchos vectores de expresión tienen sitios de clonación múltiple que pueden usarse para la clonación por este método, sin embargo, ésta no es una característica universal a todos los vectores, y estos sitios pueden no ser compatibles con nuestro fragmento de ADN. Una desventaja añadida de esta técnica es que el fragmento de ADN de interés podría poseer ya varios sitios de restricción internos coincidentes con aquellos que se quieren utilizar para el ensamblaje, lo cual excluiría su uso (Lee et al., 2019). Además, para el ensamblaje de más de un fragmento de ADN dentro de un vector, este tipo de clonación debe realizarse de forma secuencial, fragmento a fragmento.

3.2.2.2. Ensamblaje de tipo Gibson

El ensamblaje Gibson (Gibson et al., 2009) es un método de clonación molecular no dependiente de sitios de restricción. Permite la unión de múltiples fragmentos de ADN solapantes en los extremos en una única reacción isotérmica (**Figura 14B**). Para ello se emplean 3 actividades enzimáticas: 5'-exonucleasa, ADN polimerasa y ADN ligasa. La actividad de la 5'-exonucleasa genera extremos de cadena simple en los límites de cada fragmento de ADN, exponiendo la secuencia complementaria para su hibridación con el fragmento homólogo. Las regiones de homología entre fragmentos de ADN han de ser de entre 20 y 40 nt. A continuación, la ADN polimerasa rellena los huecos no hibridados para, finalmente, por acción de la ligasa, sellar y unir covalentemente los fragmentos de ADN. Gracias a las largas regiones solapantes, la eficiencia de ensamblajes correctos es alta.

Una desventaja de esta técnica reside en que requiere un diseño específico para cada ensamblaje, lo cual puede dificultar su estandarización completa y la reutilización de las partes (Shetty et al., 2008). A este respecto, como los circuitos genéticos a ensamblar pueden ser largos y complejos, además de necesitar que las distintas partes genéticas (elementos reguladores) estén aisladas unas de otras, se han descrito las

llamadas “Secuencias de Nucleótidos Únicas” o UNS, las cuales pueden utilizarse como regiones homólogas solapantes. De este modo se permite el ensamblaje de múltiples fragmentos de ADN de forma secuencial y ordenada (Torella et al., 2014), sin embargo, en este caso el ensamblaje deja “cicatrices” en la secuencia final de ADN.

3.2.2.3. Clonación de tipo Golden Gate

La clonación Golden Gate es una metodología basada en enzimas de restricción tipo IIS que ha surgido como una poderosa herramienta para estandarizar el ensamblaje de partes genéticas (Engler et al., 2008). Los enzimas de restricción de tipo IIS son capaces de cortar el ADN a una distancia definida de su sitio de reconocimiento, lo que permite generar extremos cohesivos, generalmente de 4 nt, que no contienen la secuencia de reconocimiento original (**Figura 14C**). Esto resulta particularmente útil para el ensamblaje de múltiples fragmentos de ADN sin la preocupación de reintroducir sitios de restricción en las uniones. El uso de este tipo de enzimas permite que los extremos cohesivos generados (sitios de fusión) puedan ser compatibles entre diferentes fragmentos (Szybalski et al., 1991), de modo que estos queden ensamblados al mismo tiempo y de forma direccional (Engler et al., 2014). Dos de los enzimas más comúnmente utilizados para este propósito son *BsaI* y *BpiI* (*BbsI*).

La principal modificación necesaria para poder implementar esta estrategia consiste en la eliminación de los sitios de restricción de tipo IIS utilizados para el ensamblaje por Golden Gate que puedan encontrarse en cada uno de los fragmentos de ADN a ensamblar. Esta eliminación se puede lograr bien por medio de PCR y ensamblaje Gibson, o por síntesis química de las partes genéticas. Esta sintaxis y estructura comunes facilitan la construcción de bibliotecas de partes genéticas reutilizables e intercambiables, así como el desarrollo de protocolos estándar (Patron et al., 2015).

El método Golden Gate conocido como Clonación Modular (MoClo) (Weber et al., 2011) fue desarrollado por primera vez para el trabajo con plantas, y tuvo como objetivo la generación de una plataforma de clonaje rápido y modular de circuitos genéticos. Esta estrategia se basó en el diseño de un sistema jerárquico de ensamblaje por niveles, en el que las partes básicas (niveles 0), pertenecientes a promotores, RBS, secuencias codificantes (CDS), terminadores, etc., podían ser ensambladas en unidades transcripcionales (UTs) sintéticas (niveles 1), las cuales, posteriormente, podían ser unidas construyendo circuitos genéticos (niveles 2). Para lograr esto, el ensamblaje MoClo combina, en una sola reacción, enzimas de restricción de tipo IIS y ADN ligasa T4, lo cual permite digerir y ensamblar varios fragmentos de ADN simultáneamente.

Recientemente, el método Golden Standard (GS) (Blázquez et al., 2023) ha surgido como una tecnología de clonación modular estandarizada, que unifica y armoniza el enfoque MoClo extendiéndolo a una amplia gama de bacterias, y permitiendo la portabilidad de los vectores finales resultantes para su uso en diversos microorganismos. Además, GS se adhiere a los estándares SEVA, lo que permite, no solo la modularidad en el proceso de ensamblaje, sino también de los vectores receptores.

Más en detalle, para ensamblar un nivel 1 (UT) se colocan los sitios de reconocimiento del enzima *BsaI* flanqueando las partes genéticas dentro de cada vector de nivel 0 (partes genéticas). Cada uno de los niveles 0 porta además sitios de fusión que serán diferentes según su categoría, y están nombrados con letras de la A a la I del siguiente modo: **A-promotor-B**, **B-RBS-D**, **D-CDS-G** y **G-terminador-I** (**Figura 15**). Por su parte, el vector receptor de nivel 1 posee los sitios de reconocimiento para el mismo enzima flanqueando el gen *lacZ*. Tras la digestión con el enzima *BsaI*, las partes genéticas perderán los sitios de reconocimiento del enzima, que quedarán en el esqueleto del vector, a la vez que el vector receptor de nivel 1 perderá estos sitios de reconocimiento junto con el gen *lacZ*, quedando este sustituido por las partes genéticas ensambladas de acuerdo al orden establecido por los sitios de fusión, y formando la UT funcional. Es posible que los fragmentos religuen de nuevo dentro del vector de nivel 0 de origen, si esto ocurre, serán digeridos de nuevo, de modo que, cuando todas las partes genéticas de nivel 0 se hayan ensamblado en el orden correcto dentro del vector receptor de nivel 1 formando la UT, todos los sitios *BsaI* habrán desaparecido. El gen *lacZ* que portan todos los vectores receptores, y que es sustituido por la UT o el circuito genético ensamblado, permite la fácil y rápida selección de las cepas bacterianas de *E. coli* que hayan incorporado la construcción (blancas), frente a las que no la incluyan (azules).

El vector receptor de nivel 1 se escoge teniendo en cuenta la posición que vaya a ocupar dicha UT en el nivel 2. Así, los sitios de fusión de la UT que va a ocupar la primera posición dentro del nivel 2 son denominados con los números **1-2**, los de la segunda posición **2-3**, y así sucesivamente hasta la posición número 6 (**3-4**, **4-5**, **5-6** y **6-7**). Flanqueando los sitios *BsaI* en el vector receptor de nivel 1 hay sitios adicionales *BpiI*, que permiten el ensamblaje de UT en circuitos genéticos en un orden determinado dentro del vector receptor de nivel 2. De este modo, el ensamblaje de los niveles 2 se lleva a cabo de igual modo que en los niveles 1, utilizando los sitios de fusión dejados por el enzima *BpiI* (**Figura 14C**).

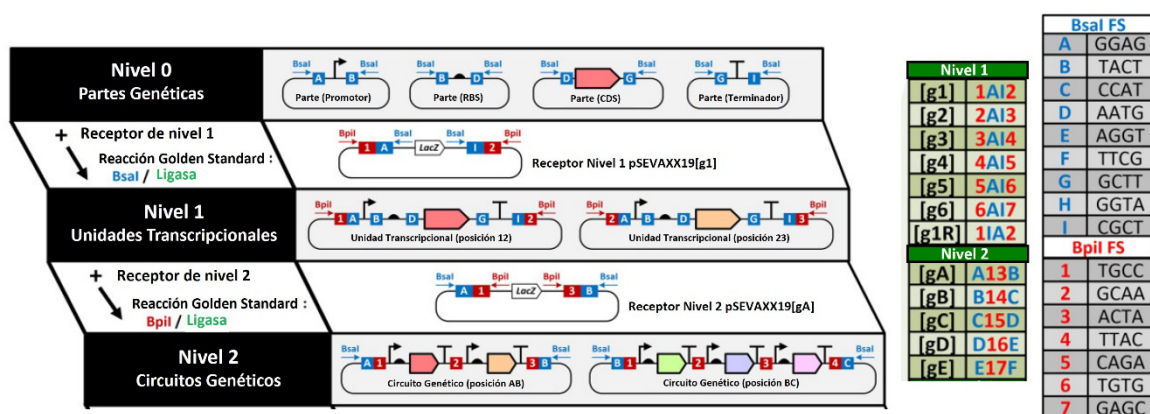


Figura 15. Representación del ensamblaje Golden Standard y los sitios de fusión para cada nivel y posición. Este ensamblaje abarca las partes genéticas básicas (niveles 0), que se ensamblan para generar unidades de transcripción (niveles 1), que a su vez pueden ensamblarse en circuitos genéticos más complejos (niveles 2). FS, sitios de fusión [Figura adaptada de Blázquez et al., 2023].

Al adherirse la plataforma GS a la arquitectura SEVA, los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción de tipo IIS, los sitios de fusión para el ensamblaje, y el gen *lacZ* (que posteriormente quedará reemplazado por los genes a expresar), constituyen parte del módulo "carga", por lo que se encontrarán

flanqueados por los sitios de restricción *PacI-SpeI*. En este sentido, también es recomendable eliminar de las partes genéticas los sitios de restricción únicos que definen los diferentes módulos de los vectores SEVA (Silva-Rocha et al., 2013).

3.2.3. Técnicas de mutación. CRISPR/Cas9

Además de la expresión heteróloga de rutas metabólicas, existen estrategias que también permiten realizar ingeniería en el organismo hospedador para la mutación (deleción e/o inserción) de secuencias de ADN. Una técnica eficaz y novedosa para hacer ingeniería genética en *Streptomyces* spp. es el sistema CRISPR/Cas9 (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas/proteína 9 asociada a CRISPR).

De forma natural los sistemas CRISPR/Cas funcionan como un sistema inmune adaptativo en numerosas bacterias y arqueas. Éstas, tras la primera infección por un bacteriófago, añaden un pequeño fragmento del genoma de ese fago a su ADN. De este modo, poseen una librería de fragmentos de bacteriófagos por los que han sido previamente infectados, y a los que se llama “secuencias espaciadoras” (de unos 20 nt), encontrándose estas separadas por “secuencias repetidas” (de ahí el nombre del sistema) (**Figura 16**). Estas secuencias CRISPR tienen la finalidad de ayudar a las proteínas Cas al reconocimiento y escisión del ADN exógeno contenedor de esa secuencia en particular tras una segunda y posteriores infecciones. El sistema CRISPR/Cas tiene una alta especificidad y precisión con respecto a la secuencia objetivo, por lo que se ha convertido en una excelente opción para la edición precisa del genoma (Tao et al., 2018).

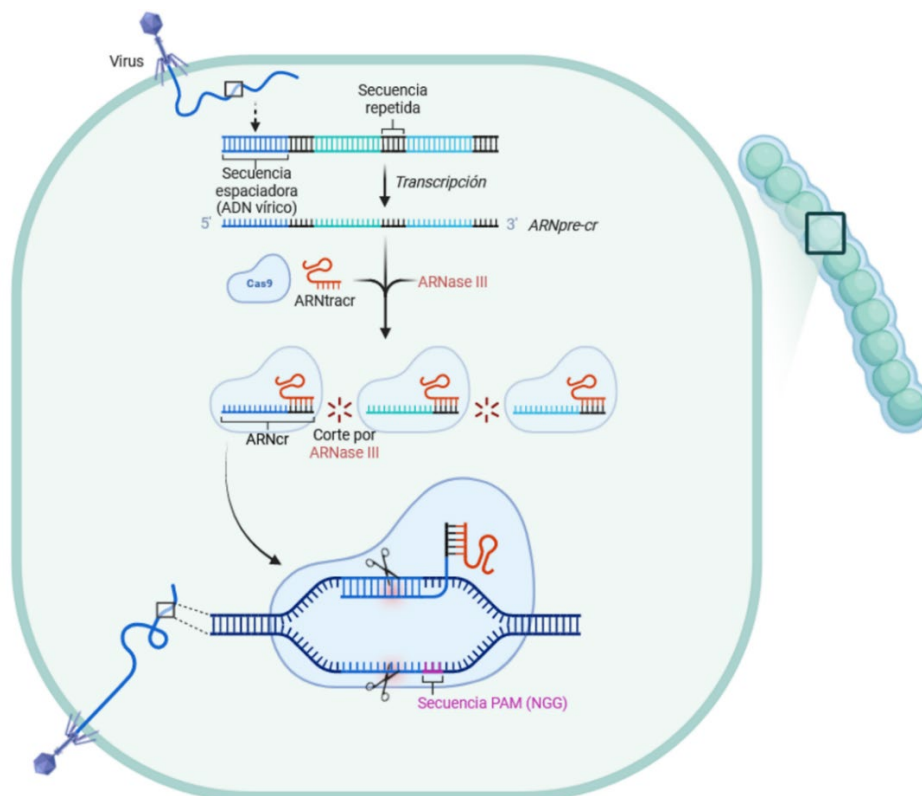


Figura 16. Representación del funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* [Figura elaborada con Biorender].

Más en concreto, el sistema CRISPR/Cas9, un sistema CRISPR/Cas de tipo II, emplea 3 componentes: la nucleasa Cas9 (frecuentemente de *Streptococcus pyogenes*, *SpCas9*); un ARN CRISPR (ARNcr), que es la “secuencia espaciadora” que confiere la especificidad del sitio de corte; y un ARN CRISPR transactivante (ARNtracr), que es un ARN corto que facilita el procesamiento del ARNcr y el reclutamiento de la Cas9 (**Figura 16**). El ARNcr y el ARNtracr forman una pareja que, a su vez, forma un complejo junto con la endonucleasa Cas9, la cual será guiada para el reconocimiento y corte del ADN exógeno (protoespaciador) (Hsu et al., 2014; Jinek et al., 2012) (**Figura 16**). Para que tenga lugar el corte en la secuencia protoespaciadora del ADN exógeno, complementaria a la “secuencia espaciadora”, ésta ha de poseer en el extremo 3' una secuencia de 3 nt llamada PAM (motivo adyacente protoespaciador). Esta secuencia PAM, en el caso de *S. pyogenes*, es 5'-NGG, donde N representa cualquier nt (Mojica et al., 2009) (**Figura 16**). La elevada proporción en contenido G/C presente en el genoma del género *Streptomyces* hace que esta secuencia PAM ofrezca una amplia disponibilidad de potenciales secuencias protoespaciadoras.

Una reprogramación de este sistema para su aplicación práctica en edición genómica, fusiona el ARNcr y el ARNtracr en una única guía de ARN sintética (ARNsg), lo cual facilita en gran medida la preparación de los transcritos, mejorando así la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 (Hsu et al., 2014; Jinek et al., 2012). Esta técnica ha sido utilizada exitosamente en varios organismos, como *S. cerevisiae* (Dicarlo et al., 2013), *Drosophila melanogaster* (Gratz et al., 2013), *Caenorhabditis elegans* (Friedland et al., 2013), plantas (Jiang et al., 2013) y embriones humanos (Baltimore et al., 2015).

En el género *Streptomyces* la primera aplicación de este sistema CRISPR/Cas9 para la edición del genoma tuvo lugar en 2015 (Cobb et al., 2015). En esta primera aplicación se utilizó el vector pCRISPomyces-2 equipado con la nucleasa *SpCas9* bajo el control de un promotor fuerte, el ARNsg, y un marco de reparación homólogo (HRT) de 2 kilobases (kb). De esta manera, la Cas9 realiza un corte específico de doble cadena en el sitio diana del genoma de *Streptomyces* spp. dirigida por el ARNsg (portador de la “secuencia espaciadora” diseñada) (**Figura 17A**). Ese corte será posteriormente reparado por reparación dirigida por homología (HDR) gracias a la presencia del HRT, introduciendo, en su caso, la delección y/o la inserción deseadas. En la literatura existen numerosos ejemplos de delecciones, inserciones y mutaciones puntuales ejecutadas en cepas del género *Streptomyces* mediante esta técnica (Huang et al., 2015; Jia et al., 2017; Tong et al., 2015; Wang et al., 2016; Zeng et al., 2015; Zhang et al., 2017).

La Cas9 contiene dos dominios nucleasa, RuvC1 y HNH, que son los responsables del corte de doble cadena en la secuencia protoespaciadora (Jinek et al., 2012). La introducción de dos mutaciones en esos dominios (D10A y H840A respectivamente) genera una Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) que carece de actividad nucleasa, manteniendo la capacidad de unión al ADN (**Figura 17B**). Así, si se guía a la dCas9 a la región promotora o codificante de un gen objetivo, el inicio de la transcripción o la elongación, respectivamente, se van a ver bloqueados (Qi et al., 2013). Este sistema de represión transcripcional CRISPR/dCas9, conocido como CRISPR de interferencia (CRISPRi), ha sido utilizado en *S. coelicolor* para reprimir la transcripción de genes (Tong et al., 2015; Zhao et al., 2018).

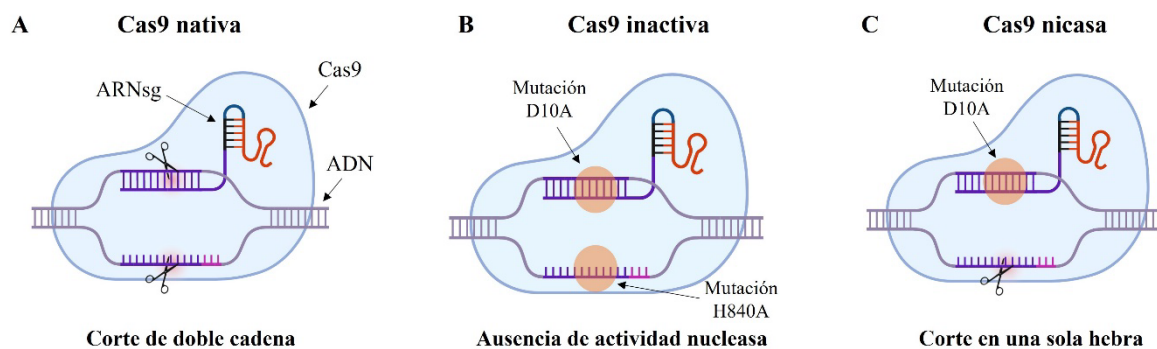


Figura 17. Comparativa de las diferentes versiones de la endonucleasa Cas9: **A)** Cas9 nativa, **B)** Cas9 inactiva, portadora de las mutaciones D10A y H840A en los dominios catalíticos RuvC1 y HNH, respectivamente y **C)** Cas9 nicasa, portadora de la mutación D10A en el dominio catalítico RuvC1 [Figura elaborada con BioRender].

Otra estrategia consiste en mutar solo uno de esos dominios catalíticos, dando lugar a una Cas9 nicasa capaz de cortar solo en una de las hebras de ADN (**Figura 17C**). Esta técnica ha sido aplicada con el fin de evitar la toxicidad asociada a la Cas9 o la letalidad que suponen los cortes de doble cadena (Xu et al., 2015).

4. Estrategias de optimización de la producción de flavonoides y otros compuestos bioactivos o metabolitos secundarios

En los últimos tiempos, más allá de continuar con la generación de nuevos tipos de flavonoides por biosíntesis heteróloga, se ha trabajado arduamente en estrategias de mejora que permitan incrementar sus niveles de producción, con el fin de permitir el escalado del proceso a nivel industrial. Estas estrategias incluyen la eliminación de cuellos de botella y puntos de inhibición por retroalimentación negativa, el incremento en la disponibilidad de precursores, el bloqueo de rutas competitivas, la optimización de las condiciones de cultivo, la optimización enzimática, etc. Muchas de estas estrategias también resultan de utilidad en la biosíntesis o expresión de otros compuestos bioactivos tanto nativos como heterológamente expresados.

4.1. Optimización de las condiciones de cultivo

La optimización de las condiciones de cultivo es la primera estrategia a tener en cuenta como punto de partida tanto para producción heteróloga como para la biosíntesis de compuestos endógenos. La optimización a este nivel ha constituido un objeto frecuente de estudio a lo largo del tiempo, ya que se encuentra muy ligado tanto al organismo utilizado como al compuesto objetivo (Arul-Jose et al., 2013; Bhavana et al., 2014; Ju et al., 2017; Khalilvand et al., 2022; Yee y Blanch, 1993).

En referencia a la producción de flavonoides en particular, en un estudio con *E. coli* como hospedador heterólogo, se emplearon de forma efectiva varias estrategias de optimización secuenciales de las

condiciones de cultivo (selección de cepa, uso de diferentes concentraciones del inductor IPTG, el ajuste en el tiempo de adición de la suplementación, así como diferentes combinaciones de medios de cultivo) para el aumento en la eficiencia en la producción de trilobatina, un flavonoide glicosilado (Nawade et al., 2020). En otro estudio se optimizaron las condiciones de fermentación (temperatura, pH y tiempo de incubación) y las concentraciones de las fuentes de carbono y de nitrógeno del medio de cultivo para conseguir un incremento en la producción de naringenina en *E. coli* (Zhou et al., 2020). El mismo método de optimización secuencial de las condiciones de cultivo fue utilizado para incrementar la producción de flavonoides por parte del hongo *Trametes lactinea*. En esta ocasión, se tuvieron en consideración el medio de cultivo, el pH, el inóculo inicial, la temperatura y el tiempo de incubación (Yahaya y Don, 2014). El acondicionamiento de esporas se confirmó en *S. albidoflavus* J1074 como un método para acelerar la tasa de producción de flavonoides (Marín et al., 2017). En este proceso, un cultivo inicial con alta densidad celular fuerza la germinación de las esporas, la muerte programada del MI y la diferenciación de los segmentos MI viables en MII productor de metabolitos secundarios (Manteca et al., 2008). También en *Streptomyces* spp., otros estudios han mostrado al almidón y al extracto de levadura como las fuentes preferidas de carbono y nitrógeno, respectivamente, para la producción de metabolitos secundarios; mientras que el rango de pH óptimo varía entre 6 y 8, con los iones de hierro actuando como el mejor metal (Barbuto Ferraiuolo et al., 2021; Souagui et al., 2018). Otro ejemplo de optimización a este nivel se observa en la levadura *Y. lipolytica* en relación a la mejora en la biosíntesis heteróloga de naringenina, eriodictiol y taxifolina desde glucosa, tras la optimización de la ratio carbono/nitrógeno (importante para la regulación de los flujos de acetyl-CoA y NADPH) y del ajuste del pH del medio utilizado (Lv et al., 2019).

4.2. Suplementación con precursores metabólicos e intermediarios de ruta

La adición de precursores de rutas de flavonoides a los cultivos, tales como aminoácidos aromáticos o sus derivados fenilpropanoides, representa un método sencillo, rápido y altamente útil para la detección de potenciales cuellos de botella en la producción, sujetos a optimización. Por su parte, la suplementación con intermediarios de ruta facilita la evaluación de la funcionalidad de enzimas de expresión heteróloga, que ocupan una posición tardía en la ruta de los flavonoides. Este enfoque prescinde de la necesidad inicial de modular las rutas biosintéticas, simplificando así el proceso de manera significativa.

El uso de estos precursores está ampliamente descrito en la literatura. La suplementación con L-fenilalanina aumentó la producción de ácido *p*-cumárico en *S. cerevisiae* (Trantas et al., 2009). Numerosas investigaciones en *E. coli* han documentado la producción de naringenina tras la suplementación con L-tirosina, previa introducción de los genes pertinentes (Wu et al., 2021, 2015, 2014). Entre estos estudios se describe un incremento de hasta 5 veces en la producción de naringenina y de pinocembrina tras la adición de L-tirosina y L-fenilalanina, respectivamente, al medio de cultivo (Hwang et al., 2003). Además, la suplementación con ácido cinámico o ácido *p*-cumárico mejoró la producción de naringenina tanto en *E. coli* (Fowler et al., 2009; Leonard et al., 2007; Xu et al., 2011) como en *S. cerevisiae* (Trantas et al., 2009; Yan et al., 2005). De manera similar, la suplementación con ácido cinámico permitió la producción

de pinocembrina en una cepa de *E. coli* capaz de expresar los enzimas 4CL, CHS y CHI (Leonard et al., 2007); mientras que la producción de eriodictiol en *E. coli* se logró mediante la adición de L-tirosina (Zhu et al., 2014) o de ácido cafeico (Dunstan et al., 2020; Fowler et al., 2009; Leonard et al., 2007). También el kaempferol (Miyahisa et al., 2006; Trantas et al., 2009) y la quercetina (Leonard et al., 2006; Trantas et al., 2009) han sido producidos por cepas de *E. coli* y *S. cerevisiae* tras la adición de ácido *p*-cumárico.

En cuanto a la suplementación con intermediarios de ruta, la miricetina ha sido producida de forma heteróloga tras la adición exógena de naringenina a una cepa de *E. coli* portadora de una ruta de biosíntesis incompleta (Leonard et al., 2006). En una cepa modificada de la bacteria *S. albidoflavus* se han conseguido incrementar los niveles *de novo* de apigenina mediante la suplementación con el precursor naringenina (Marín et al., 2017). Además, se comprobó la funcionalidad de los genes correspondientes a dos enzimas necesarios para la transformación de naringenina en kaempferol, en una cepa modificada de *S. venezuelae*, a través de la adición de naringenina (Park, 2010).

Sin embargo, el principal inconveniente de la suplementación con estos precursores y/o intermediarios es que algunos resultan económicamente poco viables si el objetivo es la producción a gran escala, como puede ser el ejemplo del ácido *p*-cumárico. En este sentido, la creación de cepas optimizadas enzimáticamente tanto para el incremento en la producción como en el uso eficiente de precursores intracelulares baratos, como la L-tirosina o la glucosa, ha sido objeto de estudio en los últimos tiempos para la mejora en la producción de flavonoides (Santos et al., 2011; Tariq et al., 2023).

4.3. Expresión o represión de rutas de precursores metabólicos

La biosíntesis *de novo* a partir de una única fuente de carbono, como la glucosa, sería el enfoque más rentable para la producción de flavonoides. Sin embargo, esto se ve impedido por el insuficiente suministro de precursores (principalmente de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina, y del metabolito malonil-CoA), debido a la estricta regulación de las vías biosintéticas de estos compuestos en los microorganismos hospedadores (Isogai et al., 2022). Uno de los mayores inconvenientes en el diseño de procesos para la producción de metabolitos secundarios es la falta de conocimiento de la complicada red reguladora de los genes (Barbuto Ferraiuolo et al., 2021). Por ello, los principales esfuerzos están actualmente volcados en superar estas limitaciones a través del uso de ingeniería metabólica sobre las rutas biosintéticas de precursores. De este modo, los principales métodos utilizados para el incremento en la biosíntesis intracelular de los precursores de ruta son, por un lado, la delección de agrupamientos génicos endógenos, así como la inhibición de rutas consumidoras de estos precursores en común con las rutas de biosíntesis de flavonoides y, por otro lado, la sobreexpresión de enzimas endógenos o expresión de enzimas exógenos, que den lugar a un aumento en dichos precursores.

4.3.1. Sobreexpresión de enzimas endógenos y expresión de enzimas exógenos

Uno de los factores que dificultan tanto la producción de flavonoides como de otros compuestos bioactivos en organismos recombinantes es la baja concentración intracelular de malonil-CoA (Tariq et

al., 2023). Su aporte es frecuentemente considerado el principal cuello de botella en la ruta fenilpropanoide, debido al requerimiento de 3 moléculas de este metabolito por parte del enzima CHS para dar lugar a la chalcona de naringenina (Santos et al., 2011) (**Figura 1**). En este sentido, numerosos intentos se han llevado a cabo para intentar desarrollar estrategias que permitan incrementar el aporte de este importante metabolito.

En microorganismos, la biosíntesis endógena de malonil-CoA se lleva a cabo a partir del acetil-CoA por medio del complejo enzimático ACCasa (**Figura 18**). La sobreexpresión de este complejo ha sido por tanto una de las vías más comunes para conseguir incrementos en la cantidad intracelular de malonil-CoA. De este modo, se ha conseguido mejorar la biosíntesis heteróloga de naringenina (Du et al., 2020; Leonard et al., 2007; Lv et al., 2019; Wu et al., 2021; Xu et al., 2011), pinocembrina (Cao et al., 2016; Kim et al., 2014; Leonard et al., 2007) y eriodictiol (Leonard et al., 2007; Zhu et al., 2014) tanto en *E. coli* como en levaduras. Para maximizar la biosíntesis de malonil-CoA, la expresión de este complejo ha de ir en combinación con la expresión del gen *birA*, codificante de una biotina ligasa, ya que el dominio carboxilasa del complejo ACCasa requiere biotinilación. Sin embargo, la suplementación con biotina convierte esta técnica en económicamente poco viable para producciones a gran escala (Fowler et al., 2009; Lv et al., 2019). El uso de esta estrategia también está descrito en especies del género *Streptomyces*. En *S. coelicolor* se incrementó la biosíntesis del antibiótico actinorrodina por sobreexpresión del operón ACCasa nativo (Ryu et al., 2006). En *S. venezuelae* se consiguió el incremento en la biosíntesis heteróloga de diversos policetonidos tras la expresión de la ACCasa de *S. coelicolor* (Maharjan et al., 2010), mientras que, de igual manera, en *S. albidoflavus* se observó un aumento en la producción de la flavona apigenina (Marín et al., 2018).

La sobreexpresión de enzimas que llevan a un aumento en la biosíntesis de acetil-CoA desde piruvato o acetato (**Figura 18**) ha sido otro método usado tanto en *E. coli* (Fowler et al., 2009; Fowler y Koffas, 2009; Leonard et al., 2007; Xu et al., 2011; Zhu et al., 2014) como en *S. cerevisiae* (Liu et al., 2017) con el fin de incrementar el malonil-CoA, consiguiendo aumentos en las producciones de pinocembrina, naringenina y eriodictiol. Esta técnica resulta especialmente efectiva cuando se usa en combinación con la sobreexpresión del enzima ACCasa (Leonard et al., 2007; Zhu et al., 2014). En este contexto, se ha descrito en levadura (*Y. lipolytica*) la eficiencia de la sobreexpresión del enzima acetil-CoA-sintetasa (ACS) para el reciclado de acetato en acetil-CoA (**Figura 18**), con el objetivo de incrementar la producción de naringenina, eriodictiol y taxifolina (Lv et al., 2019). Además, la sobreexpresión del enzima pantotenato-quinasa (PanK), que incrementa la disponibilidad de CoA, se ha demostrado efectiva en *E. coli* (Fowler et al., 2009) y *S. cerevisiae* (Liu et al., 2017) para el incremento en la biosíntesis de naringenina (**Figura 18**).

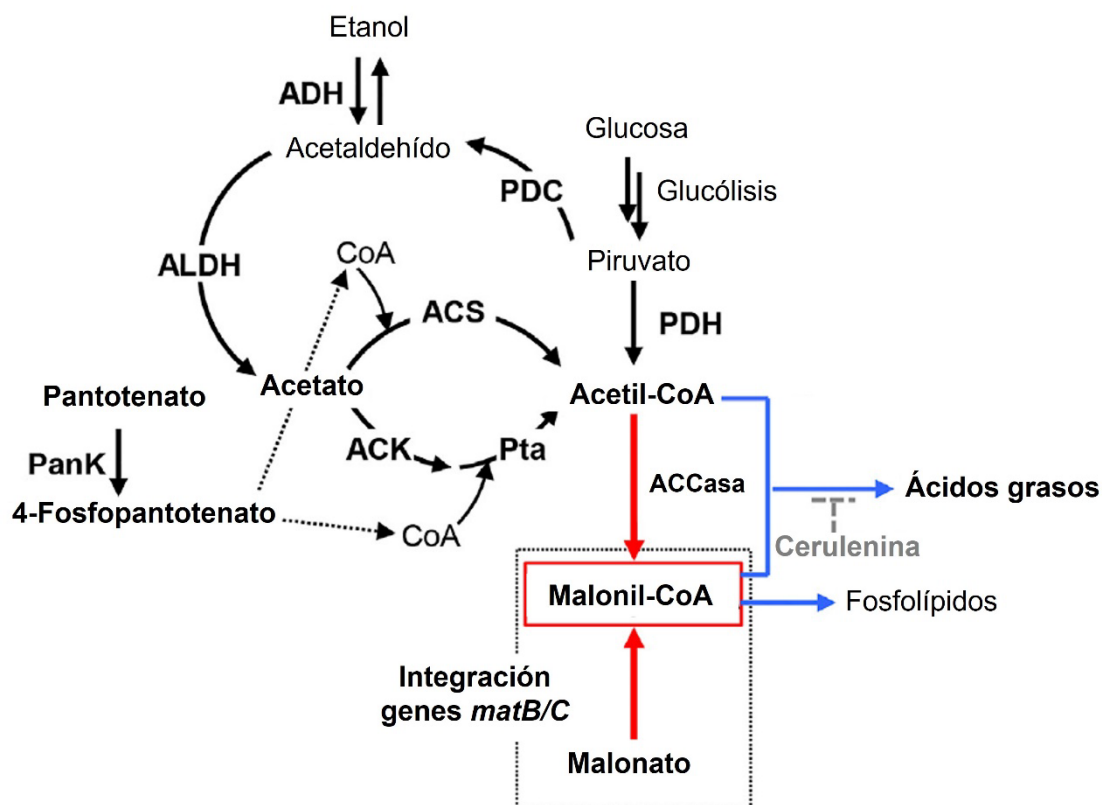


Figura 18. Biosíntesis de malonil-CoA. El malonil-CoA endógeno es sintetizado desde acetil-CoA por la ACCasa. La expresión de los genes *matB/C* da lugar al transporte de malonato a la célula y la consiguiente formación de malonil-CoA. El acetil-CoA es sintetizado por el complejo PDH desde piruvato y por la ACS desde acetato en *S. cerevisiae*. Además de las anteriores, en *E. coli* se usa la ruta ACK-Pta desde acetato. PanK cataliza la fosforilación del pantotenato a 4-fosfopantotenato, un precursor del CoA. Las flechas rojas representan las dos reacciones enzimáticas clave para el incremento directo en el malonil-CoA intracelular. Las flechas azules indican rutas de consumo de acetil-CoA y malonil-CoA en la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos. La cerulenina inhibe la síntesis de ácidos grasos, tal como indica la línea gris discontinua. ACCasa, acetil-CoA-carboxilasa; MatC, proteína transportadora de malonato al interior celular; MatB, malonil-CoA-sintetasa; PDH, piruvato-deshidrogenasa; ACS, acetil-CoA-sintetasa; ACK, acetato-quinasa; Pta, fosfato-acetiltransferasa; PanK, pantotenato-quinasa [Figura adaptada de Isogai et al., 2022].

Otra de las estrategias, ampliamente utilizadas para el incremento en la biosíntesis de malonil-CoA intracelular en hospedadores heterólogos, ha sido el uso de una vía de derivación sintética, en la que los genes *matC* y *matB* de *Rhizobium trifolii* (Figura 18) son integrados en el genoma del organismo productor. Estos genes codifican respectivamente para una proteína transportadora de malonato al interior celular y una malonil-CoA-sintetasa, encargada de sintetizar malonil-CoA desde malonato y CoA. La co-expresión de estos dos genes para el incremento en la cantidad de malonil-CoA intracelular tras la suplementación con malonato ha demostrado ser efectiva en *E. coli*, resultando en aumentos en la producción de varias flavanonas, incluido un incremento de hasta el 250% en la biosíntesis de naringenina (Fowler y Koffas, 2009; Leonard et al., 2008; Santos et al., 2011; Wu et al., 2014; Zhu et al., 2014). Su uso está descrito también en la bacteria *Corynebacterium glutamicum* como hospedador heterólogo para la biosíntesis de eriodictiol desde L-tirosina (Wu et al., 2022). Esta estrategia fue aplicada también de manera efectiva en *S. coelicolor* para conseguir un incremento del 300% en la producción de macrolactonas (Lombó et al., 2001). Adicionalmente, se consiguió incrementar la biosíntesis de

pinocembrina y naringenina en *S. venezuelae* en 6 y 7 veces, respectivamente, en comparación con la cepa carente de estos genes (Park et al., 2011).

4.3.2. Delección o inhibición de genes y/o agrupamientos génicos

La redirección del malonil-CoA desde la ruta de biosíntesis de ácidos grasos a las rutas de expresión de flavonoides ha sido una estrategia ampliamente utilizada para el incremento en la disponibilidad de este metabolito en las células. Con el fin de inhibir esta ruta de consumo de malonil-CoA se ha utilizado el antifúngico cerulenina (**Figura 18**). La cerulenina es un inhibidor no competitivo de las sintasas de ácidos grasos FabB y FabF, que actúa directamente bloqueando la actividad β -cetoacil tioéster sintasa de este complejo enzimático y, por consiguiente, la condensación de las unidades de malonil-CoA que dan lugar a la formación de ácidos grasos (Isogai et al., 2022). Gracias a su uso se consiguió incrementar la biosíntesis de pinocembrina, naringenina y eriodictiol en *E. coli* (Cao et al., 2016; Dunstan et al., 2020; Fowler et al., 2009; Fowler y Koffas, 2009; Leonard et al., 2008; Santos et al., 2011). La cerulenina fue ensayada con éxito en *S. griseus* también en la inhibición de la biosíntesis de candicinas, ya que éstas son sintetizadas a través de la ruta de los policetónidos siguiendo reacciones de condensación similares a las ocurridas en la biosíntesis de ácidos grasos (Martin y McDaniel, 1975). Sin embargo, el alto coste de la cerulenina limita su uso de cara a producción a gran escala (Fowler et al., 2009).

Otra estrategia para lograr el incremento de malonil-CoA consiste en la inhibición del consumo de sus precursores, como el acetil-CoA o el piruvato. A este respecto, la delección de enzimas implicadas en rutas consumidoras de estos precursores en *E. coli* permitió el aumento en la disponibilidad de acetil-CoA, lo que a su vez resultó en un incremento de 3 veces en el aporte de malonil-CoA que, finalmente, se tradujo en un aumento proporcional en la biosíntesis de flavanonas (naringenina y eriodictiol) (Fowler et al., 2009). Esto fue posible gracias a la aplicación práctica de un modelo de flujos de carbono que permitió la identificación de potenciales genes a deleccionar, los cuales, debido a la lejanía con respecto al producto final (genes implicados en el ciclo de ácido cítrico o el transporte de aminoácidos), en un principio no constituirían objetivos intuitivos (Fowler et al., 2009). La regulación negativa basada en CRISPRi de la biosíntesis de ácidos grasos, el ciclo del ácido cítrico y la biosíntesis de etanol ha llevado a un aumento indirecto en el suministro intracelular de malonil-CoA por desvío del acetil-CoA, logrando aumentos significativos en la producción de naringenina, pinocembrina y eriodictiol en *E. coli*, *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica*, respectivamente (Lv et al., 2020; Wu et al., 2016; Wu et al., 2021, 2015).

Por otro lado, los BGCs endógenos encargados de la biosíntesis de metabolitos secundarios nativos, son consumidores de energía, cofactores y varios precursores, entre ellos el malonil-CoA, derivados de procesos metabólicos primarios. Se ha demostrado que la eliminación de estos BGCs nativos puede constituir una estrategia exitosa para el desvío de las reservas de malonil-CoA y otros precursores hacia compuestos específicos, como podrían ser los flavonoides, sin que se observe afectación alguna en relación al crecimiento, las características morfológicas, o la diferenciación celular de la factoría bacteriana elegida (Lee et al., 2019). Además, la ausencia del “ruido” que provoca la detección de estos

metabolitos nativos en los análisis por medio de métodos analíticos, como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), incrementa la probabilidad de detección de los nuevos compuestos expresados heterológicamente. En este contexto, se construyó en *S. albidoflavus* J1074 una cepa optimizada para expresión heteróloga de metabolitos secundarios por medio de la delección de 15 de estos agrupamientos génicos, muchos de ellos consumidores de malonil-CoA, permitiendo la identificación y el aislamiento de un nuevo compuesto (Myronovskyi et al., 2018). También en *S. coelicolor* se construyó una cepa libre de actividad antibiótica nativa por eliminación de 4 de estos agrupamientos, lo cual resultó en un aumento drástico en la producción heteróloga de otros antibióticos como el cloranfenicol (Gomez-Escribano y Bibb, 2011). La delección de todas las PKS nativas de la cepa *S. coelicolor* ZM12 permitió la expresión heteróloga de las galbonolidas, una familia de antibióticos aislados de un actinomiceto marino, a través de la reducción de la competencia por precursores (Liu et al., 2015). Como estos, multitud de ejemplos adicionales se pueden encontrar en la literatura referidos al aumento en la producción de metabolitos secundarios bioactivos, nativos o heterólogos, tras la eliminación de uno o varios de estos agrupamientos génicos en especies del género *Streptomyces* (Bu et al., 2019; Kallifidas et al., 2018; Komatsu et al., 2013, 2010; Xu et al., 2016; Zhang et al., 2017).

4.4. Optimización enzimática

La producción heteróloga de compuestos bioactivos implica numerosas limitaciones, particularmente relacionadas con la expresión de enzimas involucrados en las rutas de biosíntesis. Para optimizar la producción de estos compuestos en factorías microbianas se han realizado extensos esfuerzos dirigidos a la mejora en la expresión de las rutas metabólicas introducidas.

La optimización de codones es una estrategia básica para permitir la correcta traducción de los genes en el organismo hospedador heterólogo (Lanza et al., 2014). La redundancia del código genético hace que un mismo aminoácido pueda estar representado por múltiples ARN de transferencia (ARNt). Este sesgo en el uso de codones hace que diferentes organismos favorezcan la abundancia de determinados ARNt en detrimento de otros. Por ejemplo, *S. albidoflavus* J1074, al poseer un genoma con alto contenido en G/C, favorecerá la presencia de ARNt con alto contenido G/C. De este modo, si un gen contiene codones que raramente se usan en el hospedador en el que se pretende la expresión de ese gen, su nivel de expresión se verá mermado, incluso pudiendo dar lugar a una proteína truncada. Debido al sesgo de codones entre las plantas, que constituyen los hospedadores nativos de los enzimas implicados en la biosíntesis de flavonoides, y los hospedadores microbianos receptores, la expresión de genes de la vía de los flavonoides en microorganismos heterólogos resulta a menudo difícil. Por eso resulta de gran importancia conocer el uso de codones del organismo hospedador heterólogo, para así poder adaptar y diseñar la secuencia de ADN del gen a expresar. En la literatura existen numerosos ejemplos de este tipo de optimización en diversos organismos en relación a la biosíntesis heteróloga de flavonoides (Cao et al., 2016; Marín et al., 2018, 2017; Mark et al., 2019; Santos et al., 2011; Yu et al., 2022; Zha et al., 2019).

Otro enfoque inicial es la selección adecuada de las fuentes genéticas para los diferentes enzimas de la ruta. Esta selección presenta un desafío considerable debido a la impredecible expresión y actividad de estos enzimas en un hospedador no nativo. Para abordar este problema es común recurrir a la literatura existente, con el fin de identificar enzimas que ya hayan demostrado ser efectivos en el mismo hospedador y sobre el mismo sustrato previstos para la expresión heteróloga, o bien, experimentar con diversas fuentes genéticas. En un estudio realizado en *E. coli* se optó por emplear el enzima 4CL de *S. coelicolor* para la biosíntesis de pinocebrina y de naringenina (Santos et al., 2011). Este enzima fue seleccionado debido a su capacidad demostrada para convertir eficientemente tanto el ácido *p*-cumárico como el ácido cinámico en sus respectivos CoA tioésteres. Paralelamente, en *S. cerevisiae* se implementaron diferentes estrategias experimentales, utilizando diferentes fuentes genéticas para identificar las variantes más eficaces de los enzimas 4CL y CHS, de modo que se permitiera maximizar la producción de naringenina (Mark et al., 2019), así como 5 fuentes genéticas diferentes del enzima F3H para el incremento en la biosíntesis heteróloga de taxifolina (Yu et al., 2022).

La funcionalidad de los enzimas en relación con el hospedador resulta también de gran importancia. Como se ha documentado anteriormente, las reacciones catalizadas por enzimas CYP, esenciales en las rutas de diversificación de los flavonoides, presentan desafíos significativos para su uso en bacterias como factorías de producción de estos compuestos. Entre estos retos se incluye la presencia de un péptido señal que localiza a estos enzimas en la membrana del retículo endoplásmico de las células de las plantas, el cual puede no ser reconocido por los organismos procariontas, dando lugar a plegamientos aberrantes de la proteína resultante (Zha et al., 2019). La asociación de estos enzimas a esa membrana, ausente en procariontas, y su requerimiento de poder reductor proveniente de una CPR, han sido abordados mediante el diseño de quimeras (Leonard et al., 2006; Zhu et al., 2014). De este modo, en *E. coli* se ha conseguido la producción de eriodictiol a partir de naringenina, a través del diseño de una quimera funcional entre el enzima F3'H y una CPR (Zhu et al., 2014). De manera similar, con la construcción de una quimera entre el enzima F3'5'H y una CPR se ha conseguido la biosíntesis de miricetina a partir de kaempferol (Leonard et al., 2006). El grupo de Li reconstruyó por primera vez la ruta artificial para la producción de las flavonas escutellareína y baicaleína, a partir de L-tirosina y L-fenilalanina, añadiendo a la ruta de biosíntesis de apigenina/chrisina una quimera generada entre una F6H y una CPR (Li et al., 2019). Por su parte, se ha conseguido la biosíntesis de genisteína a partir de naringenina por la introducción de una quimera IFS/CPR (Kim, 2020). Estas quimeras convierten los enzimas naturalmente unidos a la membrana en sus versiones libres citosólicas, a través de la eliminación de los dominios transmembrana tanto de la CYP como de la CPR, y su posterior fusión en una única proteína. El uso de la fusión de enzimas también está descrito con el fin de maximizar la concentración local de sustrato, permitiendo que las reacciones sucedan de manera más eficiente, o como medio para evitar la degradación de intermediarios inestables, o la reducción de sus efectos tóxicos (Zha et al., 2019).

La optimización de las rutas metabólicas es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la expresión genética en ingeniería metabólica. Esta optimización puede incluir ajustes en el nivel de expresión genética mediante la selección de promotores (Cao et al., 2016; Gao et al., 2020; Liu et al., 2018; Sohoni

et al., 2014; Yu et al., 2022), así como la calibración de la dosis génica (Li et al., 2021; Lv et al., 2019). El equilibrio del flujo metabólico constituye una parte esencial en el diseño de rutas metabólicas eficientes. En algunos casos, la acumulación excesiva de intermediarios puede comprometer la viabilidad celular o inducir respuestas regulatorias negativas. Además, la sobreexpresión de ciertos genes puede generar estrés celular debido a la carga metabólica aumentada (Lv et al., 2019; Phelan et al., 2017). Diversas investigaciones han demostrado que cepas de *E. coli* productoras de flavonoides, presentan una mayor estabilidad genética y funcional cuando se utilizan vectores de bajo número de copias, en comparación con vectores de alto número de copias, especialmente cuando los genes se encuentran regulados por promotores fuertes (Jones et al., 2000; Leonard et al., 2006). En el contexto de las levaduras, el balance de la dosis génica del enzima CHS ha resultado ser crucial (Jiao et al., 2019; Koopman et al., 2012; Li et al., 2021; Lv et al., 2019; Wang et al., 2020) dada la baja eficiencia catalítica de este enzima (Koopman et al., 2012). Asimismo, la relación entre el enzima F3'H y la CPR es otro factor significativo a considerar a la hora de lograr una biosíntesis efectiva de flavonoides (Lv et al., 2019).

4.5. Biosíntesis combinatoria (co-cultivos)

La expresión de rutas metabólicas extensas en un solo organismo frecuentemente conduce a una serie de desafíos, incluyendo desequilibrios metabólicos, dificultades para satisfacer los requisitos óptimos de todos los enzimas involucrados en la ruta, aumento en la carga metabólica, y la acumulación de productos secundarios no deseados. Estos factores pueden complicar significativamente la mejora en el rendimiento del producto final deseado (Kim, 2020; Thuan et al., 2018; Wang et al., 2020). En este contexto, los co-cultivos que implican el uso de dos o más cepas del mismo o de diferentes organismos se han desarrollado como una estrategia para reconstruir rutas biosintéticas, mitigando los problemas mencionados, así como posibles cuellos de botella (Thuan et al., 2022, 2018; Wu et al., 2016).

Esta aproximación ofrece una ventaja significativa para aliviar los intensos esfuerzos de ingeniería y optimización requeridos para la expresión heteróloga en una sola cepa de largas e intrincadas rutas biosintéticas, como es el caso de la biosíntesis de productos naturales vegetales como los flavonoides (Wang et al., 2020). Por ejemplo, los co-cultivos microbianos han sido empleados recientemente para la producción de flavonoides complejos. Un co-cultivo eficiente entre dos cepas de *E. coli* fue implementado para la producción de sakuranetina a partir de glucosa, donde la primera cepa avanzaba la biosíntesis hasta el ácido *p*-cumárico, mientras que la segunda transformaba este intermedio en sakuranetina (Wang et al., 2020). Este enfoque también facilitó en otro estudio una producción 2,5 veces superior de eriodictiol en comparación con monocultivos en *E. coli* (Thuan et al., 2022).

La regioespecificidad de un enzima OMT de *S. avermitilis*, capaz de metilar diversos sustratos, como flavanonas, flavonas y estilbenos, fue investigada utilizando un enfoque de co-cultivo. Este sistema incluyó cepas de *E. coli* diseñadas para producir específicamente naringenina y apigenina de manera independiente. Además, se incorporó una cepa de *S. venezuelae* modificada para expresar heterológicamente la OMT mencionada. Este diseño de co-cultivo permitió una exploración eficaz de la

capacidad enzimática de la OMT para interactuar con diferentes sustratos flavonoides, facilitando un análisis detallado de la regioespecificidad enzimática en un contexto heterólogo (Cui et al., 2019). De manera similar, un co-cultivo entre dos cepas de *S. albidoflavus* J1074 logró un aumento en la producción del flavonoide metilado genkwakina, tras la identificación y superación de un cuello de botella relacionado con la flexibilidad de sustrato del enzima OMT utilizado (Pérez-Valero et al., 2023).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los flavonoides han demostrado ejercer numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, sin embargo, su extracción a partir de las plantas, su fuente natural, resulta laboriosa y requiere una importante inversión de tiempo y dinero. Por ello, la expresión heteróloga de las rutas de biosíntesis de flavonoides en factorías microbianas se ha convertido en una estrategia rápida y económica, que en los últimos años ha emergido como un extenso campo de investigación.

El género *Streptomyces* spp. ha sido propuesto entre los hospedadores óptimos para la expresión heteróloga de flavonoides, gracias al amplio abanico de precursores en común las rutas de biosíntesis de estos compuestos que poseen. Más en concreto, la especie *Streptomyces albidoflavus* J1074 tiene ciertas características que la hacen destacar como hospedador heterólogo por encima del resto de especies del género. Sin embargo, los rendimientos de producción heteróloga de flavonoides en esta especie se han mantenido notablemente bajos, presumiblemente debido a la disponibilidad limitada de precursores y cofactores, estos destinados a la biosíntesis de compuestos nativos, y/o a la falta de optimización a nivel enzimático y de ruta de los genes heterológamente expresados. Sumado a esto, la falta de estandarización de las herramientas de Biología Sintética de uso en este género, tanto para la expresión génica como para la edición del genoma, hace que los avances experimentados tengan lugar de manera más lenta.

Además, el análisis del potencial antiinflamatorio de los flavonoides adquiere una especial relevancia, considerando la influencia del proceso inflamatorio crónico en el desarrollo y avance de diversas enfermedades.

Por tanto, el **objetivo general** de esta tesis ha sido la estandarización de vectores de clonación, como herramienta de ingeniería genética dentro del marco de la Biología Sintética, para la edición del genoma y la expresión génica en actinomicetos, así como su aplicación dirigida a la biosíntesis heteróloga de flavonoides y a la mejora en su producción. Adicionalmente, se han estudiado otros objetivos secundarios en relación con el potencial antiinflamatorio de los flavonoides.

Objetivo 1. Desarrollo de una colección de vectores bifuncionales *E. coli*/*Streptomyces* basada en la arquitectura SEVA para la expresión génica mediante el ensamblaje Golden Standard y para la edición del genoma por el sistema CRISPR/Cas9. Aplicación práctica en el organismo *S. albidoflavus* J1074 para la biosíntesis heteróloga de flavonoides.

Capítulo 1. Magadán-Corpas, P., Ye, S., Pérez-Valero, Á., McAlpine, P.L., Valdés-Chiara, P., Torres-Bacete, J., Nogales, J., Villar, C.J., Lombó, F., 2023. Optimized *De Novo* Eriodictyol Biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* Using an Expansion of the Golden Standard Toolkit for Its Use in Actinomycetes. Int J Mol Sci 24, 8879. <https://doi.org/10.3390/ijms24108879>

Objetivo 2. Biosíntesis y optimización de la producción de las flavanonas naringenina y eriodictiol en *S. albidoflavus* J1074.

En este objetivo se ha abordado la detección de cuellos de botella y la optimización en la producción de naringenina, como flavonoide central de rutas de diversificación, a través del ensayo de una serie de

estrategias aplicadas aditivamente. También se ha conseguido una mejora en la producción de eriodictiol abordando la problemática asociada a la expresión de las CYP en organismos procariontes, a través del diseño de una quimera hidroxilasa/reductasa, sumado al efecto de la edición del genoma.

Capítulo 1. Magadán-Corpas, P., Ye, S., Pérez-Valero, Á., McAlpine, P.L., Valdés-Chiara, P., Torres-Bacete, J., Nogales, J., Villar, C.J., Lombó, F., 2023. Optimized *De Novo* Eriodictyol Biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* Using an Expansion of the Golden Standard Toolkit for Its Use in Actinomycetes. *Int J Mol Sci* 24, 8879. <https://doi.org/10.3390/ijms24108879>

Capítulo 2. Ye, S., Magadán-Corpas, P., Pérez-Valero, Á., Villar, C.J., Lombó, F., 2023. Metabolic engineering strategies for naringenin production enhancement in *Streptomyces albidoflavus* J1074. *Microb Cell Fact* 22, 167. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02172-5>

Objetivo 3. Biosíntesis y optimización de la producción de los flavanoles aromadendrina y taxifolina en *S. albidoflavus* J1074.

En este objetivo se ha tratado de optimizar la expresión de otra hidroxilasa, en este caso una 2-OGD, implicada en la biosíntesis de ambos flavanoles, a través del ensayo de diferentes fuentes genéticas. Este enzima ha sido previamente caracterizado con baja eficiencia catalítica, además de poseer la capacidad de realizar dos posibles modificaciones sobre un mismo sustrato.

Capítulo 3. Magadán-Corpas, P., Ye, S., Braune, A., Villar, C.J., Lombó, F., 2024b. Optimization of flavanols heterologous biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus*, and generation of auronols. *Front Microbiol* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1378235>

Objetivo 4. Biosíntesis de los auronoles maesopsina y alfitonina en *S. albidoflavus* J1074.

En este objetivo se ha estudiado la producción de los auronoles maesopsina y alfitonina a partir de sus precursores directos, los flavanoles aromadendrina y taxifolina, por acción de un enzima CHI de la bacteria *Eubacterium ramulus* (*Er*CHI) perteneciente a la microbiota intestinal. La producción *de novo* de alfitonina se ha conseguido a través de la optimización enzimática y el establecimiento de un co-cultivo, estrategias que han permitido solventar la problemática asociada a la actividad de los enzimas y la estabilidad de los auronoles.

Capítulo 3. Magadán-Corpas, P., Ye, S., Braune, A., Villar, C.J., Lombó, F., 2024b. Optimization of flavanols heterologous biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus*, and generation of auronols. *Front Microbiol* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1378235>

Objetivo 5. Evaluación *in vivo* del potencial terapéutico de tres flavonoides (apigenina, luteolina y xanthohumol) en un modelo murino de colitis ulcerosa, asociado a la reducción de la inflamación y a la modulación de la microbiota intestinal.

Capítulo 4. Magadán-Corpas, P., Pérez-Valero, Á., Ye, S., Sordon, S., Huszcza, E., Popłoński, J., Villar, C.J., Lombó, F., 2024a. Gut Microbiota and Inflammation Modulation in a Rat Model





for Ulcerative Colitis after the Intraperitoneal Administration of Apigenin, Luteolin, and Xanthohumol. *Int J Mol Sci* 25, 3236. <https://doi.org/10.3390/ijms25063236>

RESULTADOS. Capítulo 1



Article

Optimized De Novo Eriodictyol Biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* Using an Expansion of the Golden Standard Toolkit for its use in Actinomycetes

Patricia Magadán-Corpas^{1,2,3†}, Suhui Ye^{1,2,3†} , Álvaro Pérez-Valero^{1,2,3} , Patrick L. McAlpine^{1,2,3} , Paula Valdés-Chiara^{1,2,3}, Jesús Torres-Bacete^{4,5}, Juan Nogales^{4,5}, Claudio J. Villar^{1,2,3} and Felipe Lombó^{1,2,3*} 

¹ Research Group BIONUC (Biotechnology of Nutraceuticals and Bioactive Compounds), Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

² IUOPA (Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias), 33006 Oviedo, Spain

³ ISPA (Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias), 33006 Oviedo, Spain

⁴ Department of Systems Biology, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, 28049 Madrid, Spain

⁵ Interdisciplinary Platform for Sustainable Plastics towards a Circular Economy-Spanish National Research Council (SusPlast-CSIC), 28040 Madrid, Spain

*Correspondence: lombofelipe@uniovi.es; Tel.: +34-985103593

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Magadán-Corpas, P.; Ye, S.; Pérez-Valero, Á.; McAlpine, P.L.; Valdés-Chiara, P.; Torres-Bacete, J.; Nogales, J.; Villar, C.J.; Lombó, F. Optimized De Novo Eriodictyol Biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* Using an Expansion of the Golden Standard Toolkit for Its Use in Actinomycetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8879. <https://doi.org/10.3390/ijms24108879>

Academic Editor: Jesús Osada



Received: 28 April 2023; Revised: 12 May 2023; Accepted: 15 May 2023; Published: 17 May 2023

Abstract: Eriodictyol is a hydroxylated flavonoid displaying multiple pharmaceutical activities, such as antitumoral, antiviral or neuroprotective. However, its industrial production is limited to extraction from plants due to its inherent limitations. Here, we present the generation of a *Streptomyces albidoflavus* bacterial factory edited at the genome level for an optimized de novo heterologous production of eriodictyol. For this purpose, an expansion of the Golden Standard toolkit (a Type IIS assembly method based on the Standard European Vector Architecture (SEVA)) has been created, encompassing a collection of synthetic biology modular vectors (adapted for their use in actinomycetes). These vectors have been designed for the assembly of transcriptional units and gene circuits in a plug-and-play manner, as well as for genome editing using CRISPR-Cas9-mediated genetic engineering. These vectors have been used for the optimization of the eriodictyol heterologous production levels in *S. albidoflavus* by enhancing the flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) activity (by means of a chimera design) and by replacing three native biosynthetic gene clusters in the bacterial chromosome with the plant genes *matBC* (involved in extracellular malonate uptake and its intracellular activation into malonyl-CoA), therefore allowing more malonyl-CoA to be devoted to the heterologous production of plant flavonoids in this bacterial factory. These experiments have allowed an increase in production of 1.8 times in the edited strain (where the three native biosynthetic gene clusters have been deleted) in comparison with the wild-type strain and a 13 times increase in eriodictyol overproduction in comparison with the non-chimera version of the F3'H enzyme.

Keywords: eriodictyol; naringenin; flavonoid; *Streptomyces*; synthetic biology; Golden Standard; CRISPR-Cas9; SEVA; chimaera

1. Introduction

Flavonoids are biologically active phytochemicals of enormous nutraceutical, pharmaceutical and agroindustrial relevance due to the vast array of properties they display [1,2,3]. Specifically, eriodictyol ((2S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)5,7-dihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-one), a natural flavanone, has been reported to possess antioxidant [4], antitumoral [5,6,7], antiviral [8], neuroprotective [9,10], anti-inflammatory [11], cardioprotective [12], anti-diabetes [13], anti-obesity [14] and immunomodulatory [15] properties. Apart from its evident therapeutic application, eriodictyol stands out for its application in other fields, such as cosmetics (as a photoprotector) [16] and the food industry (as a bitter-taste masking agent) [17,18].

Eriodictyol is naturally found in citrus fruits, some vegetables and medicinal plants such as *Eriodictyon californicum* [19,20]. However, its extraction from plants presents some major drawbacks, such as its low concentration in plant tissues and the expensive purification and separation procedures from the complex plant extracts [21].

As a promising industrial alternative, the development of metabolic engineering and synthetic biology tools has facilitated the heterologous production of eriodictyol in microbial cell factories, such as *Escherichia coli* [21,22], yeast [23,24], *Corynebacterium glutamicum* [25] and *Streptomyces albidoflavus* [26]. For this purpose, the biosynthetic gene cluster (BGC) of the compound must be assembled using synthetic genes from the natural plant source, adapted after some modifications (such as codon optimization), which enable its expression in the selected microbial host.

In the case of eriodictyol, five genes are necessary for its biosynthesis: a tyrosine ammonia-lyase (TAL) converts L-tyrosine to p-coumaric acid (p-CA), which is subsequently activated into coumaroyl-CoA by a 4-coumarate-CoA ligase (4CL). Then, one molecule of coumaroyl-CoA is condensed with three molecules of malonyl-CoA by chalcone synthase (CHS) to give rise to naringenin chalcone, which is then isomerized into naringenin via chalcone isomerase (CHI). Finally, naringenin is converted to eriodictyol by a flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), which is a membrane-bound cytochrome P450 monooxygenase [25,26].

The major challenge in the microbial biosynthesis of eriodictyol and other flavonoids is their low production efficiency, normally due to the limited availability of precursors and cofactors [21]. In this respect, many strategies have been adopted in order to increase the malonyl-CoA supply, with numerous examples of metabolic engineering favoring the metabolic fluxes of central carbon metabolism pathways towards malonyl-CoA [21,27,28], including the heterologous expression of *matBC* from *Rhizobium trifolii* to increase cytosolic malonyl-CoA upon exogenous malonate feeding [29,30]. Apart from that, the biosynthesis of hydroxylated flavonoids such as eriodictyol involves another limitation: the low activity associated with plant P450-related enzymes expressed in bacterial hosts [26]. These monooxygenases are membrane-bound enzymes anchored [28] to the endoplasmic reticulum in plant cells, and usually they require an associated P450 reductase coworker. This issue has been addressed in *E. coli* by creating a chimeric protein containing both a P450 hydroxylase and a reductase without their respective membrane-binding regions [21].

Among all the aforementioned microorganisms used as microbial cell factories for these polyphenols, *Streptomyces* is the only organism, apart from plants and some fungi, known to be able to produce flavonoids naturally [31,32]. These Gram-positive bacteria are known for their ability to produce a plethora of secondary metabolites, including malonyl-CoA-derived compounds. Currently, there are many metabolic engineering strategies that have been successfully applied to

Streptomyces to increase malonyl-CoA intracellular levels [33,34,35]. Of note is a strategy exclusive to this microbial host that consists of removing endogenous BGCs that use malonyl-CoA as a precursor as a way of channeling this cytosolic precursor toward the desired heterologously biosynthesized metabolite (e.g., a flavonoid) [36,37]. However, despite all these advantages, no reports have been found of metabolic engineering efforts made in *Streptomyces* in order to increase eriodictyol production.

In this work, a SEVA-based plasmid collection has been created for synthetic BGC assembly in *Streptomyces* and other actinomycetes using Golden Standard (GS) technology in a plug-and-play manner, as well as for host genomic editing using CRISPR-Cas9 techniques [38]. These tools have been applied for assembling the synthetic eriodictyol BGC into two individual integrative plasmids and for generating an edited version of the *S. albidoflavus* bacterial factory genome via CRISPR-Cas9. This genomic editing involved the replacement of three chromosomal BGCs (encoding malonyl-CoA-derived molecules) by *P_{ermE*}-matBC*. Finally, eriodictyol de novo production has been tested in wild-type (WT) and edited strains, validating the new *S. albidoflavus* edited strain as an eriodictyol overproducer.

2. Results

2.1. SEVA-Based Plasmid Library Design and Construction

A collection of SEVA modular shuttle vectors for *E. coli* and *Streptomyces* has already been developed by our group [39]. These plasmids are composed of four interchangeable modules: (1) origins of replication for *E. coli* and *Streptomyces*, (2) cargo, (3) antibiotic resistance marker, (4) origins of transfer. Each module is flanked by unique restriction sites for unusual enzymes. Thus, each plasmid or its derived construct can be easily repurposed by exchanging the corresponding module, when necessary, by restriction ligation. However, the SEVA shuttle plasmids developed in this work contain some important extra modifications. The oriT module has been modified in order to include the *traJ* gene to increase conjugation efficiency, and UNS sequences [40] have been added flanking each module to enable plasmid generation by Gibson assembly (GA) of the interchangeable parts. The unique restriction sites between modules have been conserved. In addition, a UNS sequence and a *NheI* unique restriction site have been added between the origins of replication for *E. coli* and *Streptomyces* in order to separate them into two different modules. A complete list of the plasmids comprising the library as well as the plasmid derivatives used in this study can be found in Table 1.

Table 1. Bifunctional shuttle vectors and derivatives generated in this study for bacterial factory genome edition as well as for the assembly of biosynthetic gene clusters. This table includes the plasmid derivatives for the CRISPR-Cas9-mediated removal of the pSEB4 chromosomal alternative integration site and for the replacement of BGC22 by *Perme*-matBC*, as well as the Golden Standard plasmid vectors for naringenin and eriodictyol biosynthesis. RT: repair template.

Name	Origin <i>Streptomyces</i>	Origin <i>E. coli</i>	Cargo	Gadget	Resistance	Accession number
pSEVAUO-C41012	pSG5	pUC	MCS	Cas9	Am	OQ696801
pSEVAUO-C41013	pSG5	pUC	MCS	Cas9	Ap-Tsr	OQ696802
pSEVAUO-C41017	pSG5	pUC	MCS	Cas9	Ap-Km	OQ696803
pSEVAUO-C41015	pSG5	pUC	MCS	Cas9	Hyg	OQ696804
pSEVAUO-C41022	pSG5	pUC	MCS	Cas9D10A	Am	OQ696805
pSEVAUO-C41023	pSG5	pUC	MCS	Cas9D10A	Ap-Tsr	OQ696806
pSEVAUO-C41027	pSG5	pUC	MCS	Cas9D10A	Ap-Km	OQ696807
pSEVAUO-C41025	pSG5	pUC	MCS	Cas9D10A	Hyg	OQ696808
pSEVAUO-M21102	φBT1	pUC	1AI2	-	Am	OQ696809
pSEVAUO-M21202	φBT1	pUC	2AI3	-	Am	OQ696810

Name	Origin <i>Streptomyces</i>	Origin <i>E. coli</i>	Cargo	Gadget	Resistance	Accession number
pSEVAUO-M21302	φBT1	pUC	3AI4	-	Am	OQ696811
pSEVAUO-M21402	φBT1	pUC	4AI5	-	Am	OQ696812
pSEVAUO-M21503	φBT1	pUC	A13B	-	Ap-Tsr	OQ696813
pSEVAUO-M21603	φBT1	pUC	B14C	-	Ap-Tsr	OQ696814
pSEVAUO-M21703	φBT1	pUC	C15D	-	Ap-Tsr	OQ696815
pSEVAUO-M21104	φBT1	pUC	1AI2	-	Gm-Tsr	OQ696816
pSEVAUO-M21204	φBT1	pUC	2AI3	-	Gm-Tsr	OQ696817
pSEVAUO-M21304	φBT1	pUC	3AI4	-	Gm-Tsr	OQ696818
pSEVAUO-M21404	φBT1	pUC	4AI5	-	Gm-Tsr	OQ696819
pSEVAUO-M21504	φBT1	pUC	A13B	-	Gm-Tsr	OQ696820
pSEVAUO-M21604	φBT1	pUC	B14C	-	Gm-Tsr	OQ696821
pSEVAUO-M21704	φBT1	pUC	C15D	-	Gm-Tsr	OQ696822
pSEVAUO-M11101	φC31	pUC	1AI2	-	Ap-Am	OQ696823
pSEVAUO-M11201	φC31	pUC	2AI3	-	Ap-Am	OQ696824
pSEVAUO-M11301	φC31	pUC	3AI4	-	Ap-Am	OQ696825
pSEVAUO-M11401	φC31	pUC	4AI5	-	Ap-Am	OQ696826
pSEVAUO-M11501	φC31	pUC	A13B	-	Ap-Am	OQ696827
pSEVAUO-M11601	φC31	pUC	B14C	-	Ap-Am	OQ696828
pSEVAUO-M11701	φC31	pUC	C15D	-	Ap-Am	OQ696829
pSEVAUO-M31105	pSAM2	pUC	1AI2	-	Hyg	OQ696830
pSEVAUO-M31205	pSAM2	pUC	2AI3	-	Hyg	OQ696831
pSEVAUO-M31305	pSAM2	pUC	3AI4	-	Hyg	OQ696832
pSEVAUO-M31405	pSAM2	pUC	4AI5	-	Hyg	OQ696833
pSEVAUO-M31505	pSAM2	pUC	A13B	-	Hyg	OQ696834
pSEVAUO-M31605	pSAM2	pUC	B14C	-	Hyg	OQ696835
pSEVAUO-M31705	pSAM2	pUC	C15D	-	Hyg	OQ696836
pSEVAUO-C41012-Ind	pSG5	pUC	<i>P_{ermE}</i> -Ind DNA RT	Cas9-Ind Prot	Am	This work
pSEVAUO-C41022-Ind	pSG5	pUC	<i>P_{ermE}</i> -Ind DNA RT	Cas9D10A-Ind Prot	Am	This work
pSEVAUO-C41012-pSEB4	pSG5	pUC	pSEB4::UNS8 DNA RT	Cas9-pSEB4 Prot	Am	This work
pSEVAUO-C41012-C22-matBC	pSG5	pUC	C1::P _{ermE} -matBC DNA RT	Cas9-C1 Prot1-Prot2	Am	OQ659402
pSEVAUO-M21102-TAL	φBT1	pUC	<i>P_{ermE}</i> -TAL	-	Am	This work
pSEVAUO-M21202-4CL	φBT1	pUC	SF14-4CL	-	Am	This work
pSEVAUO-M21302-CHS	φBT1	pUC	SP25-CHS	-	Am	This work
pSEVAUO-M21402-CHI	φBT1	pUC	SP43-CHI	-	Am	This work
pSEVAUO-M11701-NarBGC	φC31	pUC	NAR BGC	-	Ap-Am	This work
pSEVAUO-M21206F3'H-CPR	φBT1	pUC	SF14-F3'H-CPR	-	Ap-Tsr	OQ674225

The present collection of plasmids is organized into plasmids for *Streptomyces* genome engineering using CRISPR-Cas9 and plasmids for BGC assembly using Golden Standard. CRISPR-Cas9-based genome engineering relies on the ability of the endonuclease Cas9 to cleave a target double-stranded DNA (dsDNA) guided by a synthetic guide RNA (sgRNA). Precise genome editing can be achieved through the introduction of a user-designed editing template including homologous recombination arms [41]. The Golden Standard technique combines the sequential use of different type IIS restriction enzymes, ordered fusion sites, and antibiotic resistance markers in plasmids of

different levels to allow the systematic and hierarchical assembly of complete transcription units (TUs) (Level 1) and of multigene constructs, such as BGCs (Level 2), from basic premade standardized modules, such as promoters, rbs, coding sequences, terminators and others (Level 0 parts) [42].

The plasmids for the CRISPR-Cas9-mediated genome edition possess five UNS-flanked modules. Module 1 is flanked by UNS2 (unique nucleotide sequence 2) and UNS3 sequences and harbors the pSG5 origin of replication in *Streptomyces* [43] for easy plasmid curing after the genome edition. Module 2 is flanked by UNS3 and UNS4 sequences and contains pUC as the origin of replication in *E. coli* and a *PacI-SpeI*-flanked multicloning site (MCS) for cloning of the DNA repair template. Module 3 is flanked by UNS4 and UNS5 sequences and contains the CRISPR-Cas9 machinery (*cas9*-sgRNA) [44,45]. Based on previous studies [46], *PermE** was chosen to lead Cas9 expression. Two versions of Cas9 were generated: the wild-type Cas9, which cuts both DNA strands, and a Cas9 nickase (Cas9D10A), which has one nuclease domain deactivated and therefore only cuts one DNA strand. Module 4 is flanked by UNS5 and UNS1 sequences and consists of the resistance marker, which can be apramycin, ampicillin-thioestrepton, ampicillin-kanamycin or hygromycin. A rational choice of the antibiotic selection marker allows us to carry out CRISPR-Cas9-mediated genome modifications in any strain with Golden Standard plasmids already integrated into their chromosome. Module 5 is flanked by UNS1 and UNS2 sequences and contains the *oriT-traJ* operon (Figure 1).

The first set of plasmids to be generated were the wild-type Cas9-bearing pSEVAUO-C41012, pSEVAUO-C41013, pSEVAUO-C41017 and pSEVAUO-C41015. They differ in the resistance marker, encoding for apramycin, ampicillin-thioestrepton, ampicillin-kanamycin and hygromycin, respectively. Plasmid pSEVAUO-C41022 contains a D10A mutation in Cas9 for RuvC domain inactivation, leading to Cas9 nickase. Its derivatives, pSEVAUO-C41023 (ampicillin-thioestrepton), pSEVAUO-C41027 (ampicillin-kanamycin) and pSEVAUO-C41025 (hygromycin), allow the use of other antibiotics as selection markers (Supplementary Material, Methods for Plasmids Construction).

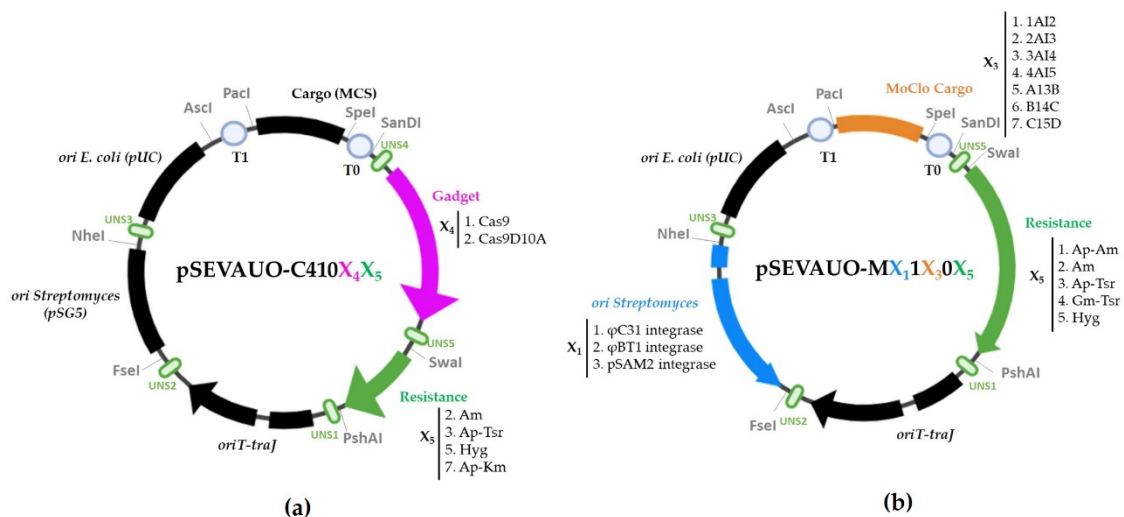


Figure 1. Schematic representation of the SEVA-based plasmid library for (a) CRISPR-Cas9-mediated genome edition, and (b) Golden Standard assembly of transcriptional units and biosynthetic pathways. Code names: C: CRISPR-Cas9; M: MoClo; X1: *ori Streptomyces*; X2: *ori E. coli*; X3: Cargo; X4: gadget; X5: resistance.

Plasmids for Golden Standard assembly were designed in three levels. Level 0 plasmids harbor basic parts, such as promoters (SP43, SP25, SF14 and *ermE** [45,46,47]), a genetic insulator (RBS-RiboJ-SR41 [47]), coding sequences (TAL, 4CL, CHS, CHI and F3'H-CPR) and a terminator (*ttsbib* [48]). These parts were assembled in TUs using Level 1 plasmids as destination vectors, and from

these into basic circuits, such as BGCs, when assembled into Level 2 plasmids. Level 0 Golden Standard plasmids are ampicillin-resistant (normally pSEVA181 [48]).

Level 1 and Level 2 Golden Standard plasmids possess four UNS-flanked modules. Module 1 is flanked by UNS2 and UNS3 sequences, and it harbors an integrase and its corresponding *attP* site for stable integration of the plasmid in the *Streptomyces* chromosome. There are three optional integrases: ϕ C31, ϕ BT1 and pSAM2 [49,50,51,52]. Module 2 is flanked by UNS3 and UNS5 sequences and consists of the pUC origin of replication for *E. coli* and a *PacI-SpeI*-flanked Golden Standard cargo region. The configuration of each Golden Standard cargo region can be found in the literature [38]. Module 3 is flanked by UNS5 and UNS1 sequences and contains the antibiotic resistance marker. There are five different resistance marker cassettes: apramycin, ampicillin-thiostrepton, gentamicin-thiostrepton, apramycin-ampicillin and hygromycin. These resistance markers have been combined with integrases and Golden Standard cargo regions to enable the selection of assembled plasmids in Golden Standard reactions as well as their integration into the *Streptomyces* chromosome. Module 4 is flanked by UNS1 and UNS2 sequences and harbors *oriT* and *traJ* (Figure 1). A set of Level 1 and Level 2 Golden Standard plasmids displaying resistance to apramycin or ampicillin and to be integrated into the ϕ C31 site were developed, including pSEVAUO-M11101 (cargo 19[g1]), pSEVAUO-M11201 (cargo 19[g2]), pSEVAUO-M11301 (cargo 19[g3]), pSEVAUO-M11401 (cargo 19[g4]), pSEVAUO-M11501 (cargo 19[gA]), pSEVAUO-M11601 (cargo 19[gB]) and pSEVAUO-M11701 (cargo 19[gC]). Then, a set of plasmids to be integrated into ϕ BT1 site were generated, including pSEVAUO-M21102 (GS cargo 19[g1]), pSEVAUO-M21202 (GS cargo 19[g2]), pSEVAUO-M21302 (GS cargo 19[g3]) and pSEVAUO-M21402 (GS cargo 19[g4]). The same process was applied to the generation of Level 2 ϕ BT1 Golden Standard plasmids pSEVAUO-M21503 (GS cargo 19[gA]), pSEVAUO-M21603 (GS cargo 19[gB]) and pSEVAUO-M21703 (GS cargo 19[gC]) but encoding resistance to ampicillin-thiostrepton instead of apramycin.

Level 1 ϕ BT1-apramycin Golden Standard plasmids could not be integrated into *Streptomyces* chromosomes together with ϕ C31-ampicillin-apramycin plasmids, as they also possess apramycin as a selector marker. Therefore, a series of Level 1 and Level 2 ϕ BT1 plasmids with resistance to gentamicin-thiostrepton were built. Gentamicin works as a selector marker for both Level 1 and Level 2 Golden Standard reactions in *E. coli*, whilst selection in *Streptomyces* is carried out with thiostrepton, allowing the right integration even in the presence of other Golden Standard integrative plasmids. Level 1 ϕ BT1-gentamicin-thiostrepton plasmids, pSEVAUO-M21104 (cargo 1AI2), pSEVAUO-M21204 (cargo 2AI3), pSEVAUO-M21304 (cargo 3AI4) and pSEVAUO-M21404 (cargo 4AI5), were generated individually by 4-fragment GA but using fragments already containing the corresponding Golden Standard cargos. Level 2 ϕ BT1-gentamicin-thiostrepton plasmids pSEVAUO-M21504 (cargo A13B), pSEVAUO-M21604 (cargo B14C) and pSEVAUO-M21704 (cargo C15D) were generated by restriction ligation of the corresponding cargos into pSEVAUO-M21404. A third series of plasmids containing the pSAM2 integrase and encoding resistance to hygromycin was developed. This antibiotic serves as a selector in both *E. coli* and *Streptomyces*. The first plasmid of this series to be generated was pSEVAUO-M31705, which was assembled by a 4-fragment Gibson assembly using a fragment already containing cargo C15D. Plasmids pSEVAUO-M31105 (cargo 1AI2), pSEVAUO-M31205 (cargo 2AI3), pSEVAUO-M31305 (cargo 3AI4), pSEVAUO-M31405 (cargo 4AI5), pSEVAUO-M31505 (cargo A13B) and pSEVAUO-M31605 (cargo B14C) were generated by cloning the corresponding cargos into pSEVAUO-M31705.

2.2. Eriodictyol Heterologous Biosynthesis in *S. albidoflavus* WT

De novo eriodictyol (ERI) biosynthesis by *S. albidoflavus* was already achieved by our group, but titers were low [26]. This was associated with poor activity of the enzyme F3'H (flavonoid 3'-hydroxylase), which catalyzes the hydroxylation of naringenin at ring B to give rise to eriodictyol. Heterologous expression of this enzyme in prokaryotic systems is normally challenging due to its poor solubility and cofactor incorporation [21]. Therefore, the F3'H sequence was redesigned in order to encode a chimeric protein comprising a truncated F3'H fused to a truncated cytochrome P450 reductase (CPR), both proteins from *Arabidopsis thaliana*.

First, the plasmid pSEVAUO-M11701-NAR-BGC was generated. This is a ϕ C31 integrative Level 2 Golden Standard plasmid harboring the four genes necessary for naringenin biosynthesis (TAL, 4CL, CHS and CHI), each of them with their own promoter, RiboJ-RBS and terminator. Promoters of increasing strength were assigned to each CDS according to the order in which their encoded enzyme acted on the naringenin (NAR) biosynthesis pathway (Figure 2). This plasmid was integrated into the ϕ C31 chromosomal site of *S. albidoflavus* WT by protoplast transformation, giving rise to the strain *S. albidoflavus* WT-NAR. Then, pSEVAUO-M21206-F3'H-CPR, a ϕ BT1 integrative Level 1 Golden Standard plasmid was assembled. This harbors the gene encoding the F3'H-CPR chimaera under the control of the SF14 promoter (Figure 2). Integration of this plasmid into the ϕ BT1 chromosomal site of the strain *S. albidoflavus* WT-NAR gave rise to the strain *S. albidoflavus* WT-ERI.

The strains *S. albidoflavus* WT-NAR, WT-ERI and wild-type (as a negative control) were cultured in an R5A liquid medium. De novo production of naringenin by the strains *S. albidoflavus* WT-NAR and *S. albidoflavus* WT-ERI, and eriodictyol production by the strain *S. albidoflavus* WT-ERI were validated by comparison of differential peaks with pure standards in HPLC-HRESIMS (Figure 3).

2.3. Comparison of Conjugation and Genome Editing Efficiency between Wild-Type Cas9 and Cas9 Nickase

Cas9 expression has been described as toxic in *Actinobacteria*, but its toxic effects are circumvented by the proper selection of the promoter driving its expression [53]. Alternatively, a Cas9D10A nickase, which consists of a RuvC nuclease-defective Cas9, which introduces only a single-strand nick to the targeted DNA, has been adopted to overcome the same limitation in *Clostridium cellulyticum* [52]. Therefore, we have created a plasmid library with both the wild-type Cas9 and the Cas9 nickase and have tested their effectiveness in *S. albidoflavus*.

The conjugation and editing efficiency of both the wild-type Cas9 and the Cas9 nickase have been tested by activation of the *S. albidoflavus* endogenous BGC encoding for the blue compound indigoidine (IND). This BGC remains naturally silent in *S. albidoflavus*. However, when the constitutive promoter P_{ermE^*} is placed upstream of the first gene of the BGC, its expression is activated and colonies turn blue [53], enabling visual identification of recombinant strains. For this purpose, pSEVAUO-C41012-IND and pSEVAUO-C41022-IND have been constructed and separately introduced into *S. albidoflavus* WT by conjugation. The conjugation efficiency was measured as the number of colonies growing on a plate, and this was calculated as the mean of three independent experiments. The conjugation efficiency obtained with wild-type Cas9 was 195 ± 38 CFU, in contrast to 459 ± 78 CFU obtained with Cas9 nickase. The editing efficiency was calculated as the percentage of edited colonies out of 10 exconjugants selected from each conjugation and verified by PCR with the primers P_{ermE^*} -fw (annealing on P_{ermE^*}) and P_{ermE^*} -IND-check-rev (annealing on the chromosome outside the fragment used as part of the DNA repair template) (Supplementary Table S3). In this case, the recombination efficiency was higher when the wild-type Cas9 was used (90%) compared to the Cas9 nickase (70%) (Figure 4). In light of these results, the plasmids bearing wild-type Cas9 were selected for subsequent experiments in *S. albidoflavus*.

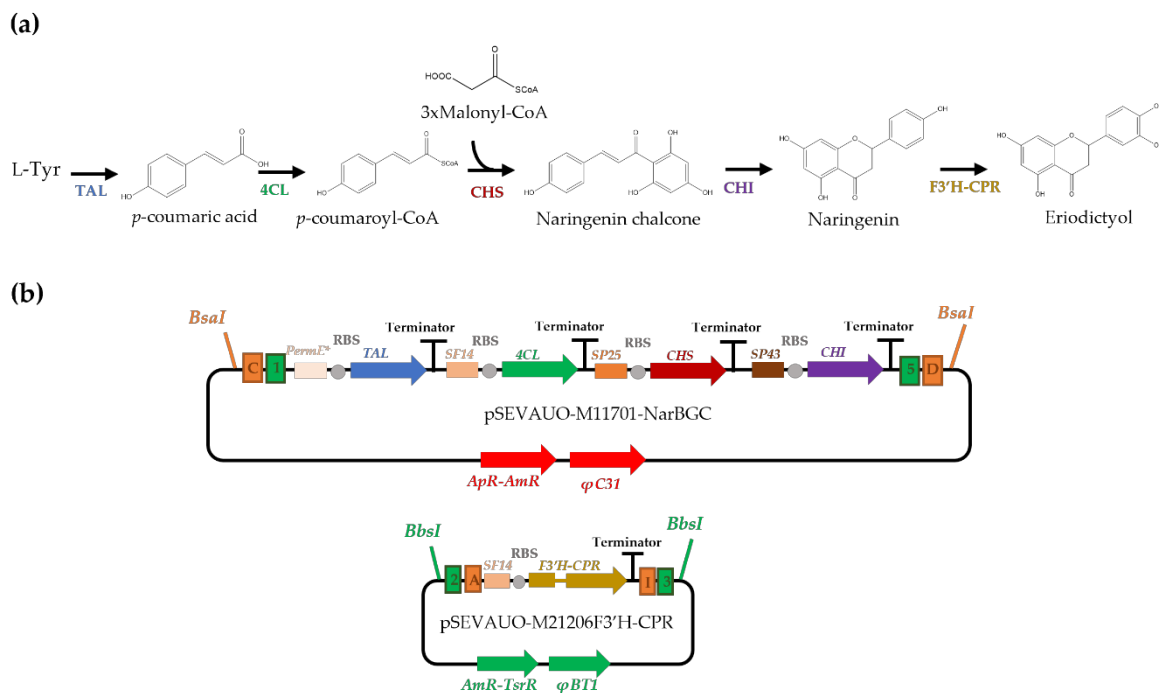


Figure 2. Eriodictyol biosynthesis. (a) Biosynthetic pathway, (b) MoClo plasmids bearing naringenin biosynthetic gene cluster (pSEVAUO-M11701-NAR-BGC) and F3'H-CPR transcriptional unit (pSEVAUO-M21206-F3'H-CPR) for naringenin conversion to eriodictyol.

2.4. Generation of the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 Edited Bacterial Factory

The CRISPR-Cas9-bearing plasmids were used to generate the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 bacterial factory in two steps: (1) the removal of chromosomal *pseB4*, a highly active pseudo-*attB* site for ϕ C31 alternative integration; (2) the replacement of a series of native BGCs by the construction of *P_{ermE*}-matBC*, in order to increase malonyl-CoA levels.

To direct the specific integration of ϕ C31 integrative plasmids to only one site, the *pseB4* pseudo-*attB* site was removed from the *S. albidoflavus* chromosome to ensure uniformity throughout the flavonoid production experiments. For this purpose, plasmid pSEVAUO-C41012-pSEB4 was introduced into the *S. albidoflavus* J1074 WT strain for *pseB4* replacement by a non-coding UNS8 sequence through CRISPR-Cas9-mediated recombination. The correct genome edition of the derived strain, *S. albidoflavus* UO-FLAV-001, was verified by PCR amplification (Supplementary Figure S1) and the sequencing of the obtained PCR products.

S. albidoflavus UO-FLAV-001 was further genetically modified to increase malonyl-CoA availability for flavonoid production. Two strategies were adopted for this purpose. Three biosynthetic gene clusters (BGC) encoding malonyl-CoA-derived metabolites, such as antimycins, candidicins and a predicted non-ribosomal peptide-polyketide, were removed from the *S. albidoflavus* chromosome and the *matBC* genes from *R. trifolii* were integrated into the chromosome under the control of the *ermE** promoter. The operon *matBC* improves intracellular malonyl-CoA upon exogenous malonate addition to the culture, as MatC imports malonate into the cell and MatB converts this malonate into malonyl-CoA [30]. The final *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 edited bacterial factory was therefore generated by a CRISPR-Cas9-mediated replacement of a 241,776 bp fragment (CP004370; DNA region from 6,576,725 to 6,818,501 bp) comprising the three mentioned BGCs (Cluster 22 henceforth) by *P_{ermE*}-matBC*. To this end, plasmid pSEVAUO-C41012-C22-*matBC* was introduced into *S. albidoflavus* UO-FLAV-001 by conjugation. The correct genome edition was

checked by PCR amplification (Supplementary Figure S2) and the sequencing of the PCR products. The successful blockage of antimycin biosynthesis was demonstrated by culturing the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 edited strain and the wild-type strain (as a control) in R5A over 120 h and further analyses of the extracts by HPLC–HRESIMS (Supplementary Figure S3). Candidicidins were not detected in this edited strain extract.

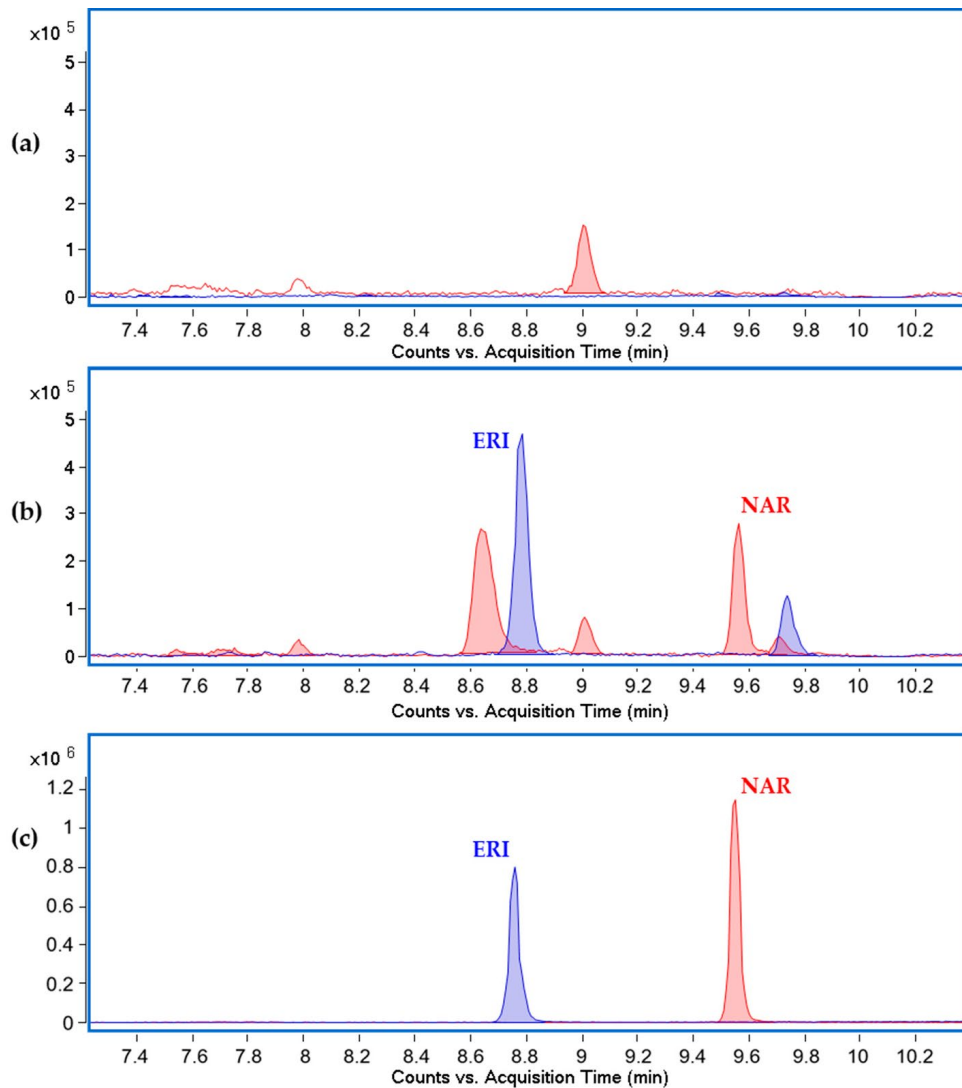


Figure 3. HPLC–HRESIMS chromatograms of (a) *S. albidoflavus* WT, (b) *S. albidoflavus* WT-ERI and (c) pure flavonoid standards; filtered by naringenin at m/z ion = 271.0612 (red), and eriodictyol ion at m/z ion = 287.0561 (blue), both in negative mode. ERI: eriodictyol, NAR: naringenin.

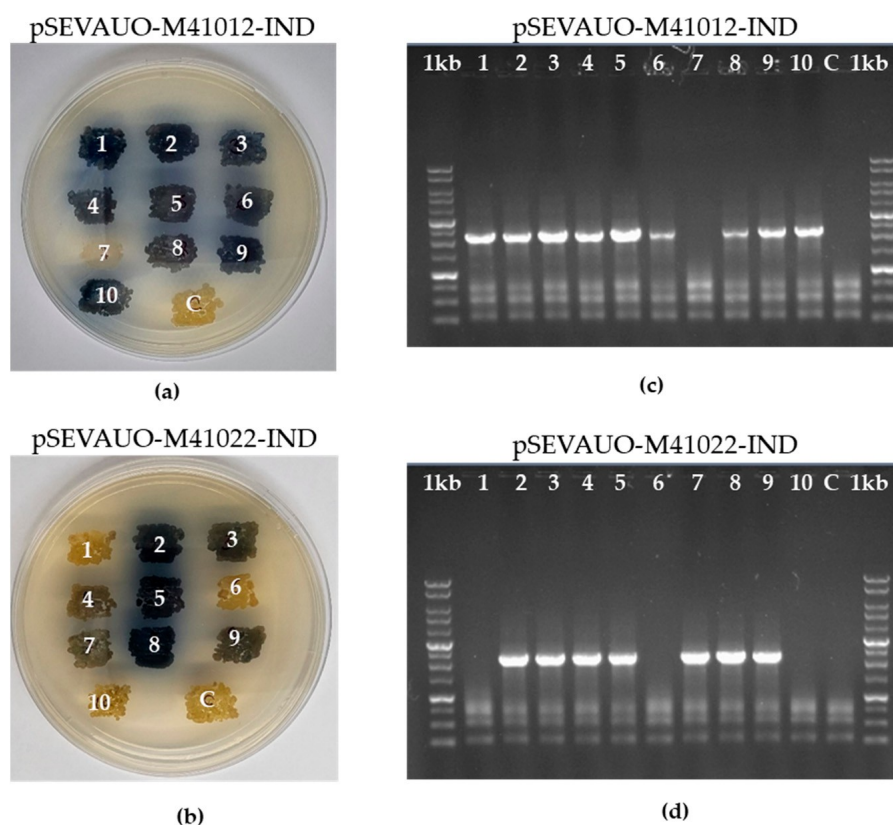


Figure 4. Comparison of the editing efficiency of wild-type Cas9 and Cas9 nickase by indigoidine gene cluster activation. Plates showing 10 colonies from conjugations with (a) pSEVAUO-M41012-IND (wild-type Cas9) and (b) pSEVAUO-M41022-IND (Cas9 nickase) as well as PCR verification of exconjugants from (c) pSEVAUO-M41012-IND (wild-type Cas9) and (d) pSEVAUO-M41022-IND (Cas9 nickase) are displayed. A negative control (C) was included in each experiment. 1kb: commercial DNA ladder.

2.5. Eriodictyol Heterologous Biosynthesis in *S. albidoflavus* UO-FLAV-002

The performance of the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 edited strain as a flavonoid-overproducing bacterial factory was investigated by testing its eriodictyol heterologous production. First, the plasmid pSEVAUO-M11701-NAR-BGC was integrated into the ϕ C31 site of *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 by protoplast transformation to generate the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR strain. This strain was further modified by the integration of the plasmid pSEVAUO-M21206-F3'H-CPR into its ϕ BT1 chromosomal site, giving rise to *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI.

Then, the *S. albidoflavus* WT-ERI and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI strains were cultured in R5A in order to test the impact on eriodictyol production after removing the mentioned three malonate-consuming BGCs. Additionally, the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI strain was cultured in R5A with malonate at 20 mM in order to test the effect of the presence of MatBC on eriodictyol production.

Both parameters, the eriodictyol production and the biomass, were monitored every 24 h over a cultivation period of 120 h. Indeed, the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI strain produced more eriodictyol than the WT strain, with a maximum of 0.06 mg/L yield 96 h after the inoculation. This constitutes a 3.44-fold compound increase over the maximum level produced by the WT strain (0.033 mg/L, 72 h after the inoculation) (Figure 5a). In terms of growth, the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI strain grew slower than the WT strain at early time points but reached equal biomass at the end of the cultivation (Figure 5b). Both strains were also tested for naringenin production, and the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI strain showed a 2.33-fold increase in its production (Figure 5c).

Unfortunately, no major differences were observed between *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI cultured with and without malonate. This result is expected as malonyl-CoA was no longer a limiting factor to eriodictyol production in the given cultivation conditions.

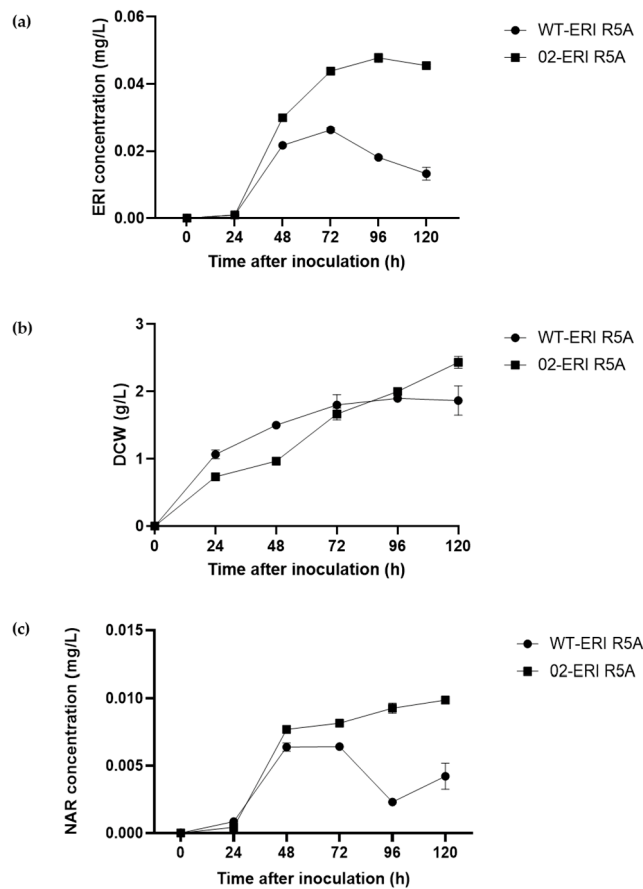


Figure 5. *S. albidoflavus* WT-ERI and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI cultured in R5A. Time courses of eriodictyol production (a), biomass (b) and naringenin production (c).

3. Discussion

As in many other actinomycete bacteria, the *S. albidoflavus* chromosome contains a plethora of BGCs, which drive processes associated with the biosynthesis of a variety of native secondary metabolites, such as polyketides, terpenoids, siderophores, bacteriocins, and non-ribosomal peptides (NRPs) [53]. In the case of *S. albidoflavus*, a peripheral region of its chromosome (CP004370; 6,841,649 bp) [54], located between 6,576,725 and 6,818,501 bp, contains the gene clusters involved in the biosynthesis of candicidins, antimycins and an unknown hybrid polyketide–NRP compound [53], as predicted by the antiSMASH software [55,56]. The biosynthetic pathways associated with these secondary metabolites share the use of high quantities of malonyl-CoA as one of their building blocks. For example, candicidins are antifungal type I polyketides using 14 malonyl-CoA building blocks per molecule (rendering acetate moieties in the final polyene backbone) [57]. In addition, antimycins are antifungal, antitumor and piscicidal depsipeptides generated by a hybrid polyketide and NRPS complex enzymatic machinery that uses, as biosynthetic precursors, L-Trp (to generate the starter unit 3-aminosalicylate) and diverse amino acids and carboxylic acids as extension units [58]. These include pyruvate, a precursor of acetyl-CoA (via pyruvate dehydrogenase) and therefore of malonyl-CoA biosynthesis [59,60,61]. The structure of the secondary metabolite generated by the third gene cluster in this chromosomal region (coding for a hybrid polyketide–NRP compound) is

unknown, but this gene cluster was deleted as it may also require the consumption of malonyl-CoA (as this is the most common building block in polyketide moieties).

To achieve higher eriodictyol production yields in this bacterial factory, a deletion (using CRISPR-Cas9) of the previously mentioned chromosomal region was carried out, comprising about 242 kb of chromosomal DNA. The objective here was to divert the unused cytoplasmic malonyl-CoA in the new edited strain (*S. albidoflavus* UO-FLAV002) towards the biosynthesis of this flavanone: each molecule of eriodictyol uses three malonyl-CoA building blocks and one p-coumaroyl-CoA as precursors. In addition, a further step towards the enhancement of malonyl-CoA cytoplasmic pools was the insertion of the plant *matBC* genes from *R. trifolii* (under a constitutive promoter) during this chromosomal editing event. These two genes code for a dicarboxylate membrane transporter in charge of introducing malonate from the extracellular medium (MatC) and a malonyl-CoA synthetase, which intracellularly converts the imported malonate into the malonyl-CoA building block [30]. As a result of this genetic replacement in the *S. albidoflavus* chromosome, the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 was generated and tested to produce antimycins and candicidins by HPLC–HRESIMS. Both secondary metabolites were absent in the edited strain extracts, but a large quantity of m/z peaks corresponding to the structural diversity of antimycins was easily observable in the WT strain extracts (Supplementary Figure S3).

Additionally, in this work, the integration systems from the temperate phages ϕ C31 and ϕ BT1 and from the conjugative element pSAM2 have been used to allow the stable integration of the Golden Standard plasmids developed here into specific loci at the *Streptomyces* chromosome. Although they have a preferred chromosomal site of integration, sometimes these integrases might carry out the recombination event at alternative pseudo-*attB* sites in the target chromosome, but at a far lower efficiency [62]. In this sense, a highly active pseudo-*attB* site for the ϕ C31 integrase has been identified in the *S. albidoflavus* chromosome. This pseudo-*attB* site, named pseB4, comprises a 50 nt sequence (CP004370; DNA region from 3,168,410 to 3,168,459 bp) located in the intergenic region between the XNR_2791 and XNR_2792 genes, and it exhibits a similar integration efficiency as the native *attB* [63]. This pseudo-*attB* site was therefore deleted (using CRISPR-Cas9 edition) to maintain a unique integration site along the bacterial factory chromosome for the ϕ C31-derived integrative plasmid vectors created, avoiding transcriptional level differences for the eriodictyol biosynthetic genes used (eventually derived from different chromosomal integration sites with variable transcription level capabilities) [64], as well as preventing eventual duplication of the heterologous gene cluster in the chromosome.

With the pseudo-*attB* site deleted from the bacterial chromosome, as well as the three mentioned biosynthetic gene clusters, the introduction of all the synthetic genes for the heterologous production of the flavanone eriodictyol (and its precursor naringenin) was achieved both in the WT and in the UO-FLAV-002 edited bacterial factory. The four genes necessary for naringenin biosynthesis were integrated into the canonical ϕ C31 *attB* site, and the gene coding for the F3'H-CPR chimaera was integrated into the ϕ BT1 *attB* site. With the modifications carried out in the edited bacterial factory, total naringenin production titers achieved a 2.33 increase with respect to the WT strain, and total eriodictyol yields reached a 3.44 rise with respect to the WT conditions; therefore, validating the fact that saving biosynthetic building blocks (in this case malonyl-CoA), due to the deletion of these three native gene clusters, is a reliable approach for enhancing final flavonoids heterologous production titers in this actinomycete. However, the same production experiments for eriodictyol biosynthesis, but adding 20 mM malonate to the R5A culture media, did not render an increase in the final production yields, probably indicating that, after deleting these three native gene clusters in *S. albidoflavus*, the intracellular levels of malonyl-CoA are no longer a limiting factor for the heterologous production of these flavonoids. This also indicates that, in the WT strain (with full native machinery for the biosynthesis of secondary metabolites such as antimycins and others), the

addition of malonate to the culture media does not generate a net increase in the heterologously produced flavonoids.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains, Plasmids and Culture Conditions

All plasmids and strains used in this study are listed in Tables S1 and S2. *E. coli* strains were grown at 37 °C in Tryptic Soy Broth (TSB, VWR, Barcelona, Spain) or on TSB agar plates. *S. albidoflavus* J1074 (formerly denominated *S. albus* J1074) and derivatives were grown at 30 °C in Yeast Extract Malt Extract 17% (w/v) sucrose (YEME) [65] for protoplast preparation, medium A [66] supplemented with MgCl₂ 10 mM for conjugation, or Bennett medium [65] for sporulation. Media were supplemented with the corresponding antibiotics (ampicillin 100 µg/mL, apramycin 50 µg/mL, kanamycin 50 µg/mL for *E. coli* and 200 µg/mL for *S. albidoflavus*, hygromycin 100 µg/mL, nalidixic acid 50 µg/mL, gentamicin 50 µg/mL, thiostrepton 50 µg/mL on solid and 5 µg/mL in liquid medium) and reagents (X-Gal 40 µg/mL), when necessary.

For flavonoid production, *S. albidoflavus* spores were quantified, and 10⁶ CFU/mL were inoculated into R5A medium [66]. Cultures were incubated at 30 °C and 250 rpm.

4.2. Reagents and Biochemicals

All solvents used for solid phase extraction and HPLC–HRESIMS analysis were LC-MS grade from either Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) or VWR (Barcelona, Spain).

Authentic standards of naringenin and eriodictyol for HPLC–HRESIMS quantification and molecule identification were provided by Extrasynthese (Genay, France).

4.3. Synthetic DNA and Enzymes

Recombinant DNA techniques were performed following standard protocols [67]. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Thermo Scientific (Madrid, Spain), NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix from New England BioLabs (Thermo Scientific, Madrid, Spain), Terra PCR Direct polymerase from Takara (DISMED, Gijón, Spain), and Herculase II Fusion DNA Polymerase from Agilent (Madrid, Spain). Synthetic genes outsourced from Explora Biotech (Venice, Italy) were received and cloned into *PacI-SpeI* sites of pSEVA181. All gene sequences were modified to include silent point mutations to remove restriction sites incompatible with Golden Standard and SEVA architecture and to meet the criteria to allow chemical synthesis when necessary [68]. For the antibiotic resistance cassettes, *SanDI-UNS5-SwaI* and *PshAI-UNS1* sequences were added as flanking regions: pSEVA181Tsr contains the thiostrepton resistance cassette from pGM1190; pSEVA181Hyg contains the hygromycin resistance cassette from pOSV805. For the site-specific integrases, *UNS3-NheI* and *FseI-UNS2* sequences were added as flanking regions: pSEVA181BT1int contains the ϕ BT1 integrase and its *attP* site from pOSV805; pSEVA181pSAM2 contains the pSAM2 integrase and its *attP* site from pOSV807. For the Level 0 Golden Standard plasmids harboring promoter regions, *BsaI*-GGAG (Fusion site A) and TACT (Fusion site B)-*BsaI* sequences were added as flanking regions: pSEVA181P_{ermE*}, pSEVA181SF14, pSEVA181SP25 and pSEVA181SP43 contain the P_{ermE*}, SF14, SP25 and SP43 promoter sequences, respectively [69]. Plasmid pSEVA181RiboJ-RBS contains the insulator RiboJ [70] followed by the RBS sequence SR41 [49,69] flanked by *BsaI*-TACT (Fusion site B) and AATG (Fusion site D)-*BsaI*. For the Level 0 Golden Standard plasmids harboring coding sequences, *BsaI*-AATG (Fusion site D) and GCTT (Fusion site G)-*BsaI* were added as flanking regions: pSEVA181CHS contains a codon-optimized CHS gene from *Glycine max* (GenBank accession no. LT629807.1); pSEVA181CHI contains a codon-optimized CHI gene from *Glycine max* (GenBank

accession no. LT629808.1); and pSEVA181F3H-CPR contains a codon-optimized F3'H-CPR chimaera from *Arabidopsis thaliana* (accession number: OQ674225). This fusion protein was designed as described elsewhere [21]: the sequence of a previously codon-optimized F3'H (GenBank accession no. LT629809.1) was modified in order to remove the first 21 amino acids corresponding to the transmembrane region. An ATG codon was added at 5' and a linker Gly-Ser-Thr at 3'. Consecutively, the nucleotide sequence encoding a truncated NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) was added. This sequence was obtained from the protein sequence of isoform 1 of gen ATR2 from *A. thaliana* (UniProt accession no. Q9SUM3-1) and, after codon optimization, nucleotides encoding the first 72 amino acids corresponding to the transmembrane region were removed. Plasmid pIDTSMARTtsbib was outsourced from IDT Technologies (Leuven, Belgium) and contains the terminator ttsbib [71] flanked by *Bsa*I-GCTT (Fusion site G) and CGCT (Fusion site I)-*Bsa*I. Plasmid *pmatBC* was de novo designed and contains codon-optimized *matBC* genes from *R. trifolii*, each preceded by an RBS sequence (Accession number: OQ659402). A 499 bp gBlock for cloning two protospacer sequences targeting Cluster 1 was designed following the corresponding protocol [44] and outsourced from IDT Technologies (Leuven, Belgium).

4.4. Construction of Plasmids

A detailed description of each plasmid construction can be found in the Supplementary Material (Methods for Plasmids Construction). Sequence of all primers used can be found in Supplementary Table S3. Gibson Isothermal Assembly (GA) was performed with NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs) (Thermo Scientific, Madrid, Spain), following the manufacturer's instructions. Golden Standard reactions were set up according to CIDAR MoClo [44], followed by blue-white screening by adding X-Gal to the medium. Protospacer design, annealing and cloning were performed as described for pCRISPomyces-2 [44]. Correct protospacer insertion was verified by sequencing with primer "Prot seq rev". Correct assembly of all constructs was first checked by restriction digestion and then confirmed by sequencing. The GenBank accession numbers for these plasmids are OQ696801 to OQ696836. Supplementary Table S1 contains information on all the plasmids used in this work. All these vectors' data will be available from the Golden Standard database after manuscript publication and can be requested directly from the SEVA siblings repository (<http://sysbiol.cnb.csic.es/GoldenStandard/database.php>, accessed on 1 May 2023).

Figure 6 shows a basic schema with an example of the construction of a level 2 vector from the different parts depicted in four level 1 vectors (constructed on the basis of the sixteen possible units of level 0 vectors) (Figure 6).

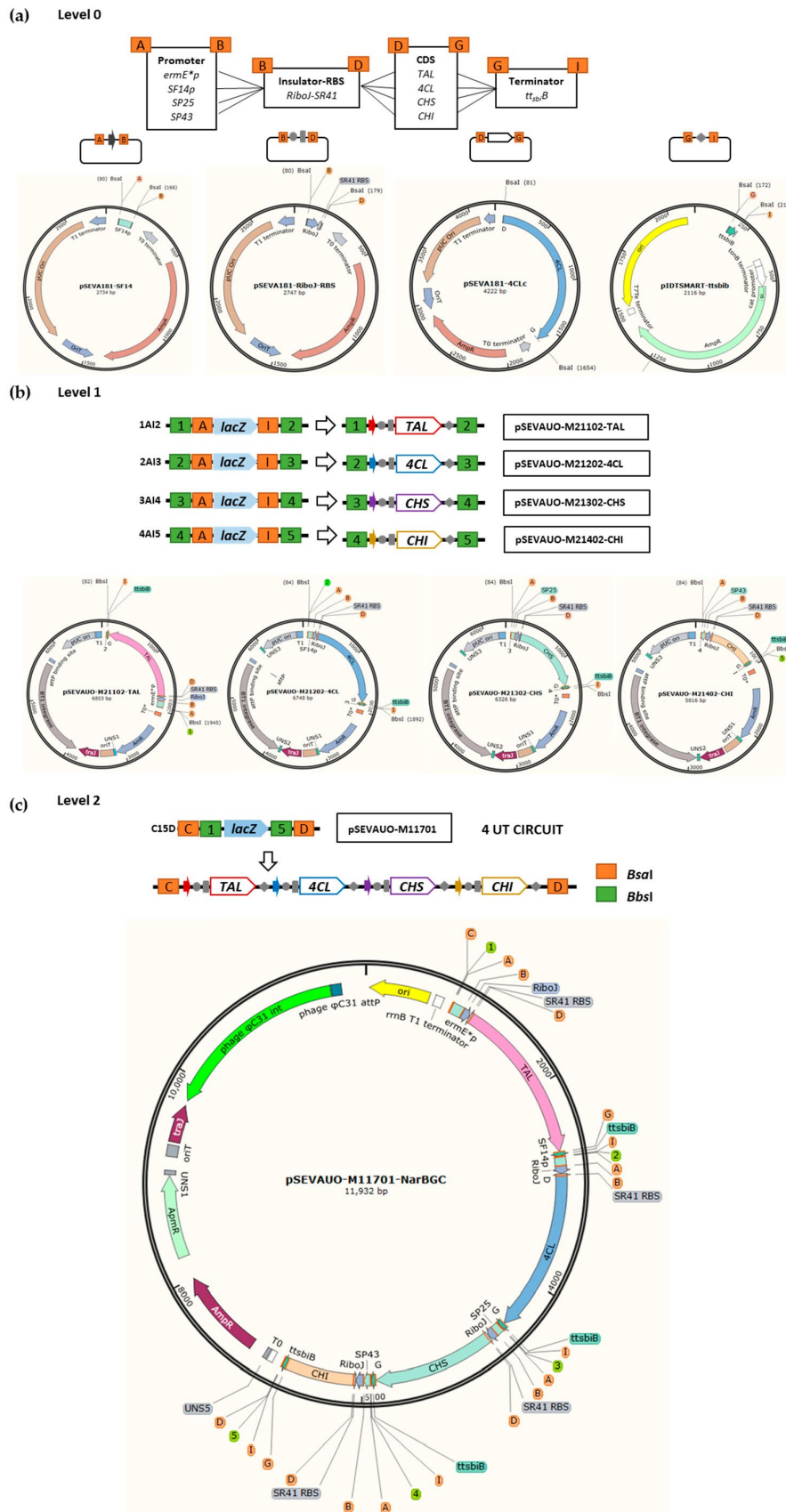


Figure 6. Schema showing the steps needed to generate a level 2 Golden Standard plasmid, designed to direct the biosynthesis of naringenin. (a) The different level 0 plasmids containing the structural parts (promoters, rbs, CDSs, terminator). (b) The four necessary level 1 plasmids showing the four different gene constructions. (c) The final level 2 plasmid generated.

4.5. Strain Generation

Exogenous DNA was introduced into *S. albidoflavus* by either protoplast transformation or intergeneric conjugation [67]. Description of each strain generated by CRISPR-Cas9 and further verification can be found in Supplementary Figures S1 and S2, as well as information about the primers used for PCR amplification (Supplementary Table S3). Strains containing integrative plasmids were selected based on their resistance to the corresponding antibiotics. For the strains generated by CRISPR-Cas9 edition, colonies showing resistance to the corresponding antibiotics were re-streaked for colony isolation. Then, spores from an isolated colony were subjected to PCR verification with Terra polymerase to check both genome edition and contamination with DNA from the non-edited strain. When the positive recombinant colonies showed a mixture with non-edited DNA, the spores were filtered and spread on a plate to obtain isolated colonies with unique genotypes and checked again by PCR. Plasmid curing was achieved with consecutive passages without antibiotics and phenotypically checked by their loss of resistance to that antibiotic. Supplementary Table S2 contains information on all the strains used in this work.

4.6. Flavonoid Extraction and HPLC–HRESIMS Analyses

The recovery of flavonoids from the recombinant strains developed in this study was achieved by organic extraction with acetone (cellular pellet) and ethyl acetate (culture supernatant). Briefly, 1 mL of culture medium was centrifuged at 10,000 rpm for 2 min, and the biomass as well as the supernatant were extracted separately. First, an equal volume of acetone was added to the pellet to facilitate the breaking of the mycelium, and then a second extraction was performed with an equal volume of ethyl acetate. For the supernatant, two extractions were performed with the same volume of ethyl acetate. In all cases, the extractions were subjected to vortex cycles to ensure contact with the solvent. Finally, the organic phases were dried sequentially under vacuum, and the residues were resuspended in 100 μ L DMSO/MeOH 1:1 (v/v) for further analysis.

Analysis of flavonoids was performed using HPLC–HRESIMS. Separation was performed in a UPLC system (Dionex Ultimate 3000, ThermoScientific, Madrid, Spain) equipped with an analytical RP-18 HPLC column (50 \times 2.1 mm, Zorbax® Eclipse Plus, 1.8 μ m, Agilent Technologies, Madrid, Spain) as previously described [71]. The obtained base peak chromatograms (BPCs) were extracted for the deprotonated ions of a set of flavonoids with a mass error range of 0.005 milli mass units (mmu) and the obtained extracted ion chromatograms (EICs) were compared with authentic commercial standards. When needed, flavonoids were quantified by comparing the peak area with that of a known amount of an authentic compound through a calibration curve. The production titers are given in mg/L, and the mean value was calculated from three biological replicates.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24108879/s1>.

Author Contributions: Funding acquisition: F.L. and J.N.; investigation: P.M.-C., S.Y., Á.P.-V., P.L.M., P.V.-C. and J.T.-B.; supervision: C.J.V. and F.L.; writing—original draft: S.Y.; writing—review and editing: C.J.V. and F.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Principado de Asturias (Spain) through the program “Ayudas a organismos públicos para apoyar las actividades de I+D+I de sus grupos de investigación” (grant AYUD/2021/51347), as well as by “Programa Severo Ochoa de Ayudas Predoctorales para la investigación y docencia” from Principado de Asturias (grant PA-20-PF-BP19-058 to PMC and grant PA-21-PF-BP20-150 to APV), and the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement no. 814650 for the project SynBio4Flav.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank the mass spectrometry unit of Servicios Científico-Técnicos at the University of Oviedo for the HRESIMS experiments. The authors thank Explora Biotech Srl (Venice, Italy) for providing the synthetic genes. The authors thank Extrasynthese (Genay, France) for providing the pure flavonoid standards.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Kaushal, N.; Singh, M.; Singh Sangwan, R. Flavonoids: Food Associations, Therapeutic Mechanisms, Metabolism and Nanoformulations. *Food Res. Int.* **2022**, *157*, 111442. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
2. Roy, A.; Khan, A.; Ahmad, I.; Alghamdi, S.; Rajab, B.S.; Babalghith, A.O.; Alshahrani, M.Y.; Islam, S.; Islam, M.R. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. *BioMed Res. Int.* **2022**, *2022*, 5445291. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Al-Khayri, J.M.; Sahana, G.R.; Nagella, P.; Joseph, B.V.; Alessa, F.M.; Al-Mssallem, M.Q. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules* **2022**, *27*, 2901. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Buranasudja, V.; Muangnoi, C.; Sanookpan, K.; Halim, H.; Sritularak, B.; Rojsitthisak, P. Eriodictyol Attenuates H₂O₂-Induced Oxidative Damage in Human Dermal Fibroblasts through Enhanced Capacity of Antioxidant Machinery. *Nutrients* **2022**, *14*, 2553. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Debnath, S.; Sarkar, A.; Das Mukherjee, D.; Ray, S.; Mahata, B.; Mahata, T.; Parida, P.K.; Das, T.; Mukhopadhyay, R.; Ghosh, Z.; et al. Eriodictyol Mediated Selective Targeting of the TNFR1/FADD/TRADD Axis in Cancer Cells Induce Apoptosis and Inhibit Tumor Progression and Metastasis. *Transl. Oncol.* **2022**, *21*, 101433. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. He, J.; Fu, H.; Li, C.; Deng, Z.; Chang, H. Eriodictyol Inhibits Breast Carcinogenesis by Targeting Circ_0007503 and Repressing PI3K/Akt Pathway. *Phytomedicine* **2022**, *102*, 154159. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lee, J.; Sim, W.; Han, S.-I.; Byeon, J.-H.; Jin, S.-B.; Morshidi, N.A.A.B.; Hong, Y.-Y.; Jung, Y.; Kim, J.H. Eriodictyol Attenuates Cholangiocarcinoma Malignancy by Regulating HMOX1 Expression: An In Vitro Study. *Anticancer Res.* **2022**, *42*, 3789–3798. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Zhao, L.; Qin, X.; Lin, T.; Xie, F.; Yao, L.; Li, Y.; Xiong, B.; Xu, Z.; Ye, Y.; Chen, H.; et al. Multi-Target Mechanisms against Coronaviruses of Constituents from Chinese Dagang Tea Revealed by Experimental and Docking Studies. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *297*, 115528. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Guo, P.; Zeng, M.; Wang, S.; Cao, B.; Liu, M.; Zhang, Y.; Jia, J.; Zhang, Q.; Zhang, B.; Wang, R.; et al. Eriodictyol and Homoeriodictyol Improve Memory Impairment in A β ₂₅₋₃₅-Induced Mice by Inhibiting the NLRP3 Inflammasome. *Molecules* **2022**, *27*, 2488. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Li, L.; Li, W.-J.; Zheng, X.-R.; Liu, Q.-L.; Du, Q.; Lai, Y.-J.; Liu, S.-Q. Eriodictyol Ameliorates Cognitive Dysfunction in APP/PS1 Mice by Inhibiting Ferroptosis via Vitamin D Receptor-Mediated Nrf2 Activation. *Mol. Med.* **2022**, *28*, 11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Maquera-Huacho, P.M.; Spolidorio, D.P.; Manthey, J.A.; Grenier, D. Eriodictyol Suppresses *Porphyromonas Gingivalis*-Induced Reactive Oxygen Species Production by Gingival Keratinocytes and the Inflammatory Response of Macrophages. *Front. Oral Health* **2022**, *3*, 847914. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Xie, Y.; Ji, R.; Han, M. Eriodictyol Protects H9c2 Cardiomyocytes against the Injury Induced by Hypoxia/Reoxygenation by Improving the Dysfunction of Mitochondria. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *17*, 551–557. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Hu, Q.; Qu, C.; Xiao, X.; Zhang, W.; Jiang, Y.; Wu, Z.; Song, D.; Peng, X.; Ma, X.; Zhao, Y. Flavonoids on Diabetic Nephropathy: Advances and Therapeutic Opportunities. *Chin. Med.* **2021**, *16*, 74. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Kwon, E.-Y.; Choi, M.-S. Dietary Eriodictyol Alleviates Adiposity, Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Inflammation in Diet-Induced Obese Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1227. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

15. Yang, T.; Li, X.; Yu, J.; Deng, X.; Shen, P.-X.; Jiang, Y.-B.; Zhu, L.; Wang, Z.-Z.; Zhang, Y. Eriodictyol Suppresses Th17 Differentiation and the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Food Funct.* **2020**, *11*, 6875–6888. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Nisar, M.F.; Liu, T.; Wang, M.; Chen, S.; Chang, L.; Karisma, V.W.; Weixu, Diao, Q.; Xue, M.; Tang, X.; et al. Eriodictyol Protects Skin Cells from UVA Irradiation-Induced Photodamage by Inhibition of the MAPK Signaling Pathway. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2022**, *226*, 112350. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Liszt, K.I.; Hans, J.; Ley, J.P.; Köck, E.; Somoza, V. Characterization of Bitter Compounds via Modulation of Proton Secretion in Human Gastric Parietal Cells in Culture. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2295–2300. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Beltrán, L.R.; Sterneder, S.; Hasural, A.; Paetz, S.; Hans, J.; Ley, J.P.; Somoza, V. Reducing the Bitter Taste of Pharmaceuticals Using Cell-Based Identification of Bitter-Masking Compounds. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 317. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Islam, A.; Islam, M.S.; Rahman, M.K.; Uddin, M.N.; Akanda, M.R. The Pharmacological and Biological Roles of Eriodictyol. *Arch. Pharmacol. Res.* **2020**, *43*, 582–592. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Deng, Z.; Hassan, S.; Rafiq, M.; Li, H.; He, Y.; Cai, Y.; Kang, X.; Liu, Z.; Yan, T. Pharmacological Activity of Eriodictyol: The Major Natural Polyphenolic Flavanone. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 6681352. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zhu, S.; Wu, J.; Du, G.; Zhou, J.; Chen, J. Efficient Synthesis of Eriodictyol from L-Tyrosine in *Escherichia Coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3072–3080. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thuan, N.H.; Tatipamula, V.B.; Viet, T.T.; Tien, N.Q.D.; Loc, N.H. Bioproduction of Eriodictyol by *Escherichia Coli* Engineered Co-Culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 112. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Yan, Y.; Kohli, A.; Koffas, M.A.G. Biosynthesis of Natural Flavanones in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5610–5613. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Gao, S.; Xu, X.; Zeng, W.; Xu, S.; Lyv, Y.; Feng, Y.; Kai, G.; Zhou, J.; Chen, J. Efficient Biosynthesis of (2S)-Eriodictyol from (2S)-Naringenin in *Saccharomyces cerevisiae* through a Combination of Promoter Adjustment and Directed Evolution. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9*, 3288–3297. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Wu, X.; Liu, J.; Liu, D.; Yuwen, M.; Koffas, M.A.G.; Zha, J. Biosynthesis of Eriodictyol from Tyrosine by *Corynebacterium Glutamicum*. *Microb. Cell Factories* **2022**, *21*, 86. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Marín, L.; Gutiérrez-Del-Río, I.; Yagüe, P.; Manteca, Á.; Villar, C.J.; Lombó, F. De Novo Biosynthesis of Apigenin, Luteolin, and Eriodictyol in the Actinomycete *Streptomyces albus* and Production Improvement by Feeding and Spore Conditioning. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 921. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lv, Y.; Marsafari, M.; Koffas, M.; Zhou, J.; Xu, P. Optimizing Oleaginous Yeast Cell Factories for Flavonoids and Hydroxylated Flavonoids Biosynthesis. *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8*, 2514–2523. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Fowler, Z.L.; Gikandi, W.W.; Koffas, M.A.G. Increased Malonyl Coenzyme A Biosynthesis by Tuning the *Escherichia Coli* Metabolic Network and Its Application to Flavanone Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5831–5839. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Leonard, E.; Yan, Y.; Fowler, Z.L.; Li, Z.; Lim, C.-G.; Lim, K.-H.; Koffas, M.A.G. Strain Improvement of Recombinant *Escherichia Coli* for Efficient Production of Plant Flavonoids. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 257–265. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Lombó, F.; Pfeifer, B.; Leaf, T.; Ou, S.; Kim, Y.S.; Cane, D.E.; Licari, P.; Khosla, C. Enhancing the atom economy of polyketide biosynthetic processes through metabolic engineering. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 612–617. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Álvarez-Álvarez, R.; Botas, A.; Albillos, S.M.; Rumbero, A.; Martín, J.F.; Liras, P. Molecular Genetics of Naringenin Biosynthesis, a Typical Plant Secondary Metabolite Produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microb. Cell Factories* **2015**, *14*, 178. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Martín, J.F.; Liras, P. Comparative Molecular Mechanisms of Biosynthesis of Naringenin and Related Chalcones in Actinobacteria and Plants: Relevance for the Obtention of Potent Bioactive Metabolites. *Antibiotics* **2022**, *11*, 82. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Marín, L.; Gutiérrez-del-Río, I.; Entrialgo-Cadierno, R.; Claudio; Villar, J.; Lombó, F. De Novo Biosynthesis of Myricetin, Kaempferol and Quercetin in *Streptomyces Albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207278. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. Wang, W.; Li, S.; Li, Z.; Zhang, J.; Fan, K.; Tan, G.; Ai, G.; Lam, S.M.; Shui, G.; Yang, Z.; et al. Harnessing the Intracellular Triacylglycerols for Titer Improvement of Polyketides in *Streptomyces*. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 76–83. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Ryu, Y.-G.; Butler, M.J.; Chater, K.F.; Lee, K.J. Engineering of Primary Carbohydrate Metabolism for Increased Production of Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7132–7139. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Gomez-Escribano, J.P.; Bibb, M.J. Engineering *Streptomyces coelicolor* for Heterologous Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters. *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 207–215. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Myronovskyi, M.; Rosenkränzer, B.; Nadmid, S.; Pujic, P.; Normand, P.; Luzhetskyy, A. Generation of a Cluster-Free *Streptomyces Albus* Chassis Strains for Improved Heterologous Expression of Secondary Metabolite Clusters. *Metab. Eng.* **2018**, *49*, 316–324. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Blázquez, B.; Torres-Bacete, J.; Leon, D.S.; Kniewel, R.; Martinez, I.; Sordon, S.; Wilczak, A.; Salgado, S.; Huszcza, E.; Popłoński, J.; et al. Golden Standard: A Complete Standard, Portable, and Interoperative MoClo Tool for Model and Non-Model Bacterial Hosts. *bioRxiv* 2022. [[CrossRef](#)]
39. García-Gutiérrez, C.; Aparicio, T.; Torres-Sánchez, L.; Martínez-García, E.; de Lorenzo, V.; Villar, C.J.; Lombó, F. Multifunctional SEVA Shuttle Vectors for Actinomycetes and Gram-Negative Bacteria. *Microbiologyopen* **2020**, *9*, 1135–1149. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Torella, J.P.; Lienert, F.; Boehm, C.R.; Chen, J.-H.; Way, J.C.; Silver, P.A. Unique Nucleotide Sequence-Guided Assembly of Repetitive DNA Parts for Synthetic Biology Applications. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 2075–2089. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Alberti, F.; Corre, C. Editing Streptomyces Genomes in the CRISPR/Cas9 Age. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 1237–1248. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Weber, E.; Engler, C.; Gruetzner, R.; Werner, S.; Marillonnet, S. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16765. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Maas, R.-M.; Gutz, J.; Wohlleben, W.; Muth, G. The Conjugative Plasmid PSG5 from *Streptomyces Ghanaensis* DSM 2932 Differs in Its Transfer Functions from Other *Streptomyces* Rolling-Circle-Type Plasmids. *Microbiology* **1998**, *144*, 2809–2817. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Cobb, R.E.; Wang, Y.; Zhao, H. High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 723–728. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
45. Labes, G.; Bibb, M.; Wohlleben, W. Isolation and Characterization of a Strong Promoter Element from the *Streptomyces Ghanaensis* Phage 119 Using the Gentamicin Resistance Gene (AacC1) of Tn1696 as Reporter. *Microbiology* **1997**, *143*, 1503–1512. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bibb, M.J.; White, J.; Ward, J.M.; Janssen, G.R. The MRNA for the 23S RRNA Methylase Encoded by the ErmE Gene of *Saccharopolyspora Erythraea* Is Translated in the Absence of a Conventional Ribosome-binding Site. *Mol. Microbiol.* **1994**, *14*, 533–545. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Bai, C.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Hu, Y.; Xiang, S.; Miao, J.; Lou, C.; Zhang, L. Exploiting a Precise Design of Universal Synthetic Modular Regulatory Elements to Unlock the Microbial Natural Products in *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 12181–12186. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Martínez-García, E.; Goñi-Moreno, A.; Bartley, B.; McLaughlin, J.; Sánchez-Sampedro, L.; Pascual del Pozo, H.; Prieto Hernández, C.; Marletta, A.S.; De Lucrezia, D.; Sánchez-Fernández, G.; et al. SEVA 3.0: An Update of the Standard European Vector Architecture for Enabling Portability of Genetic Constructs among Diverse Bacterial Hosts. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *48*, D1164–D1170. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Thorpe, H.M.; Smith, M.C.M. In Vitro Site-Specific Integration of Bacteriophage DNA Catalyzed by a Recombinase of the-Resolvase/Invertase Family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5505–5510. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gregory, M.A.; Till, R.; Smith, M.C.M. Integration Site for *Streptomyces* Phage ΦBT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 5320–5323. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bocard, F.; Smokvina, T.; Pernodet, J.L.; Friedmann, A.; Guérineau, M. The Integrated Conjugative Plasmid PSAM2 of *Streptomyces Ambofaciens* Is Related to Temperate Bacteriophages. *EMBO J.* **1989**, *8*, 973–980. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Xu, T.; Li, Y.; Shi, Z.; Hemme, C.L.; Li, Y.; Zhu, Y.; Van Nostrand, J.D.; He, Z.; Zhou, J. Efficient Genome Editing in *Clostridium Cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 4423–4431. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Olano, C.; García, I.; González, A.; Rodríguez, M.; Rozas, D.; Rubio, J.; Sánchez-Hidalgo, M.; Braña, A.F.; Méndez, C.; Salas, J.A. Activation and Identification of Five Clusters for Secondary Metabolites in *Streptomyces Albus* J1074. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, 242–256. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Zaburanyi, N.; Rabyk, M.; Ostash, B.; Fedorenko, V.; Luzhetskyy, A. Insights into Naturally Minimised *Streptomyces Albidoflavus* J1074 Genome. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 97. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Alam, M.T.; Medema, M.H.; Takano, E.; Breitling, R. Comparative Genome-Scale Metabolic Modeling of Actinomycetes: The Topology of Essential Core Metabolism. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2389–2394. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Blin, K.; Medema, M.H.; Kazempour, D.; Fischbach, M.A.; Breitling, R.; Takano, E.; Weber, T. AntiSMASH 2. – A Versatile Platform for Genome Mining of Secondary Metabolite Producers. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W204–W212. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
57. Gil, J.A.; Campelo-Diez, A.B. Candicidin Biosynthesis in *Streptomyces Griseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 633–642. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Liu, J.; Zhu, X.; Kim, S.J.; Zhang, W. Antimycin-Type Depsipeptides: Discovery, Biosynthesis, Chemical Synthesis, and Bioactivities. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1146–1165. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Wentzel, A.; Bruheim, P.; Øverby, A.; Jakobsen, Ø.M.; Sletta, H.; Omara, W.A.M.; Hodgson, D.A.; Ellingsen, T.E. Optimized Submerged Batch Fermentation Strategy for Systems Scale Studies of Metabolic Switching in *Streptomyces Coelicolor* A3(2). *BMC Syst. Biol.* **2012**, *6*, 59. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Kurth, D.G.; Gago, G.M.; de la Iglesia, A.; Bazet Lyonnet, B.; Lin, T.-W.; Morbidoni, H.R.; Tsai, S.-C.; Gramajo, H. ACCase 6 Is the Essential Acetyl-CoA Carboxylase Involved in Fatty Acid and Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacteria. *Microbiology* **2009**, *155*, 2664–2675. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Gago, G.; Diacovich, L.; Arabolaza, A.; Tsai, S.-C.; Gramajo, H. Fatty Acid Biosynthesis in Actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 475–497. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Combes, P.; Till, R.; Bee, S.; Smith, M.C.M. The *Streptomyces* Genome Contains Multiple Pseudo-*AttB* Sites for the Φ C31-Encoded Site-Specific Recombination System. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5746–5752. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bilyk, B.; Luzhetskyy, A. Unusual Site-Specific DNA Integration into the Highly Active Pseudo-*AttB* of the *Streptomyces Albus* J1074 Genome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5095–5104. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bilyk, B.; Horbal, L.; Luzhetskyy, A. Chromosomal Position Effect Influences the Heterologous Expression of Genes and Biosynthetic Gene Clusters in *Streptomyces Albus* J1074. *Microb. Cell Factories* **2017**, *16*, 5. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kieser, T.; Chater, K.; Bibb, M.; Buttner, M.; Hopwood, D. *Practical Streptomyces Genetics*; John Innes Foundation: Norwich, UK, 2000. [[Google Scholar](#)]
66. Fernández, E.; Weissbach, U.; Reillo, C.S.; Braña, A.F.; Méndez, C.; Rohr, J.; Salas, J.A. Identification of Two Genes from *Streptomyces Argillaceus* Encoding Glycosyltransferases Involved in Transfer of a Disaccharide during Biosynthesis of the Antitumor Drug Mithramycin. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4929–4937. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
67. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2001; ISBN 0879695773. [[Google Scholar](#)]
68. Martínez-García, E.; Fraile, S.; Algar, E.; Aparicio, T.; Velázquez, E.; Calles, B.; Tas, H.; Blázquez, B.; Martín, B.; Prieto, C.; et al. SEVA 4.0: An Update of the Standard European Vector Architecture Database for Advanced Analysis and Programming of Bacterial Phenotypes. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D1558–D1567. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Myronovskiy, M.; Luzhetskyy, A. Native and Engineered Promoters in Natural Product Discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1006–1019. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
70. Lou, C.; Stanton, B.; Chen, Y.-J.; Munsky, B.; Voigt, C.A. Ribozyme-Based Insulator Parts Buffer Synthetic Circuits from Genetic Context. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 1137–1142. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
71. Horbal, L.; Siegl, T.; Luzhetskyy, A. A Set of Synthetic Versatile Genetic Control Elements for the Efficient Expression of Genes in Actinobacteria. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 491. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESULTADOS. Capítulo 2

RESEARCH

Open Access



Metabolic engineering strategies for naringenin production enhancement in *Streptomyces albidoflavus* J1074

Suhui Ye^{1,2,3†}, Patricia Magadán-Corpas^{1,2,3†}, Álvaro Pérez-Valero^{1,2,3}, Claudio J. Villar^{1,2,3} and Felipe Lombó^{1,2,3*}**Abstract**

Background Naringenin is an industrially relevant compound due to its multiple pharmaceutical properties as well as its central role in flavonoid biosynthesis.

Results On our way to develop *Streptomyces albidoflavus* J1074 as a microbial cell factory for naringenin production, we have significantly increased the yields of this flavanone by combining various metabolic engineering strategies, fermentation strategies and genome editing approaches in a stepwise manner. Specifically, we have screened different cultivation media to identify the optimal production conditions and have investigated how the additive feeding of naringenin precursors influences the production. Furthermore, we have employed genome editing strategies to remove biosynthetic gene clusters (BGCs) associated with pathways that might compete with naringenin biosynthesis for malonyl-CoA precursors. Moreover, we have expressed MatBC, coding for a malonate transporter and an enzyme responsible for the conversion of malonate into malonyl-CoA, respectively, and have duplicated the naringenin BGC, further contributing to the production improvement. By combining all of these strategies, we were able to achieve a remarkable 375-fold increase (from 0.06 mg/L to 22.47 mg/L) in naringenin titers.

Conclusion This work demonstrates the influence that fermentation conditions have over the final yield of a bioactive compound of interest and highlights various bottlenecks that affect production. Once such bottlenecks are identified, different strategies can be applied to overcome them, although the efficiencies of such strategies may vary and are difficult to predict.

Keywords Flavonoid, Polyphenol, Genome editing, Fermentation optimization, Malonate

[†]Suhui Ye and Patricia Magadán-Corpas contributed equally to this work.

*Correspondence:

Felipe Lombó
lombofelipe@uniovi.es

¹Research Group BIONUC (Biotechnology of Nutraceuticals and Bioactive Compounds), Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Principality of Asturias, Spain

²Principality of Asturias, IUOPA (Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias), Principality of Asturias, Spain

³ISPA (Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias), Principality of Asturias, Spain



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

Naringenin, a citrus flavanone that belongs to the flavonoids polyphenols subgroup, is an important phytochemical displaying numerous pharmaceutical properties, such as antitumoral [1], neuroprotective [2], antidiabetic [3], hepatoprotective [4], anti-inflammatory [5] and antioxidant [6]. Besides, naringenin occupies a central position in the flavonoid biosynthesis pathway, as is used as the scaffold molecule for further enzymatic modifications involving diverse tailoring steps (e.g. hydroxylations, dehydrogenations, glycosylations, methylations, etc.) [7, 8]. Four genes are necessary for naringenin biosynthesis in a bacterium such as *Streptomyces albidoflavus* J1074: a tyrosine ammonia-lyase (TAL) converts L-tyrosine to *p*-Coumaric acid (*p*-CA), which is subsequently activated into coumaroyl-CoA by a 4-coumarate-CoA ligase (4CL). Then, one molecule of coumaroyl-CoA is condensed with three molecules of malonyl-CoA by chalcone synthase (CHS) to give rise to naringenin chalcone, which is then isomerized into naringenin via chalcone isomerase (CHI) [9]. Despite its outstanding properties, naringenin industrial production has been limited mainly to plant biomass extraction (mainly from citrus fruits), a process that requires high amounts of starting material, with a low productivity and a complex mixture of secondary metabolites generated, which makes the final purification a difficult task. In this regard, utilization of other biotechnological platforms, such as microbial-based expression systems, offers a promising alternative. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* spp. and *Yarrowia lipolytica* are some of the microorganisms that have been genetically engineered for the heterologous production of naringenin and other flavonoids [7, 10]. However, flavonoid production levels in these engineered microbes are low, which makes it necessary to further optimize the strains or their cultivation conditions in order to turn them into real microbial cell factories able to meet the industrial requirements. Among other microorganisms used for heterologous flavonoid production, *Streptomyces* spp. (well known as producers of multiple bioactive compounds) stand out as the most appropriate hosts, as they possess a complete repertoire of precursors, cofactors, and enzymes [11].

The naringenin biosynthesis pathway in a microbial host normally uses L-tyrosine and malonyl-CoA as initial precursors, in contrast to plants, where L-phenylalanine is usually the initial amino acid [10].

The cytoplasmic availability of precursors and cofactors constitutes the main bottleneck for naringenin heterologous production in bacteria. This issue can be addressed at fermentation and/or strain levels. Regarding fermentation conditions, a general approach consists of testing different production media, as culture medium composition optimization has been shown to affect at a

great extent final naringenin heterologous production titers [12]. Such strategy to improve the production of flavonoids (or other natural compounds) has been proven to be highly successful in microorganisms with complex regulation, such as *Streptomyces* spp [13, 14]. Besides, medium composition can be modified by the addition of exogenous flavonoid precursors such as *p*-CA or L-tyrosine, which are bioavailable for the cell metabolism.

Also, in the case of malonyl-CoA, other feeding strategies have been adopted in order to enhance the intracellular pool of this precursor, such as the addition of the fatty acid synthase inhibitor cerulenin. This compound represses both FabB (3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (I)) and FabF (3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (II)) [15, 16], thus limiting the amount of malonyl-CoA that is used for the biosynthesis of fatty acids and therefore increasing the cytoplasmic pool of malonyl-CoA available for the biosynthesis of secondary metabolites, such as flavonoids in this case [17]. Another strategy is based on the additive feeding with the precursor of malonyl-CoA, malonate. However, this approach normally requires genetic modifications in order to incorporate a novel carbon assimilation pathway coded by the *matBC* operon, composed of the genes for malonate importer MatC and the malonyl-CoA synthase MatB [18]. The intracellular pool of malonyl-CoA can also be increased by modifying cellular pathways to channel carbon flux towards this precursor. As malonyl-CoA is an essential building block to produce fatty acids and phospholipids, its metabolism can be genetically engineered in order to favor its flux towards flavonoids biosynthesis [19]. However, these genetic modifications affecting primary metabolism building blocks must be cautiously applied in order to preserve the normal growth of the cell.

Also, some microorganisms, such as *Streptomyces* spp., possess endogenous biosynthetic gene clusters (BGCs) directing the biosynthesis of native secondary metabolites such as polyketides, which consume high amounts of cytosolic malonyl-CoA and other cofactors, therefore competing with the heterologous production of flavonoids, which needs the same precursors. Thus, removal of these native BGCs has been proven as a very successful strategy for diverting malonyl-CoA pools towards other targeted compounds, such as flavonoids, without altering neither the cell fitness nor the growth rate [9, 18, 19].

Apart from the modifications of host metabolic fluxes mentioned above, further improvements could be achieved by manipulating genes of naringenin BGC, such as testing alternative enzymes from different sources, or a proper balancing of enzymatic functions (adjusting the copy number of the different genes coding for naringenin BGC), as well as increasing the gene copy number. These

approaches have shown positive results in different hosts, such as *E. coli* or *S. cerevisiae* [17, 20].

In this work, we have combined an array of metabolic engineering strategies in a stepwise manner (culture medium optimization, deletion of three chromosomal gene clusters, duplication of the naringenin BGC, heterologous expression of *matBC*, feeding with different flavonoid precursors or fatty acid biosynthesis inhibitors), in order to increase final naringenin heterologous production titers in the promising industrial host *S. albidoflavus* J1074.

Results

Effect of the culture medium on naringenin production

S. albidoflavus WT-NAR [9] is a *S. albidoflavus* J1074 wild type (WT) strain that harbors the naringenin BGC integrated into ϕ C31 *attB* site. This strain was initially cultivated following our standard conditions for flavonoids production, which includes R5A as production medium [9, 21–23]. Cultivation was performed as described in [Materials and Methods](#) section, while the concentrations of naringenin and *p*-CA, as well as the biomass accumulation, were monitored every 24 h over 144 h.

According to our experience with heterologously produced flavonoids in this bacterium, naringenin titers are low, reaching 0.06 mg/L 120 h after the inoculation in R5A medium, concomitantly with a decrease in *p*-CA levels (Fig. 1A). Subsequently, levels of both molecules remain stable. The growth curve indicates an exponential phase until 24 h after inoculation, followed by stationary phase until 120 h after inoculation and a consequent increase in biomass that does not correlate with increased levels of naringenin nor *p*-CA in this culture medium (Fig. 1A).

As a first approach for improving naringenin titers, two other production culture media were tested: TSB (Fig. 1B), which has been used for native naringenin production in *S. clavuligerus* ATCC 27064 [13], and NL333 (Fig. 1C), which is a medium used for secondary metabolite production in *S. albidoflavus* J1074 [24].

S. albidoflavus WT-NAR showed improved performance in both of them compared to the R5A medium, achieving higher titers of naringenin, *p*-CA and biomass. Moreover, maximum production levels of naringenin in these media were achieved earlier than in R5A: after only 48 h of cultivation. This makes both media more suitable for an industrial naringenin production.

Regarding biomass accumulation, in TSB (Fig. 1B F), the exponential phase is, likewise the R5A, achieved 24 h after inoculation, but a decrease in this parameter is observed afterwards. In the case of NL333, the highest biomass was reached 48 h after inoculation (Fig. 1D F).

In the case of *p*-CA, in TSB medium, the maximum production concurs with naringenin highest peak, but in this case the *p*-CA levels are increased overtime, with a maximum *p*-CA concentration at the end of the cultivation (Fig. 1B and E). In the case of NL333 medium, *p*-CA showed a maximum at 72 h, with maintained levels towards the end of cultivation phase (Fig. 1C and E).

Finally, in the case of naringenin production, in R5A medium, its maximum takes place 120 h (Fig. 1A and D), whereas in TSB and NL333 media this maximum is achieved at 48 h (Fig. 1B C and 1D). These naringenin titers achieved 2 mg/L in NL333, entailing a 2.5-fold increase in the production compared to the maximum production in TSB (0.8 mg/L 48 h after inoculation) and a 33.3-fold increase compared to the maximum production in R5A (0.06 mg/L 120 h after inoculation) (Fig. 1D).

Effect of the deletion of three native *S. albidoflavus* J1074 gene clusters on naringenin production.

Our second approach to increase naringenin production titers was focused on removing *S. albidoflavus* J1074 native BGCs coding the biosynthesis of antimycins, candididins and a cryptic PKS-NRPS compound. All three biosynthetic pathways require malonyl-CoA as a precursor. This strategy was successfully applied in our previous studies with *S. albidoflavus* J1074 producing heterologous eriodictyol [9].

S. albidoflavus UO-FLAV-002-NAR [9] is a *S. albidoflavus* J1074 strain in which a chromosomal region containing the three abovementioned BGCs was replaced by the *matBC* genes from *Rhizobium trifolii* (under the control of the *ermE** promoter) [25]. Moreover, *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR carries naringenin BGC integrated into ϕ C31 *attB* site. Both, *S. albidoflavus* WT-NAR and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR strains were cultivated in R5A, TSB and NL333 media, and naringenin production was measured at the maximum production time point for each media: 120 h for R5A and 48 h for TSB and NL333. No statistically significant differences were observed in TSB or NL333, but a 4-fold increase in naringenin production (0.24 mg/L vs. 0.06 mg/L) was observed when the new mutant strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR was cultivated in R5A culture medium compared to the initial strain *S. albidoflavus* WT-NAR strain (Fig. 2). These results validate the effectiveness of removing native BGCs encoding secondary metabolites which consume intracellular malonyl-CoA pool, as a strategy to increase final flavonoid production. Notably, NL333 culture medium remains optimal for the naringenin production in *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR.

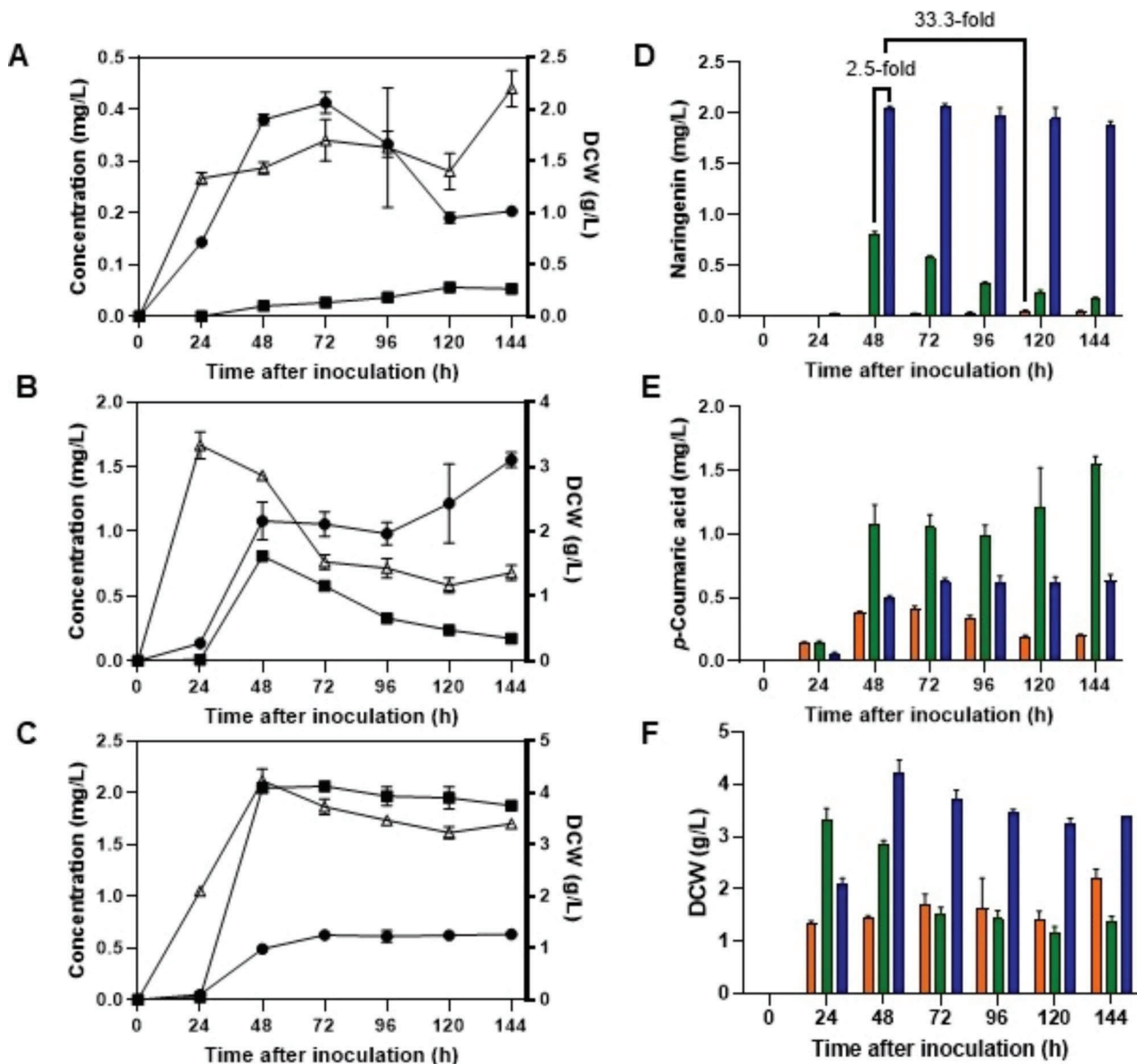


Fig. 1 *S. albidoflavus* WT-NAR strain cultured in R5A, TSB and NL333. Time courses of naringenin production (■), *p*-Coumaric acid production (●), and growth (Δ) for *S. albidoflavus* WT-NAR in (A) R5A, (B) TSB, (C) NL333 culture media. Grouped time courses of (D) naringenin, (E) *p*-Coumaric acid, and (F) growth, in R5A (orange), TSB (green), and NL333 (blue). The folds of the increase in naringenin production are depicted. DCW: dry cell weight

Effect of the additional copies of naringenin BGC on naringenin production

As a third approach, we introduced a second copy of naringenin BGC integrated in the bacterium chromosome. For this purpose, the naringenin BGC was assembled using Golden Standard and integrated into the ϕ BT1 *attB* site of *S. albidoflavus* WT-NAR and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR strains as described in Materials and Methods, to generate *S. albidoflavus* WT-NARNAR and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR strains, respectively [26]. *S. albidoflavus* WT and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 strains bearing one or two copies of the

naringenin BGC were cultivated in NL333 and naringenin production titers were measured 48 h after inoculation. In both cases, a similar increase in naringenin production was observed after the introduction of a second copy of the naringenin BGC: 1.83-fold (3.14 mg/L vs. 1.71 mg/L) in the *S. albidoflavus* WT strain, and 1.96-fold (3.21 mg/L vs. 1.63 mg/L) in the *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 strain (Fig. 3).

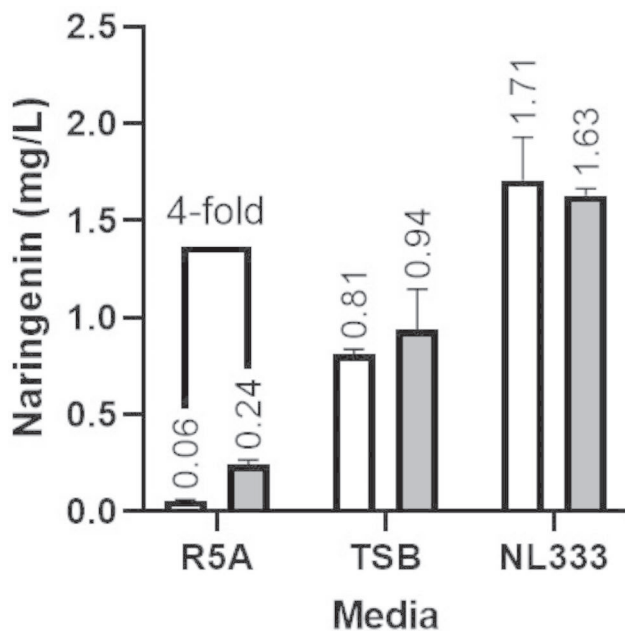


Fig. 2 Effect of removing three endogenous BGCs encoding secondary metabolites that consume intracellular malonyl-CoA. *S. albidoflavus* WT-NAR (white) and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR (grey) strains cultured in R5A, TSB and NL333 media. Naringenin concentration was measured 48 h after inoculation for TSB and NL333, and 120 h after inoculation for R5A. The folds of the increase in naringenin production are depicted

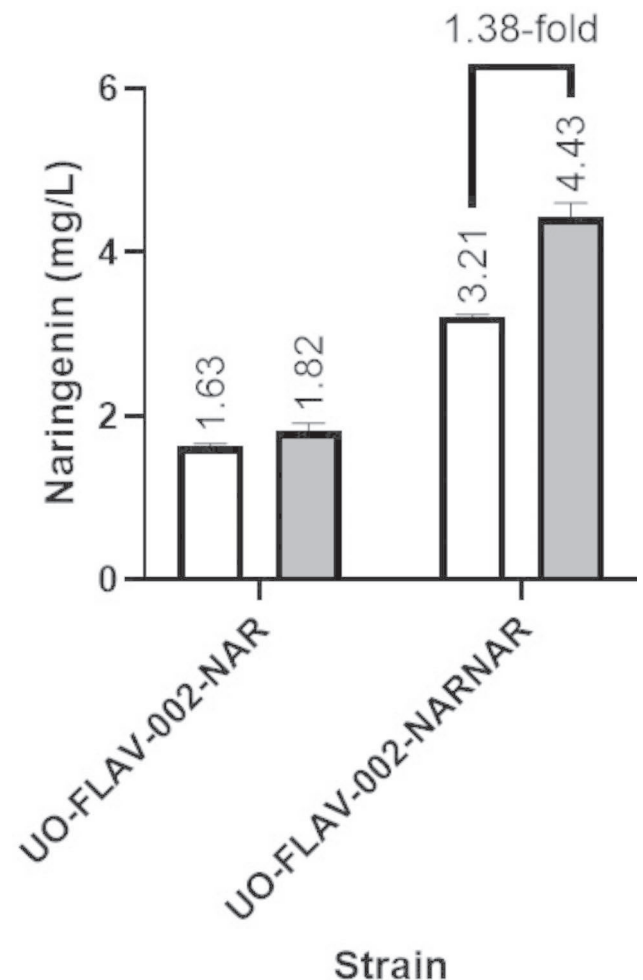


Fig. 4 Effect of the heterologous expression of the MatBC enzymes upon malonate feeding. The *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 strains bearing one or two copies of the naringenin BGC were cultured in NL333 (white) and NL333 with malonate 20 mM (grey). Naringenin concentration was measured 48 h after inoculation. The folds of the increase in naringenin production are depicted

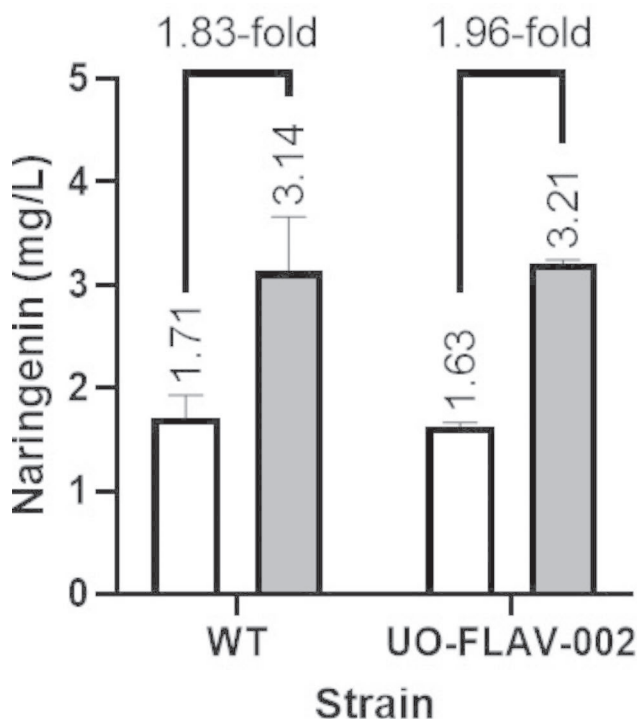


Fig. 3 Effect of naringenin BGC duplication. *S. albidoflavus* WT and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 strains bearing one copy of the naringenin BGC (white) or two copies (grey), integrated into their chromosome. Naringenin concentration was measured 48 h after inoculation in NL333. The folds of increase in naringenin production are depicted

Effect of the heterologous expression of MatBC in combination with the additive feeding with malonate on naringenin production

The fourth approach we followed consisted of increasing intracellular malonyl-CoA pool by adding malonate to the culture medium. This precursor can be imported to the bacterial cell and converted to malonyl-CoA by the *matBC*-encoded enzymes. This operon was already integrated in *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 chromosome, during the replacement of the native BGCs in this strain. The strains *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR were cultured in NL333 and in NL333 supplemented with 20 mM malonate. Naringenin production was measured in all cultures 48 h after incubation. No impact on naringenin production was observed after malonate feeding when one copy of naringenin BGC was present. However, when the

strain containing two copies of the naringenin BGC was analyzed, a 1.38-fold increase (4.43 mg/L vs. 3.21 mg/L) was observed in the naringenin titers (Fig. 4), confirming the proper functioning of MatBC enzymes and validating the effectiveness of this strategy.

Effect of feeding with the FAS inhibitor cerulenin on naringenin production

To further increase naringenin production levels, the fatty acid synthase inhibitor cerulenin was added to the

NL333 culture medium at different concentrations (0.01, 0.05 and 0.1 mM). However, no significant increase was observed in naringenin or *p*-CA titers at any of the tested concentrations (Fig. 5A and B). The antibiotic cerulenin is a non-competitive inhibitor of the fatty acid synthetases, which specifically acts by blocking the activity of β -ketoacyl thioester synthetase of this enzymatic complex, and therefore avoiding the use of malonyl-CoA [27].

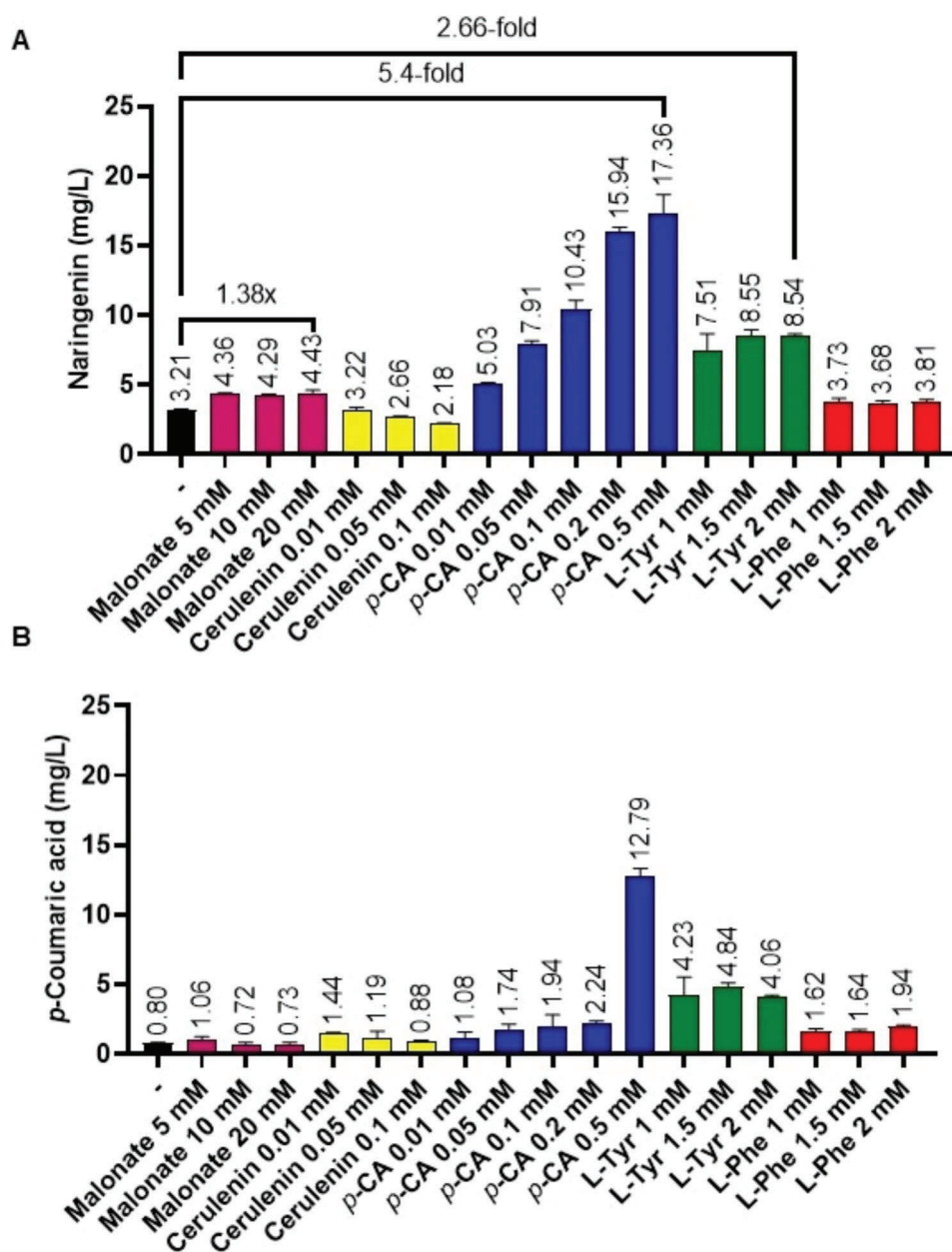


Fig. 5 Effect of the feeding experiments. Cultures of *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR in NL333 culture medium were supplemented with different concentrations of malonate, cerulenin, *p*-Coumaric acid (*p*-CA), L-tyrosine (L-Tyr) and L-phenylalanine (L-Phe). Samples were taken 48 h after inoculation and assessed for (A) naringenin production and (B) *p*-Coumaric acid production. A control experiment in plain NL333 without feeding was included (-). The folds of the increase in naringenin production are depicted

Effect of feeding with different precursors (malonate, L-tyrosine, L-phenylalanine, *p*-Coumaric acid) on naringenin production

In the last approach followed in the present study, the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR was cultured in NL333 medium supplemented with different precursors at various concentrations: (i) malonate 5, 10 and 20 mM; (ii) *p*-CA 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mM; (iii) L-tyrosine 1, 1.5 and 2 mM; (iv) L-phenylalanine 1, 1.5 and 2 mM. A triplicate control experiment in plain NL333 culture medium was included. Samples were taken 48 h after inoculation and naringenin and *p*-CA concentrations were measured by HPLC-DAD.

As mentioned above, a 1.38-fold increase in naringenin concentration was observed when 20 mM malonate was added to the culture medium. This increase was similar to the increase achieved at lower concentrations of malonate (5 mM or 10 mM), suggesting that 4.43 mg/L is the maximum amount of naringenin that can be obtained after malonate feeding in the assayed conditions (Fig. 5A).

Regarding *p*-CA feedings, a dose-dependent response of naringenin production was observed, with a maximum naringenin titer of 17.36 mg/L accomplished using 0.5 mM of *p*-CA added in the culture medium. This implies a 5.4-fold increase in naringenin production compared to the control conditions without feeding (Fig. 5A). Regarding intracellular *p*-CA levels, this precursor is accumulated in higher amounts when 0.5 mM of *p*-CA is used in the feeding, achieving 12.79 mg/L of intracellular levels (Fig. 5B), suggesting that higher concentrations of *p*-CA supplemented to the culture medium would not lead to higher titers of naringenin.

When L-tyrosine was fed to the culture medium, a similar increase in naringenin concentration was observed at all the tested concentrations, achieving 8.54 mg/L at 2 mM of supplemented L-tyrosine, which constitutes a 2.66-fold increase compared to the control conditions (Fig. 5A). However, no increase was observed when the precursor added to the culture was L-phenylalanine (Fig. 5A). This precursor was selected to indirectly increment the L-tyrosine intracellular pools, as it has been shown to positively regulate L-tyrosine biosynthesis in *S. reuineus* [28] and its supplementation to the medium has led to higher titers of naringenin in *S. clavuligerus* ATCC 27064 [13].

Regarding the intracellular *p*-CA levels, it was observed that the concentration of this precursor remained below 2.24 mg/L at most of the assayed conditions, with the exception of the feeding with *p*-CA 0.5 mM and all L-tyrosine tested concentrations (1 mM, 1.5 mM and 2 mM) (Fig. 5B). Interestingly, and in contrast to *p*-CA feeding experiments (12.79 mg/L of intracellular *p*-CA after 0.5 mM *p*-CA feeding), intracellular

p-CA concentrations when L-tyrosine was added to the medium were maintained at the same levels (between 4.06 and 4.23 mg/L) at all tested L-tyrosine concentrations, implying that *p*-CA accumulation in this case was probably due to different reasons than in the case of *p*-CA feeding.

Taking into account that L-tyrosine is a precursor converted to *p*-CA by the action of the TAL enzyme, we wondered if this accumulated *p*-CA might be later converted to naringenin and, therefore, higher levels of naringenin might be observed at later incubation times. Following this reasoning, new cultures were established adding *p*-CA 0.2 mM, *p*-CA 0.5 mM, L-tyrosine 1.5 mM or L-tyrosine 2 mM. Samples were taken every 48 h over 144 h total incubation, and naringenin and *p*-CA levels were measured by HPLC-DAD. In these experiments, higher titers of naringenin were observed at 96 and 144 h after feeding with L-tyrosine at both concentrations, with a maximum of 15.55 mg/L of naringenin recovered 144 h after inoculation in NL333 with L-tyrosine 2 mM (Fig. 6A). Thus, a 1.75-fold increase in naringenin titer was achieved after feeding with L-tyrosine 2 mM at 144 h incubation time in comparison with 48 h incubation. The overall increase achieved with L-tyrosine 2 mM feeding compared to the control without feeding was 4.8-fold. When *p*-CA was added to the culture medium, the maximum yield of naringenin was reached 96 h after incubation with *p*-CA 0.5 mM. This a 5.8-fold increase compared to the control without feeding (Fig. 6A). With respect to intracellular *p*-CA levels, a decrease in this precursor was observed overtime in the case of the *p*-CA feedings. In the case of L-tyrosine feedings, the *p*-CA intracellular levels were maintained until 96 h and decreased afterwards (in the case of 1.5 mM L-tyrosine feedings), or remained constant at every time point when 2 mM L-tyrosine was added to the culture (Fig. 6B).

Finally, another set of feedings were carried out combining different precursors: (i) *p*-CA 0.5 mM+malonate 20 mM; (ii) L-tyrosine 2 mM+malonate 20 mM; (iii) *p*-CA 0.5 mM+L-tyrosine 2 mM+malonate 20 mM. Naringenin and intracellular *p*-CA levels were measured every 48 h over 144 h (for the two first conditions), or over 192 h (for the last condition). In the case of *p*-CA and malonate joint feeding, naringenin and *p*-CA yields overtime showed the same trend as with *p*-CA alone (Fig. 6C and D). However, when malonate was combined with L-tyrosine, there was an increase in naringenin concentration 144 h after inoculation, reaching 19.72 mg/L (Fig. 6C). Accordingly, and in contrast to adding L-tyrosine 2 mM solely, a decrease in the *p*-CA levels was observed at the same time point (Fig. 6D). When *p*-CA, L-tyrosine and malonate were fed to the cultures, naringenin concentration overtime followed a combined trend between *p*-CA and L-tyrosine individual feedings. Thus,

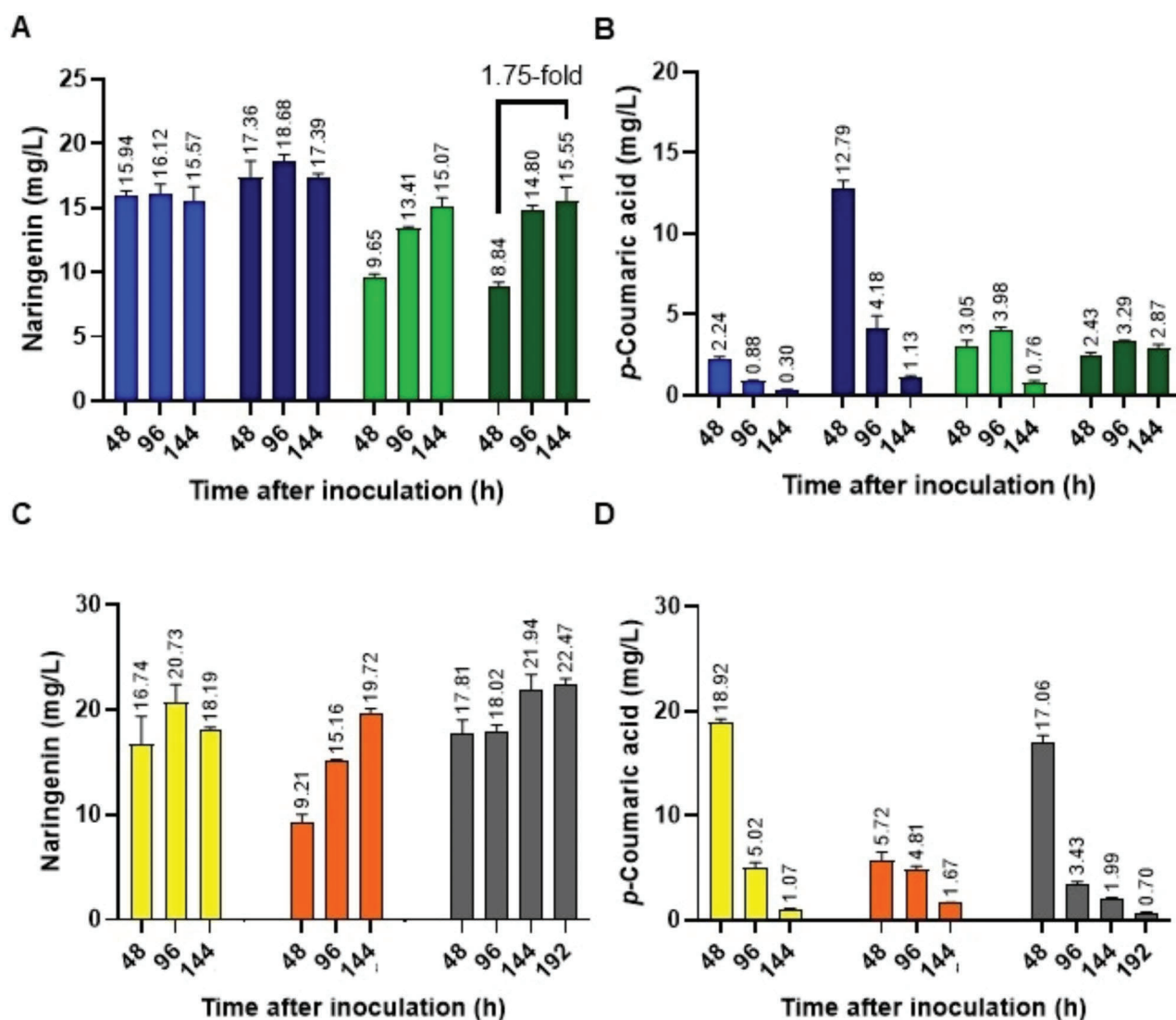


Fig. 6 Effect of feeding experiments along incubation times. Time courses of feeding experiments of *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR with *p*-CA 0.2 mM (light blue), *p*-CA 0.5 mM (dark blue), L-Tyr 1.5 mM (light green), and L-Tyr 2 mM (dark green). (A) Naringenin concentration, (B) *p*-Coumaric acid concentration. Time courses of feeding experiments with *p*-CA 0.5 mM + malonate 20 mM (yellow), L-Tyr 2 mM + malonate 20 mM (orange), and *p*-CA 0.5 mM + L-Tyr 2 mM + malonate 20 mM (grey). (C) Naringenin concentration, (D) *p*-Coumaric acid concentration. The folds of the increase in naringenin production are depicted

a high concentration of naringenin was observed at initial time points (48 and 96 h) and these titers increased afterwards (144 and 192 h), reaching 22.47 mg/L at 192 h after inoculation (Fig. 6C), which was the maximum concentration of naringenin achieved during this work.

Discussion

The heterologous production of various flavonoids has been achieved by our research group in the industrially relevant microbial host *Streptomyces albidoflavus* J1074 [9, 21–23]. However, the general titers have remained rather low, with yields usually below 1 mg/L. In this work, we have focused our efforts in applying different metabolic engineering strategies in a combinatorial way,

in order to enhance the naringenin yields in *S. albidoflavus* J1074.

The major improvement in the naringenin titers was achieved by culture media screening. Three media were tested: R5A, TSB and NL333, and among them, NL333 showed the best production titers, yielding 2 mg/L naringenin after 48 h of cultivation, which implies a 33.3-fold increase in naringenin production with respect to the 0.06 mg/L achieved in the standard culture conditions using R5A medium.

Malonyl-CoA was proven as a limiting factor for naringenin production in R5A, as removing three BGCs coding for biosynthetic pathways consuming malonyl-CoA led to a 4-fold improvement in naringenin yields. However,

this behavior was not observed in TSB nor NL333 media. There are some possible explanations for this observed phenotype. On one hand, malonyl-CoA levels might not be a current bottleneck to naringenin production in TSB nor NL333. On the other hand, regardless of malonyl-CoA being a limiting factor, if neither of the three BGCs are expressed in these culture conditions, their deletion would not have any effect on the intracellular malonyl-CoA levels.

In the case of the NL333 culture medium, we have determined that the copy number of the naringenin BGC (integrated in the bacterial chromosome) was actually a bottleneck for naringenin production, rather than the lack of enough intracellular malonyl-CoA precursor, as nearly a 2-fold increase in naringenin levels was detected when a second copy of naringenin BGC was integrated into both *S. albidoflavus* WT-NAR or *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR chromosomes.

Moreover, when *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR cultures in NL333 were fed with malonate, no increase was observed in the final naringenin levels. However, when this malonate feeding experiment was carried out in *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR, a 1.38-fold increase in naringenin yields was observed, indicating that, after introducing a second copy of naringenin BGC, malonyl-CoA becomes a bottleneck for the production of this flavonoid.

Further experiments were carried out, adding cerulenin to NL333 culture medium, in order to increase malonyl-CoA intracellular pools by inhibiting the fatty acid synthase activity (an important consumer of malonyl-CoA in the cell), but this approach showed no increase in the final naringenin yields. In fact, a certain dose-dependent decrease in naringenin levels might be observed (Fig. 5A), despite not being statistically significant. Although other studies reported positive effects on naringenin production by adding cerulenin to other host fermentations, this opposite result obtained in *S. albidoflavus* J1074 is not surprising taking into account that cerulenin is able to bind to CHS [29], and that this compound has been proven to inhibit the biosynthesis of other malonyl-CoA-derived polyketides, such as candicidin in *S. griseus* [30]. Moreover, cerulenin has been shown to reduce *E. coli* biomass while increasing flavonoid yields [18], but this effect was not observed neither with *S. griseus* nor in our studies with *S. albidoflavus* J1074 (data not shown). Therefore, rather than exerting a great impact on the fatty acid biosynthesis, cerulenin might be binding to naringenin CHS and therefore blocking its biosynthesis in *S. albidoflavus* J1074.

Finally, the precursor L-tyrosine and its derivative *p*-CA were detected as the main bottlenecks for naringenin production by *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR cultured in NL333 medium (Fig. 5A). Feedings with

these two precursors led to similar naringenin increase: a 5.8-fold at 96 h of cultivation when 0.5 mM *p*-CA was added to the medium, and a 4.8-fold at 144 h of cultivation when 2 mM L-tyrosine was added to the medium (Fig. 6A). Regarding this, *p*-CA feedings rendered higher naringenin yields in a shorter cultivation time. However, it is important to highlight the higher cost *p*-CA has with respect to L-tyrosine or L-phenylalanine. Feedings with various concentrations of L-phenylalanine were also conducted in order to enhance the L-tyrosine intracellular pools. However, no enhancement in naringenin yields was observed (Fig. 5A). As L-tyrosine indeed constitutes a bottleneck for final naringenin titers, we propose that for some reason, the exogenous addition of L-phenylalanine in our culture conditions are not leading to higher supply of L-tyrosine, maybe because externally added L-phenylalanine is deviated towards other catabolic pathways in *S. albidoflavus* J1074.

Conclusions

In summary, the combination of different metabolic engineering strategies in *S. albidoflavus* J1074 in order to enhance the heterologous production of naringenin has led to an overall 374.5-fold increase in naringenin production, from the initial 0.06 mg/L obtained by cultivating the *S. albidoflavus* WT strain with one copy of the naringenin BGC integrated into its chromosome and using R5A (over 120 h incubation time), to a final 22.47 mg/L achieved by cultivating the mutant *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 strain with two copies of naringenin BGC integrated into its chromosome, using NL333 supplemented with 20 mM malonate, 2 mM L-tyrosine and 0.5 mM *p*-CA (see Supplementary Figure S1 and S2).

Importantly, this work perfectly exemplifies the great influence that fermentation conditions have over the final yield of a targeted compound, even determining different precursors bottlenecks. Moreover, once one bottleneck is identified, the effectiveness of the strategy applied to address the same issue greatly varies and cannot be predicted beforehand. We believe that this work will serve to further develop *S. albidoflavus* J1074 as a flavonoid microbial cell factory.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

All strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown in Tryptic Soy Broth (TSB, VWR, Barcelona, Spain) or on TSB agar plates. *S. albidoflavus* J1074 and derivatives were grown at 30 °C in Yeast Extract-Malt Extract 17% (w/v) sucrose (YEME) for protoplasts preparation, and Bennett medium for sporulation [31]. Culture media were supplemented with the corresponding antibiotics (ampicillin 100 µg/ml, apramycin 50 µg/ml, thiostrepton 50 µg/ml on solid and 5 µg/ml

Table 1 Plasmids and strains used in this work (Ap^R: ampicillin-resistance; Tsr^R: thioestrepton-resistance; Am^R: apramycin-resistance)

Plasmid	Use in this work	Reference or source
pSEVAUO-M21703	φBT1, Ap ^R -Tsr ^R . Level 2 MoClo receptor vector for naringenin BGC cloning	(9)
pSEVAUO-M21102-TAL	φBT1, Ap ^R . Level 1 MoClo donor plasmid containing <i>P_{ermE+}-TAL</i>	(9)
pSEVAUO-M21202-4CL	φBT1, Am ^R . Level 1 MoClo donor plasmid containing <i>SF14-4CL</i>	(9)
pSEVAUO-M21302-CHS	φBT1, Am ^R . Level 1 MoClo donor plasmid containing <i>SP25-CHS</i>	(9)
pSEVAUO-M21402-CHI	φBT1, Am ^R . Level 1 MoClo donor plasmid containing <i>SP43-CHI</i>	(9)
pSEVAUO-M21703-NarBGC	φBT1, Ap ^R -Tsr ^R . It harbors the naringenin BGC	This work
Strain	Use in this work	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> Top10	Routine sub-cloning and DNA propagation	Invitrogen
<i>S. albidoflavus</i> WT-NAR	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with naringenin BGC integrated into φC31 site	(9)
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002-NAR	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002 with naringenin BGC integrated into φC31 site	(9)
<i>S. albidoflavus</i> WT-NARNAR	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with two copies of naringenin BGC, one integrated into φC31 site and another integrated into φBT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002-NARNAR	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002 with two copies of naringenin BGC, one integrated into φC31 site and another integrated into φBT1 site	This work

in liquid medium) and reagents (X-Gal 40 µg/ml), when necessary.

For flavonoid production, *S. albidoflavus* J1074 spores were quantified and 10⁶ spores/mL were inoculated into R5A [32], TSB (VWR, Barcelona, Spain) or NL333 [24] culture media. NL333 pH was adjusted to 7.2. Cultures were incubated at 30 °C and 250 revolutions per minute (rpm). Feeding experiments were carried out by adding the precursors to the medium at the same time that spores were inoculated.

Reagents, biochemicals and enzymes

All solvents used for solid phase extraction and HPLC-DAD analyses were LC-MS grade from either Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) or VWR Chemicals (Barcelona, Spain). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Thermo Scientific (Madrid, Spain). *p*-Coumaric acid, L-phenylalanine and sodium malonate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), L-tyrosine from Acros Organics (Thermo Fisher, Madrid, Spain), and cerulenin from Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA).

Construction of plasmid pSEVAUO-M21703-NarBGC

Recombinant DNA techniques were performed following standard protocols [33]. Plasmid pSEVAUO-M21703-NarBGC was assembled by a Golden Standard reaction using plasmids [9] and protocols [34]. For this, the Level 2 Golden Standard plasmid pSEVAUO-M21703 was used as receptor plasmid and mixed with Level 1 donor plasmids pSEVAUO-M21102-TAL, pSEVAUO-M21202-4CL, pSEVAUO-M21302-CHS and pSEVAUO-M21402-CHI in a Golden Standard reaction using *Bbs*I as restriction enzyme. Colonies harboring assembled constructs were selected by blue-white screening adding X-Gal to a medium containing ampicillin.

Right assembly of the construct was first checked by restriction-digest and then confirmed by sequencing.

Generation of the *S. albidoflavus* WT-NARNAR and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR strains

The φ-BT1 integrative plasmid pSEVAUO-M21703-NarBGC was introduced into *S. albidoflavus* WT-NAR and UO-FLAV-002-NAR chromosomes by protoplasts transformation, following the corresponding protocol [31], giving rise to strains *S. albidoflavus* WT-NARNAR and UO-FLAV-002-NARNAR, respectively. Positive colonies were selected on the basis of their resistance to thiostrepton and checked by PCR.

Naringenin and *p*-Coumaric acid extraction, HPLC-DAD analysis and quantification

1 mL culture samples from the different clones (cultivated in 25 mL culture medium in 250 mL Erlenmeyer flasks) were extracted with acetone (for the cellular pellet) and ethyl acetate (for the culture supernatant), as previously described [9].

The analysis of present flavonoids was performed using HPLC-DAD. Separation was conducted in a 1260 Infinity (Agilent Technologies, Madrid, Spain) HPLC system, equipped with an analytical column Pursuit XRs C18 (50×4.0 mm, 5 µm, Agilent Technologies, Madrid, Spain) with the column temperature operated at 30 °C. Mobile phases consisting of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (A) and acetonitrile (B), were employed at a flow rate of 1 mL/min. Mobile phases were eluted using the following linear gradient elution program: 10–40% B at 0–10 min, 40–50% B at 10–30 min, 50–100% B at 30–40 min, and 100%–10% B at 40–50 min. Detection and spectral characterization of peaks were carried out with a photodiode array detector and the analysis

performed with the Data Analysis 4.3 software (Bruker). All chromatograms were extracted at 280 nm.

Naringenin and *p*-CA were quantified by comparing the peak area with that of a known amount of an authentic compound, using a calibration curve. The production titers are given in mg/L and the mean value was calculated from three biological replicates in each case.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02172-5>.

Additional file 1. Figure S1: Maximum naringenin production achieved in the different assayed conditions. Every sample was taken 48 h after inoculation unless stated otherwise. The folds of the increase in naringenin production are depicted.

Additional file 2. Strategies carried out in order to enhance naringenin production titers in *S. albidoflavus* J1074, including feeding with different precursors.

Acknowledgements

Authors thank Explora Biotech Srl (Venice, Italy) for providing the synthetic genes, and Extrasynthese (Guenay, France) for providing flavonoid pure standards. Authors thank *Servicios Científico-Técnicos* at the University of Oviedo (HPLC-HRESIMS Unit) for exact mass analyses.

Author contributions

SY and PMC equally contributed to this work. Funding acquisition (F.L.), Investigation (S.Y., P.M.C., A.P.V.); Supervision (C.V., F.L.); Writing – original draft (S.Y.); Writing – review & editing (P.M.C., C.V., F.L.).

Funding

This research was funded by Principado de Asturias (Spain) through the program “Ayudas a organismos públicos para apoyar las actividades de I + D + I de sus grupos de investigación” (grant AYUD/2021/51347), as well as by “Programa Severo Ochoa de Ayudas Predoctorales para la investigación y docencia” from Principado de Asturias (grant PA-20-PF-BP19-058 to PMC and grant PA-21-PF-BP20-150 to APV), the research project PID2021-127812OB-I00 from MICINN (Spanish Ministry of Science and Innovation), and the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Program under Grant Agreement no. 814650 for the project SynBio4Flav.

Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

All authors read and approved the final manuscript and potential publication.

Received: 19 June 2023 / Accepted: 8 August 2023

Published online: 29 August 2023

References

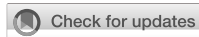
- Motallebi M, Bhia M, Rajani HF, Bhia I, Tabarraei H, Mohammadkhani N et al. Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sci* [Internet]. 2022 Sep 15 [cited 2023 Apr 18];305. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35779626/>.
- Nouri Z, Fakhri S, El-Senduny FF, Sanadgol N, Abd-Elghani GE, Farzaei MH et al. On the Neuroprotective Effects of Naringenin: Pharmacological Targets, Signaling Pathways, Molecular Mechanisms, and Clinical Perspective. *Biomolecules* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2023 Apr 18];9(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31684142/>.
- Hartogh DJD, Tsiani E. Antidiabetic Properties of Naringenin: A Citrus Fruit Polyphenol. *Biomolecules* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Apr 18];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30871083/>.
- Lu R, Yu RJ, Yang C, Wang Q, Xuan Y, Wang Z et al. Evaluation of the hepatoprotective effect of naringenin loaded nanoparticles against acetaminophen overdose toxicity. *Drug Deliv* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 18];29(1):3256–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36321805/>.
- Liu Z, Niu X, Wang J. Naringenin as a natural immunomodulator against T cell-mediated autoimmune diseases: literature review and network-based pharmacology study. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 18]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35776085/>.
- Slika H, Mansour H, Wehbe N, Nasser SA, Itratni R, Nasrallah G et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr 18];146. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35062053/>.
- Sun J, Sun W, Zhang G, Lv B, Li C. High efficient production of plant flavonoids by microbial cell factories: Challenges and opportunities. *Metab Eng* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Apr 18];70:143–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35091067/>.
- Van Bremp M, Peeters AI, Duché D, De Wannemaeker L, Maertens J, De Paepe B et al. Biosensor-driven, model-based optimization of the orthogonally expressed naringenin biosynthesis pathway. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Apr 18];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35346204/>.
- Magadán-Corpas P, Ye S, Pérez-Valero Á, McAlpine PL, Valdés-Chiara P, Torres-Bacete J, et al. Optimized De Novo Eriodictyol Biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* using an expansion of the Golden Standard Toolkit for its use in Actinomycetes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):8879.
- Shah FLA, Ramzi AB, Baharum SN, Noor NM, Goh HH, Leow TC et al. Recent advancement of engineering microbial hosts for the biotechnological production of flavonoids. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Apr 18];46(6):6647–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31535322/>.
- Liu R, Deng Z, Liu T. *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Apr 18];50:74–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852270/>.
- Zhang W, Liu H, Li X, Liu D, Dong XT, Li FF, et al. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Eng Life Sci*. 2017;1(9):1021–9.
- Álvarez-Álvarez R, Botas A, Albillós SM, Rumbero A, Martín JF, Liras P. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2015 Nov 9 [cited 2023 Apr 18];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26553209/>.
- Rateb ME, Yu Z, Yan Y, Yang D, Huang T, Vodanovic-Jankovic S et al. Medium optimization of *Streptomyces* sp. 17944 for tirandamycin B production and isolation and structural elucidation of tirandamycins H, I and J. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2014 Jan [cited 2023 Apr 18];67(1):127–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23715040/>.
- Price AC, Rock CO, White SW. The 1.3-Ångstrom-Resolution Crystal structure of β -Ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2003;185(14):4136–43.
- Wang H, Cronan JE. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34489–95.
- Santos CNS, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab Eng* [Internet]. 2011 Jul [cited 2023 Apr 18];13(4):392–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21320631/>.
- Leonard E, Yan Y, Fowler ZL, Li Z, Lim CG, Lim KH et al. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Mol*

- Pharm [Internet]. 2008 Mar [cited 2023 Apr 18];5(2):257–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18333619/>.
19. Xu P, Ranganathan S, Fowler ZL, Maranas CD, Koffas MAG. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab Eng* [Internet]. 2011 Sep [cited 2023 Apr 18];13(5):578–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21763447/>.
 20. Li H, Gao S, Zhang S, Zeng W, Zhou J. Effects of metabolic pathway gene copy numbers on the biosynthesis of (2S)-naringenin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* [Internet]. 2021 Jan 10 [cited 2023 Apr 18];325:119–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33186660/>.
 21. Marín L, Gutiérrez-del-Río I, Villar CJ, Lombó F. De novo biosynthesis of garbanzol and fustin in *Streptomyces albus* based on a potential flavanone 3-hydroxylase with 2-hydroxylase side activity. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 Apr 18];14(5):2009–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34216097/>.
 22. Marín L, Gutiérrez-del-Río I, Yagüe P, Manteca Á, Villar CJ, Lombó F. De Novo Biosynthesis of Apigenin, Luteolin, and Eriodictyol in the Actinomycete *Streptomyces albus* and Production Improvement by Feeding and Spore Conditioning. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 May 30 [cited 2023 Apr 18];8(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28611737/>.
 23. Marín L, Gutiérrez-del-Río I, Entrialgo-Cadierno R, Claudio, Villar J, Lombó F. De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Apr 18];13(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30440014/>.
 24. Myronovskyi M, Tokovenko B, Brötz E, Rückert C, Kalinowski J, Luzhetskyy A. Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2023 Apr 18];98(2):795–806. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24337397/>.
 25. Lombo F, Pfeifer B, Leaf T, Ou S, Kim YS, Cane DE, et al. Enhancing the Atom Economy of Polyketide Biosynthetic processes through Metabolic Engineering. *Biotechnol Prog*. 2001;17(4):612–7.
 26. Blázquez B, Torres-Bacete J, Leon DS, Kniewel R, Martinez I, Sordon S et al. Golden Standard: A complete standard, portable, and interoperative MoClo tool for model and non-model bacterial hosts. *bioRxiv* [Internet]. 2022 Sep 20 [cited 2023 Apr 18];2022.09.20.508659. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/https://doi.org/10.1101/2022.09.20.508659v1>.
 27. Vance D, Goldberg I, Mitsuhashi O, Bloch K, Ōmura S, Nomura S. Inhibition of fatty acid synthetases by the antibiotic cerulenin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;48(3):649–56.
 28. Speedie MK, Park MO. Regulation of tyrosine biosynthesis by phenylalanine in anthramycin-producing *Streptomyces refuineus*. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 1980 [cited 2023 Apr 18];33(6):579–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7419472/>.
 29. Lanz T, Tropf S, Marner FJ, Schroder J, Schroder G. The role of cysteines in polyketide synthases: site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J Biol Chem*. 1991;266(15):9971–6.
 30. Martin JF, McDaniel LE. Specific inhibition of candidicin biosynthesis by the lipogenic inhibitor cerulenin. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1975 Dec 5 [cited 2023 Apr 18];411(2):186–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/811262/>.
 31. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*, John Innes Foundation, Norwich [Internet]. 2000 [cited 2023 Apr 18]. Available from: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=578365](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=578365).
 32. Fernández E, Weißbach U, Reillo CS, Braña AF, Méndez C, Rohr J et al. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol* [Internet]. 1998 [cited 2023 Apr 18];180(18):4929–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9733697/>.
 33. Sambrook J, Russell DW, Molecular Cloning A. *Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. - References - Scientific Research Publishing [Internet]. 2001 [cited 2023 Apr 18]. Available from: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/References-Papers.aspx?ReferenceID=1765722](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/References-Papers.aspx?ReferenceID=1765722).
 34. Iverson SV, Haddock TL, Beal J, Densmore DM. CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New E. coli Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. *ACS Synth Biol* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2023 Apr 18];5(1):99–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26479688/>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RESULTADOS. Capítulo 3



OPEN ACCESS

EDITED BY

Félix López De Felipe,
Spanish National Research Council (CSIC),
Spain

REVIEWED BY

Eduardo Rodríguez,
CONICET Instituto de Biología Molecular y
Celular de Rosario (IBR), Argentina
María Carolina Rodríguez Daza,
Wageningen University and Research,
Netherlands

*CORRESPONDENCE

Suhui Ye

✉ yesuhui@uniovi.es

Felipe Lombó

✉ lombofelipe@uniovi.es

RECEIVED 30 January 2024

ACCEPTED 18 March 2024

PUBLISHED 28 March 2024

CITATION

Magadán-Corpas P, Ye S, Braune A,
Villar CJ and Lombó F (2024) Optimization of
flavanonols heterologous biosynthesis in
Streptomyces albidoflavus, and generation of
auronols.
Front. Microbiol. 15:1378235.
doi: 10.3389/fmicb.2024.1378235

COPYRIGHT

© 2024 Magadán-Corpas, Ye, Braune, Villar
and Lombó. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Optimization of flavanonols heterologous biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus*, and generation of auronols

Patricia Magadán-Corpas^{1,2,3}, Suhui Ye^{1,2,3*}, Annett Braune⁴,
Claudio J. Villar^{1,2,3} and Felipe Lombó^{1,2,3*}

¹Research Group BIONUC (Biotechnology of Nutraceuticals and Bioactive Compounds), Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain, ²IUOPA (Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias), Oviedo, Spain, ³ISPA (Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias), Oviedo, Spain, ⁴Research Group Intestinal Microbiology, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Nuthetal, Germany

Aromadendrin and taxifolin are two flavanonols (derived from the precursor naringenin) displaying diverse beneficial properties for humans. The carbon skeleton of these flavonoids may be transformed by the human gastrointestinal microbiota into other compounds, like auronols, which exert different and interesting biological activities. While research in flavonoids has become a certainly extensive field, studies about auronols are still scarce. In this work, different versions of the key plant enzyme for flavanonols biosynthesis, The flavanone 3-hydroxylase (F3H), has been screened for selecting the best one for the *de novo* production of these compounds in the bacterial factory *Streptomyces albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR, a naringenin overproducer strain. This screening has rendered 2.6 µg/L of aromadendrin and 2.1 mg/L of taxifolin final production titers. Finally, the expression of the chalcone isomerase (CHI) from the gut bacterium *Eubacterium ramulus* has rendered a direct conversion (after feeding experiments) of 38.1% of (+)-aromadendrin into maesopsin and 74.6% of (+)-taxifolin into alphitonin. Moreover, *de novo* heterologous biosynthesis of 1.9 mg/L of alphitonin was accomplished by means of a co-culture strategy of a taxifolin producer *S. albidoflavus* and a CHI-expressing *Escherichia coli*, after the observation of the high instability of alphitonin in the culture medium. This study addresses the significance of culture time optimization and selection of appropriate enzymes depending on the desired final product. To our knowledge, this is the first time that alphitonin *de novo* production has been accomplished.

KEYWORDS

aromadendrin, taxifolin, maesopsin, alphitonin, co-culture, flavanone 3-hydroxylase

1 Introduction

Flavonoids are a family of polyphenolic compounds derived from plants (Kumar and Pandey, 2013; Das et al., 2021). These secondary metabolites are essential for the morphology and physiology of plants, displaying a wide range of functions, like cell growth regulation, pollinator insect attraction or protection against both biotic and abiotic stresses (Dias et al., 2021). Humans can benefit from flavonoid intake as these compounds show diverse bioactive

properties, such as antioxidant (Chen et al., 2023; Liu et al., 2023), anti-inflammatory (Chen et al., 2023; Liu et al., 2023), antitumor (Redondo-Blanco et al., 2017) and cardioprotective (Espírito-Santo et al., 2023), among many others.

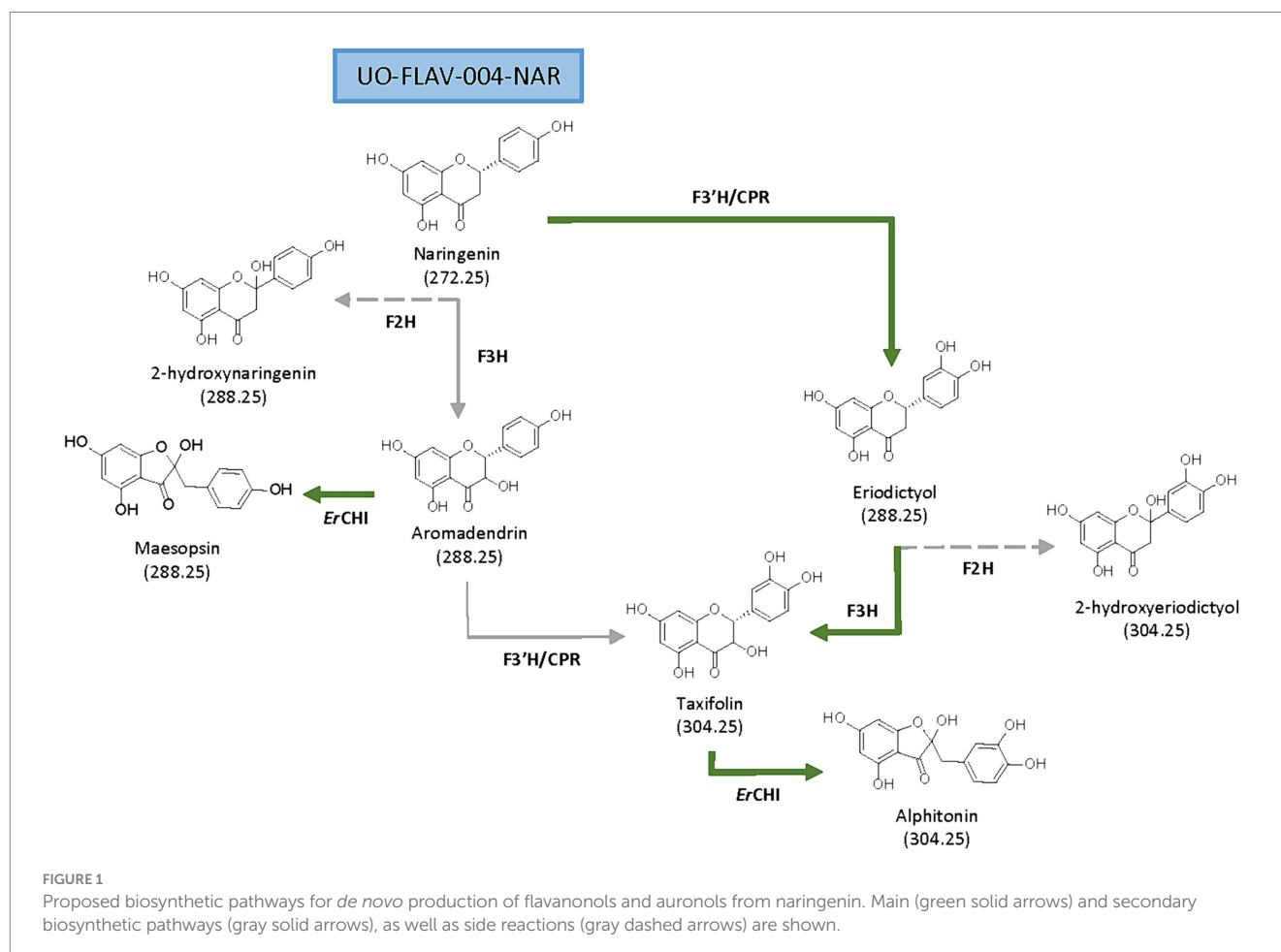
The chemical structure of flavonoids is composed of 15 carbon atoms (C6-C3-C6) forming two benzene rings (rings A and B) connected by a heterocyclic pyran ring (ring C) (Maleki et al., 2019; Marín et al., 2021). Flavonoids are grouped into different subclasses depending on the connection of rings B and C, the final conformation and oxidative status of ring C, and the total hydroxylation pattern. This structural variability of flavonoids is responsible for their diverse pharmacological and therapeutic potential (Maleki et al., 2019).

Flavonoids are present in small quantities in plants and accumulate only under certain environmental conditions. Consequently, their extraction constitutes a laborious and time-consuming process. On the other hand, their chemical synthesis is expensive and involves the use of toxic chemicals (Marín et al., 2021). For this reason, the heterologous production of flavonoids by microorganisms is becoming a valuable strategy as a fast and economic way of producing these compounds. In this context, the genus *Streptomyces* has been proven as a promising host for the enhanced production of flavonoids, given its ability to express multiple secondary metabolite biosynthetic gene clusters (Park et al., 2009, 2010, 2011; Marín et al., 2017, 2018, 2021; Hwang et al., 2021).

Aromadendrin (Figure 1), or dihydrokaempferol, is a flavanone that exerts anti-inflammatory, antioxidant, and anti-diabetic properties (Lee et al., 2013). It has been reported to attenuate, *in vivo*, induced hepatic injury and hepatic fibrosis (Huang et al., 2023), and it shows a protective effect against experimental cardiac hypertrophy (Cui et al., 2018).

Taxifolin (Figure 1), also known as dihydroquercetin, is a flavanone that, as aromadendrin, contains two stereocenters giving rise to four stereoisomers (Bernatova and Liskova, 2021; Das et al., 2021). Many pharmacological properties are attributed to taxifolin, such as anti-inflammatory, antioxidant (Liu et al., 2023), anti-Alzheimer, hepatoprotective, antiangiogenic, antimicrobial (Bernatova and Liskova, 2021; Das et al., 2021), and also cosmetic ones (Chen et al., 2023). Taxifolin has a higher antioxidant potential compared to other flavonoids, based on the disposition of its phenol groups and the elevated number of hydroxyl groups in its structure (Das et al., 2021).

Aurone derivatives, auronols (Figure 1), are very interesting compounds due to their remarkable therapeutic potential as antiviral, immunosuppressive and chemopreventive agents, and also as inhibitors of multidrug resistance mechanisms (Elsinghorst et al., 2011). These auronols are flavonoid derivatives originating from a carbon skeleton reorganization in ring C, where this moiety is converted to a 5-carbon heterocyclic ring (Figure 1). In particular, alphitonin revealed significant antidiabetic and antioxidant



properties (Kim et al., 2017), even more efficient than quercetin (Amić and Mastilák Cagardová, 2023); and a maepsin glycoside, maepsin 4-O- β -glucoside, exhibited antitumor activity, both *in vitro* and *in vivo*, by inhibiting the growth of cancer cells (Pozzesi et al., 2011; Thuy et al., 2016). However, although auronols constitute a very promising group of compounds, yet few studies have been carried out on their therapeutic potential and their heterologous production.

The flavanone naringenin constitutes a central metabolite in flavonoid biosynthesis, being the common precursor for the biosynthesis of all the abovementioned compounds. From naringenin, the additional required genes constitute the main rate-limiting steps for both aromadendrin and taxifolin heterologous production (Lv et al., 2019; Gao et al., 2020; Yu et al., 2022). A flavanone 3-hydroxylase (F3H) is needed to convert naringenin into aromadendrin. This F3H, belonging to the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase family, exerts a low catalytic efficiency (Gao et al., 2020) and shows a 2-hydroxylase side activity (Marín et al., 2021). Subsequent conversion of aromadendrin into taxifolin is catalyzed by a flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H). This is a membrane-bound cytochrome P₄₅₀ monooxygenase that requires a cytochrome P₄₅₀ reductase (CPR) for electron transfer (Leonard et al., 2006; Marín et al., 2017; Wu et al., 2022). In a previous work from our research group, the low activity of F3'H, due to its cytoplasmic insolubility and the need for reducing power, was addressed in *Streptomyces albidoflavus* J1074 by constructing a chimeric enzyme of F3'H and a reductase (Magadán-Corpas et al., 2023).

Flavonoids may be transformed by bacteria in the human gastrointestinal tract as part of the bacterial metabolism. In this way, aromadendrin and taxifolin are transformed into their respective auronol derivatives by the action of a chalcone isomerase from *Eubacterium ramulus* (ErCHI) (Braune et al., 2001, 2016). This reaction is a coenzyme-independent isomerization taking place in the presence or absence of oxygen (Braune et al., 2001). The ErCHI has been proven as enantioselective toward (+)-aromadendrin and (+)-taxifolin, catalyzing its C-ring contraction to maepsin or alphonin, respectively, by a ring opening-recyclation mechanism, with the corresponding chalcone and its di-keto tautomer as reaction intermediates (Elsinghorst et al., 2011; Braune et al., 2016).

Regarding this, it has been described that the presence of the biosynthetic precursor eriodictyol reduces the ErCHI-catalyzed isomerization of (+)-taxifolin into alphonin to 51%, due to a competition for binding to the ErCHI active site. Also, the (+)-aromadendrin conversion into maepsin is reduced to 84% in the presence of naringenin. This inhibition is reported to occur through a blockage of the ErCHI active site, with no further transformation of neither naringenin nor eriodictyol (Braune et al., 2016).

In this study, the biosynthesis of aromadendrin, taxifolin, maepsin and alphonin has been addressed in a naringenin overproducer *S. albidoflavus* J1074 strain. In this context, the auronols instability in the culture conditions has been identified as a major drawback for their heterologous production in *S. albidoflavus* and has been overcome by means of feeding with precursors for both maepsin and alphonin, and the co-culture of a taxifolin-producer *S. albidoflavus* strain with a CHI-expressing *E. coli* strain, after optimal F3H selection, for *de novo* alphonin production.

2 Materials and methods

2.1 Genes, enzymes, antibiotics, and primers

Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Thermo Fisher Scientific. Herculase II Fusion DNA polymerase was purchased from Agilent Technologies. NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix for Gibson assembly was purchased from Thermo Fisher Scientific. The antibiotics used were ampicillin (100 μ g/mL) (Sigma Aldrich; Madrid, Spain); apramycin (50 μ g/mL for *S. albidoflavus* or 100 μ g/mL for *E. coli*) (Thermo Fisher Scientific; MA, United States); nalidixic acid (50 μ g/mL) (Acros Organics; Belgium) and thiostrepton (50 μ g/mL) (Cayman Chemical; MI, United States).

Primers were synthesized by IDT Technologies (Leuven, Belgium). Sequences of primers used in this work are listed in [Supplementary Table S1](#).

This work is based on the F3H from *Petroselinum crispum* (Genbank accession no. AY230248, and OR820614 for the optimized gene), the F3H from *Malus domestica* (Genbank accession no. AAX89397, and OR820613 for the optimized gene), the F3H from *Camellia sinensis* (Genbank accession no. AY641730, and OR820612 for the optimized gene), and the CHI from *Eubacterium ramulus* (GenBank accession no. AIS36173, and OR820615 for the optimized gene). The encoding gene sequences were synthesized by Explora Biotech (Venice, Italy) after codon optimization for *Streptomyces* codon usage and removal of unique restriction sites for SEVA platform and Golden Standard cloning, as Golden Standard level 0 plasmids.

2.2 Plasmid construction

All the plasmids developed in this study have been constructed based in the plasmid library for *Streptomyces* developed in our group (Magadán-Corpas et al., 2023), following the Golden Standard Assembly (Blázquez et al., 2023) and listed in [Supplementary Table S2](#). The details on the construction of each plasmid in this work are included in the [Supplementary data file \(Plasmid Construction section, page 4\)](#). All plasmids described were verified by restriction enzyme digestions and sequencing.

2.3 Strain generation

Exogenous DNA was introduced into *S. albidoflavus* by either protoplast transformation or intergeneric conjugation (Kieser et al., 2000). Strains containing integrative plasmids were selected based on their resistance to the corresponding antibiotics and/or by PCR.

The strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR carries the naringenin biosynthetic gene cluster (BGC) integrated into its Φ C31 chromosomal site (Pérez-Valero et al., 2023). Plasmids pSEVAUO-M22106-PcF3H, pSEVAUO-M22106-MdF3H and pSEVAUO-M22106-CsF3H, pSEVAUO-M21503-PcF3H-F3'H/CPR, pSEVAUO-M21503-CsF3H-F3'H/CPR and pSEVAUO-M21603-PcF3H-F3'H/CPR-ErCHI [[Supplementary data file \(Plasmid Construction section, page 4\)](#)] were

independently integrated into the Φ BT1 integration site of the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR strain, yielding *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-MdARO, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsARO, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX and *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH strains, respectively.

Plasmid pSEVAUO-M21302-ErCHI [Supplementary data file (Plasmid Construction section, page 4)] was integrated into the Φ BT1 integration site of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004 strain, the same improved strain used in previous experiments, but lacking naringenin BGC (Pérez-Valero et al., 2023), yielding the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI.

2.4 Bacterial strains and culture conditions

All strains used in this study are listed in Supplementary Table S2. *E. coli* strains were grown as previously specified (Magadán-Corpas et al., 2023). *S. albidoflavus* was grown at 30°C in yeast extract-malt extract (YEME) supplemented with 17% (w/v) sucrose for the preparation of protoplasts, and MA medium was used for conjugation (Fernández et al., 1998). *S. albidoflavus* was sporulated in Bennett medium (Kieser et al., 2000) supplemented with the corresponding antibiotics when necessary.

For flavonoid production, *S. albidoflavus* spores were quantified, and 10^7 spores/ml were inoculated in shake flasks with 25 mL of NL333 pH 7.2 medium (Myronovskiy et al., 2014) and incubated at 30°C and 250 revolutions per minute (rpm) for 5 days, unless otherwise specified. Feedings with precursors were performed after 24 h of culture at a final concentration of 100 μ M, and samples were collected after 5 days of total culture time (unless otherwise specified). Cultures were performed in triplicate.

Regarding the co-cultures of *S. albidoflavus* and *E. coli*, 10^7 spores/ml of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX strain were cultivated in NL333 pH 7.2 medium for 48 h at 30°C and 250 rpm. An inoculum of 350 μ L from an *E. coli* JM109 pTI2 overnight culture was added to 35 mL of TSB with ampicillin and cultivated at 37°C and 250 rpm until OD reached 0.6. Then, IPTG 1 mM was added, and the culture was grown for another 4 h at 37°C and 250 rpm. Following this, 10 mL of the *E. coli* culture were centrifuged, the cell pellet resuspended in 1 mL of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX culture aliquot and added to the *S. albidoflavus* flask. Samples were taken from the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX culture immediately before adding *E. coli* as a control, and immediately after placing the co-culture. This process was carried out in triplicate.

2.5 Reagents and biochemicals

All solvents used for solid-phase extraction, High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) and High Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (HPLC-HRESIMS) analysis were LC-MS grade from either Sigma-Aldrich or VWR Chemicals. Authentic standard compounds for identification and quantification by HPLC-HRESIMS and HPLC-DAD analyses were provided by Extrasynthese (Genay, France).

2.6 Flavonoid extraction

Spores from the different *S. albidoflavus* strains were incubated as previously described. Samples of 1 mL were taken from flasks. Flavonoids were recovered by an organic extraction with acetone (cellular pellet) and ethyl acetate (culture supernatant) as previously described (Magadán-Corpas et al., 2023). The final dry extract was reconstituted in 100 μ L DMSO/MeOH (1:1, v/v), and the samples were centrifuged prior to HPLC injection.

For alphitinin and maesopsin experiments, sample extraction was performed immediately after their collection, with fresh solutions of organic solvents (acetone and ethyl acetate) acidified (Braune et al., 2016) with 0.1% formic acid.

2.7 HPLC analysis

Flavonoid identification was performed using either HPLC-DAD or HPLC-HRESIMS. The HPLC-DAD separation was conducted in a 1,260 Infinity (Agilent Technologies) HPLC system equipped with an analytical Pursuit XRs C18 column (50 \times 4.0 mm, 5 μ m, Agilent Technologies). Samples were run by an isocratic elution of 90% de-ionized water and 10% MeCN, both acidified with 0.1% formic acid, during 5.44 min, followed by a linear gradient from 10 to 35% of MeCN until min. 21.77, then maintained until min. 27.21. Next, a linear gradient from 35 to 100% MeCN was performed up to min. 43.54, followed by an isocratic elution until min. 55. Afterwards, a linear gradient from 100 to 10% MeCN was applied up to min. 56, and prolonged until the end of the program (min. 61).

The identification and quantification of the compounds by HPLC-HRESIMS and tandem mass spectrometry (MS/MS) was performed in an Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) system (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, Madrid, Spain) equipped with an analytical RP-18 HPLC column (50 \times 2.1 mm, Zorbax® Eclipse Plus, 1.8 μ m, Agilent Technologies, Madrid, Spain) as previously described (Marín et al., 2021). The obtained base peak chromatograms (BPCs) were extracted for the deprotonated ions of a set of flavonoids (271.0611 [M-H]⁻ (calculated for C₁₅H₁₂O₅) corresponding to naringenin; 287.0561 [M-H]⁻ (calculated for C₁₅H₁₂O₆) for eriodictyol, aromadendrin, 2-hydroxynaringenin and maesopsin; 303.0510 [M-H]⁻ (calculated for C₁₅H₁₂O₇), corresponding to taxifolin and alphitinin) with a mass error range of 0.005 milli mass units (mmu) and the obtained extracted ion chromatograms (EICs) were compared with authentic commercial standards.

Compounds were quantified by comparing the peak area with that of a known amount of an authentic compound through a calibration curve. The production titers are given in μ g/L or mg/L, and the mean value was calculated from three biological replicates.

2.8 Flavonoids stability tests

For alphitinin, 10 mL NL333 pH 7.2 in a 100 mL flask was spiked with 50 μ M of commercial alphitinin, and 1 mL samples were taken immediately after the feeding, 4 h and 24 h post-feeding. The samples were immediately extracted with 800 μ L of ethyl acetate freshly acidified with 0.1% formic acid, and this extraction was repeated. The

collected organic phases were dried in a vacuum centrifuge. The dry extract obtained was reconstituted in 100 μ L DMSO/MeOH 1:1 (v/v), and the samples were centrifuged prior to HPLC-DAD injection.

For taxifolin stability tests with cells, 25 mL NL333 pH 7.2 in a 250 mL flask were inoculated with 107 UFC/mL of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004 strain, incubated for 48 h at 250 rpm and 30°C, and then fed with 10 μ M of commercial taxifolin. Samples of 1 mL were taken after the feeding every 24 h for 5 days and extracted afterwards. The dry extract obtained was reconstituted in 100 μ L DMSO/MeOH 1:1 (v/v), and 5 μ L were used for HPLC-HRESIMS analysis. For taxifolin stability tests without cells, identical culture conditions were used, but samples were taken every 24 h for 4 days and extracted afterwards.

2.9 Accession numbers

Sequence data have been deposited to the GenBank databases under accession numbers OR820614 for *Petroselinum crispum* F3H, OR820613 for *Malus domestica* F3H, OR820612 for *Camellia sinensis* F3H, OR820615 for *Eubacterium ramulus* CHI and OR820616 for the Golden Standard level 1 receptor plasmid pSEVAUO-M22106, assembled for this study as part of the Golden Standard library developed for its use in actinomycetes (Magadán-Corpas et al., 2023).

2.10 Statistical analysis

A two-way ANOVA was used to compare cultivation data between different strains. A Sidak correction was used. The alpha threshold (and confidence level) selected for the data were 0.05 (95% confidence level). The data were expressed as the mean value \pm standard error of mean (S.E.M.). The graphic representation of all cultivation data was carried out using GRAPHPAD PRISM software (version 9, GraphPad Software, San Diego, CA, United States).

3 Results

3.1 Heterologous biosynthesis and optimization of aromadendrin

Aromadendrin is produced directly from naringenin by a F3H-catalyzed hydroxylation at the position 3 of ring C (Figure 1). In a preceding work from our research group, the *Petroselinum crispum* F3H enzyme (*PcF3H*), previously named as N3DOX, was used in *S. albidoflavus* J1074 for the biosynthesis of kaempferol, myricetin and quercetin (Marín et al., 2018), sharing all of them aromadendrin as a pathway precursor. For this study, the same *PcF3H* enzyme was used, however, the assembly strategy was approached differently, having each gene its own promoter, RBS and terminator [Supplementary data file (Plasmid Construction section)]. The strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR, a genetic engineered *S. albidoflavus* J1074 strain improved for naringenin production and able to reach 3.4 mg/L of this compound (Pérez-Valero et al., 2023), was used for further modifications.

The resulting aromadendrin producer strain, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO [see Material and Methods;

Supplementary data file (Plasmid Construction section)], was cultivated, and its extracts were analyzed by HPLC-HRESIMS. A strain carrying the empty vector pSEVAUO-M22106, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR-M22106, was used as negative control.

The obtained base peak chromatograms (BPCs) were extracted for the aromadendrin mass peak. A differential peak [retention time (rt): 5.5 min] for the proposed m/z, that perfectly coelutes with the pure commercial standard of aromadendrin, was detected in the samples from the producer strain (Figure 2A). The quantification of aromadendrin production titers in the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO strain was $0.2 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$. The BPCs were additionally extracted for the precursor naringenin mass peak (rt: 6.9 min). Albeit naringenin is partially transformed to aromadendrin, large quantities of naringenin remained in the extracts (Figure 2A), revealing the *PcF3H* activity as the main bottleneck for aromadendrin production. The presence of the derivative product 2-hydroxynaringenin, generated due to the 2-hydroxylase (F2H) side activity of the F3H enzyme over naringenin, can also be detected in the chromatogram (rt: 4.2 min) (Figure 2A).

Therefore, two other F3Hs were selected from different plant species, *Malus domestica* (*MdF3H*) and *Camellia sinensis* (*CsF3H*), and these were compared regarding their performance with *PcF3H*. These two new constructions were generated using the same promoter than the previous one, as a way to achieve the same transcription levels for the three genes. Strains *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-MdARO and *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsARO [see Material and Methods; Supplementary data file (Plasmid Construction section)] were cultivated, and the extracts were compared for aromadendrin production together with the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO strain.

The obtained BPCs were extracted for aromadendrin and naringenin mass peaks. The recombinant strain expressing *CsF3H* yielded $2.1 \pm 0.03 \mu\text{g/L}$ of aromadendrin, similar to the titers reached with the *MdF3H*-expressing strain of $2.6 \pm 0.65 \mu\text{g/L}$ (Figure 2B). This constitutes a remarkable 13-fold increase in aromadendrin production compared to the *PcF3H*-containing strain ($0.2 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$) (Figure 2B). However, the precursor naringenin was still accumulated (Figure 2B) and the side product 2-hydroxynaringenin was detected (data not shown) in incubations with all strains, meaning that F3H remains as the main bottleneck for aromadendrin production.

3.2 Heterologous biosynthesis and optimization of taxifolin

Taxifolin can be obtained from aromadendrin through the action of the F3'H hydroxylase. This enzyme is responsible for the hydroxylation of aromadendrin B-ring at the 3' position (Figure 1). F3'H from *Arabidopsis thaliana* was successfully tested in our group fused to a reductase from the same plant as a chimera (F3'H/CPR) for the enhanced production of eriodictyol from naringenin (Magadán-Corpas et al., 2023).

In parallel to the aromadendrin producer strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO, the taxifolin producer strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX was also generated [see Material and Methods; Supplementary data file (Plasmid Construction section)]. To confirm the heterologous production of taxifolin, the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX was cultivated, and extracts were analyzed by

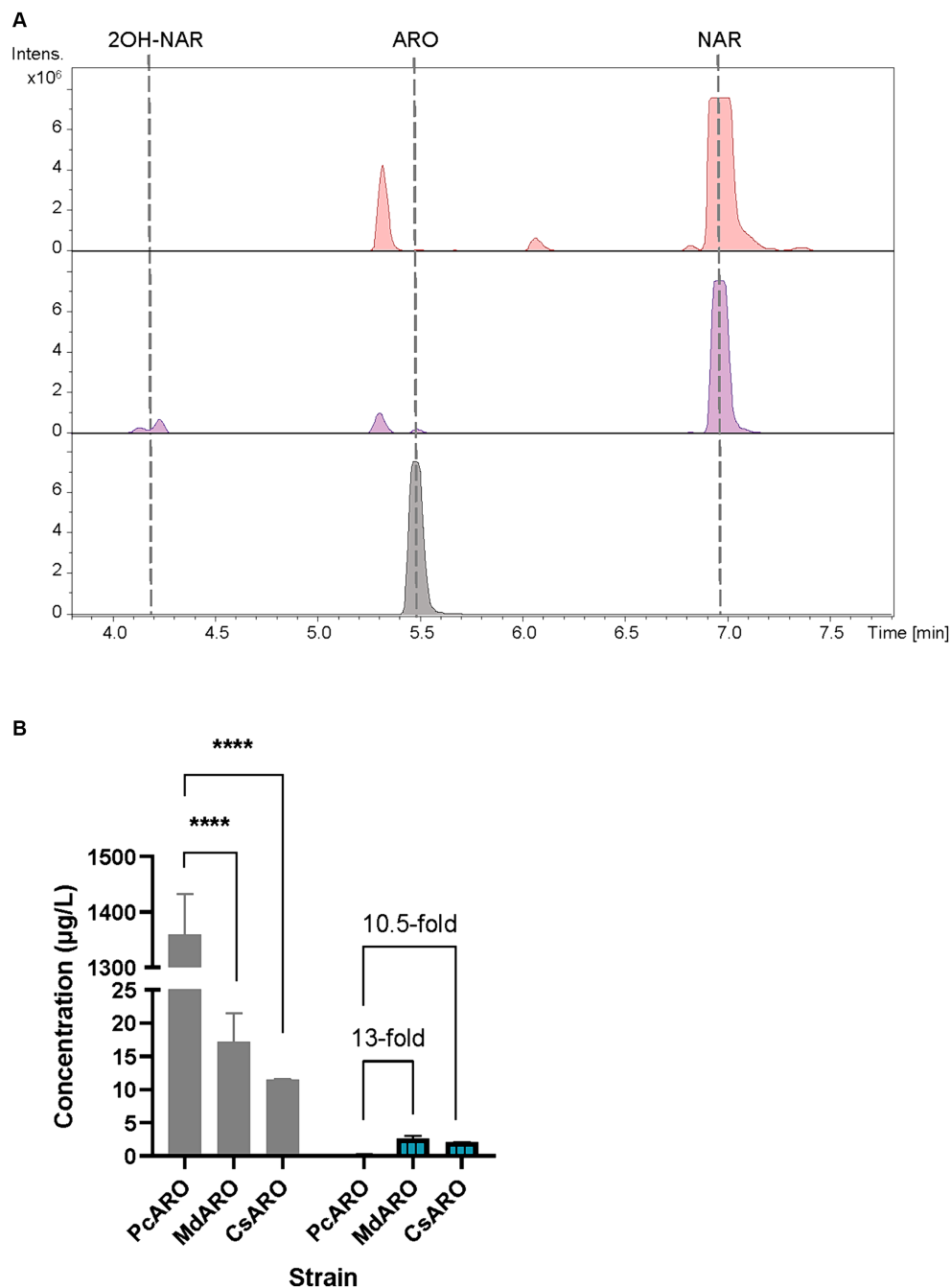


FIGURE 2
(A) HPLC-HRESIMS chromatograms of control strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR-M22106 (red) and the aromadendrin *de novo* producer strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO (purple). Extracted ion chromatograms for naringenin, 2-hydroxynaringenin and aromadendrin. Aromadendrin commercial standard (black). **(B)** Compared *de novo* aromadendrin biosynthesis (blue/lines) and precursor naringenin accumulation (gray) after F3H screening of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO, UO-FLAV-004-MdARO, and UO-FLAV-004-CsARO strains. NAR, naringenin; ARO, aromadendrin; 2OH-NAR, 2-hydroxynaringenin. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

HPLC-HRESIMS. The strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR-M21503, carrying the empty vector, was used as the negative control.

The obtained BPCs were extracted for the naringenin (rt: 6.9 min), eriodictyol (rt: 6.1 min), aromadendrin (rt: 5.5 min) and taxifolin mass peaks. The obtained extracted ion chromatograms (EICs) revealed the presence of a peak (rt: 4.9 min) for the proposed m/z that was absent in the negative control *S. albidoflavus*

UO-FLAV-004-NAR-M21503 strain, and that perfectly coeluted with the pure commercial standard of taxifolin (Figure 3A). Neither naringenin nor aromadendrin were detected in this strain. However, a peak corresponding to eriodictyol was detected resulting from the F3'H/CPR hydroxylation of naringenin (Figure 3A). The quantification of taxifolin production titers in the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX led to 2.1 ± 0.11 mg/L. Considering the aromadendrin production titers of this study

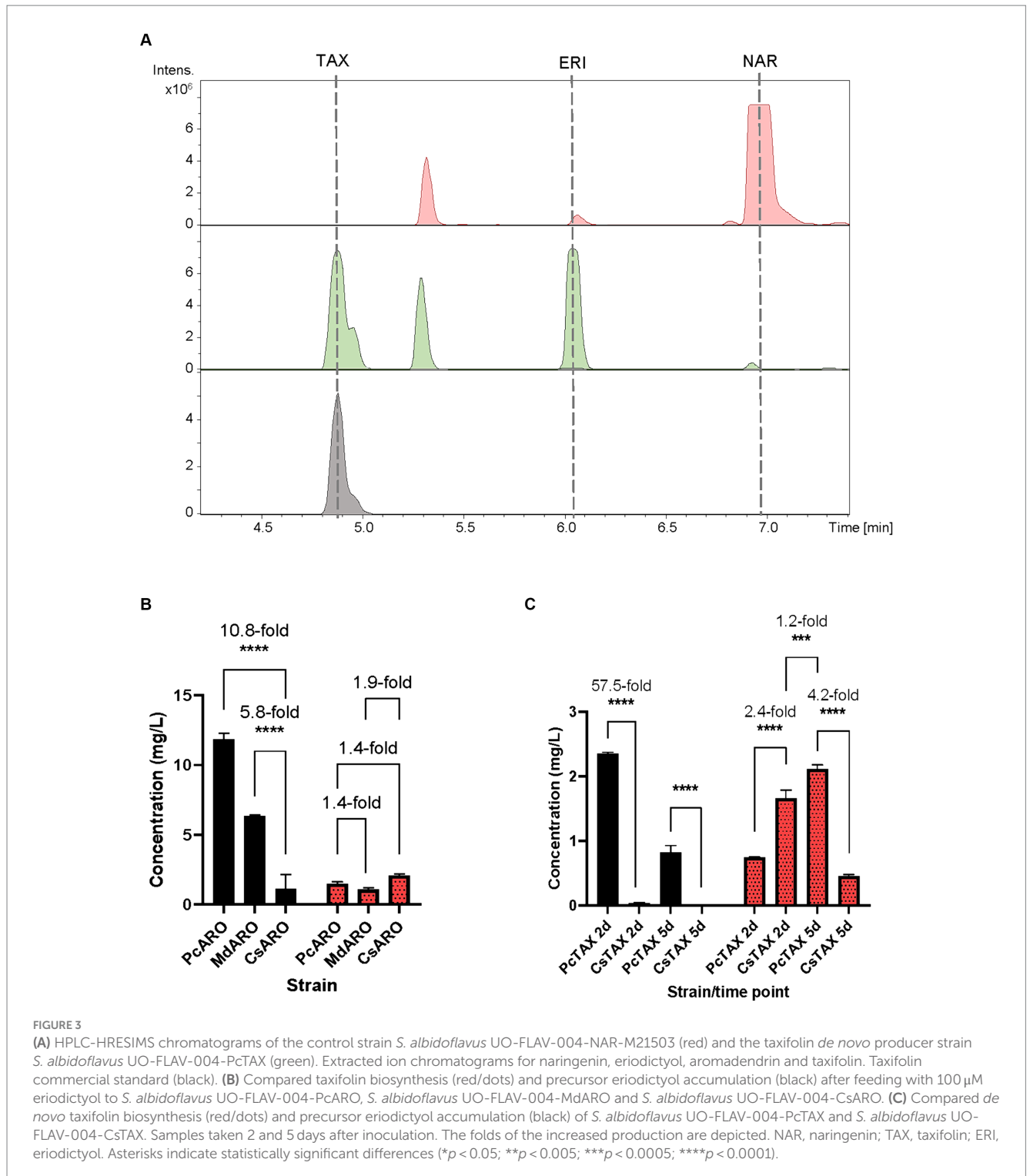


FIGURE 3

(A) HPLC-HRESIMS chromatograms of the control strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR-M21503 (red) and the taxifolin *de novo* producer strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX (green). Extracted ion chromatograms for naringenin, eriodictyol, aromadendrin and taxifolin. Taxifolin commercial standard (black). (B) Compared taxifolin biosynthesis (red/dots) and precursor eriodictyol accumulation (black) after feeding with 100 μ M eriodictyol to *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-MdARO and *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsARO. (C) Compared *de novo* taxifolin biosynthesis (red/dots) and precursor eriodictyol accumulation (black) of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX and *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX. Samples taken 2 and 5 days after inoculation. The folds of the increased production are depicted. NAR, naringenin; TAX, taxifolin; ERI, eriodictyol. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

($0.2 \pm 0.09 \mu\text{g/L} \approx 7 \times 10^{-4} \mu\text{M}$), the amount of taxifolin achieved ($2.1 \pm 0.11 \text{ mg/L} \approx 6.9 \mu\text{M}$) is much higher than the expected to be formed by direct conversion from aromadendrin. In addition to its established role in catalyzing the conversion of naringenin, F3H enzyme has been documented as capable of hydroxylating eriodictyol to produce the corresponding (2R/3R)-dihydroflavonol, taxifolin (Cheng et al., 2014). This finding, in conjunction with the prior observation of the substrate versatility of F3'H enzyme (converting

naringenin to eriodictyol or aromadendrin into taxifolin) (Magadán-Corpas et al., 2023), has prompted us to propose an alternative pathway for the production of taxifolin from eriodictyol (Figure 1). The accumulation of the precursor eriodictyol in *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX, suggests that analogous to the situation observed in aromadendrin production, the primary limiting factor for taxifolin production, is associated with the enzymatic activity of the PcF3H enzyme.

Henceforth, a feeding study involving the utilization of a 100 μ M concentration of eriodictyol was conducted on three distinct strains, namely, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-MdARO, *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsARO, and *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO. This investigation aimed to assess the comparative capabilities of the respective F3H enzymes in these strains with regard to the synthesis of taxifolin following eriodictyol supplementation. Samples were analyzed by HPLC-DAD. The highest taxifolin titer was 2.1 ± 0.1 mg/L, yielded by CsF3H, and constituting a 1.4-fold increased production compared to PcF3H (1.5 ± 0.2 mg/L) and a 1.9-fold compared to MdF3H (1.1 ± 0.2 mg/L) (Figure 3B). A remarkable 10.8-fold decrease in the amount of eriodictyol that remained to be converted could be observed when the CsF3H was compared with the PcF3H, while a 5.8-fold decrease in the remained eriodictyol was detected when the comparison was made with the MdF3H (Figure 3B).

Subsequent to these results, a taxifolin-producer strain of *S. albidoflavus* was engineered, designated as *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX, in which the CsF3H enzyme was integrated instead of the PcF3H enzyme. A comparative evaluation was conducted between this newly created strain and the previously assayed *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX strain to assess their respective abilities in achieving enhanced taxifolin production. Samples were taken after 2 and 5 days of cultivation. Taxifolin and eriodictyol levels were measured by HPLC-HRESIMS. Divergent outcomes were noted contingent on the duration of the cultivation period. Specifically, after a 2-day cultivation period, strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX exhibited a taxifolin production that was 2.4-fold greater than that of strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX (1.7 ± 0.2 mg/L vs. 0.7 ± 0.005 mg/L) (Figure 3C), aligning with the results from the feeding experiments. Conversely, after 5 days of cultivation, strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX yielded a taxifolin production 4.2-fold higher than that of strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX (2.1 ± 0.1 mg/L vs. 0.5 ± 0.04 mg/L) (Figure 3C). Notably, the highest levels of residual eriodictyol were detected in the presence of the PcF3H enzyme, amounting to 2.3 ± 0.04 mg/L and 0.8 ± 0.19 mg/L after 2 and 5 days of incubation, respectively. These levels displayed a decreasing trend over time, congruent with the observed trend of increasing taxifolin production. In contrast, minimal levels of eriodictyol were detected with the CsF3H enzyme, registering at 0.04 ± 0.01 mg/L after 2 days of incubation, this indicating a 57.5-fold lower concentration of unconsumed precursor compared to PcF3H. After 5 days, eriodictyol levels regarding the CsF3H enzyme were below the detection limit (Figure 3C). These observations in eriodictyol consumption correlated with the earliest attainment of maximum taxifolin yield achieved by the CsF3H enzyme. Following this rationale, it would be expected that taxifolin levels would remain relatively stable over time. However, a subsequent decrease in taxifolin levels was observed after 5 days of incubation in the case of the CsF3H enzyme, which may be attributed to potential taxifolin degradation within the culture.

To substantiate this hypothesis, additional experiments were conducted wherein a 10 μ M taxifolin supplement was added to the NL333 pH 7.2 culture medium, both in the presence and absence of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004 cells [the same improved strain used in previous experiments, but lacking naringenin BGC (Pérez-Valero et al., 2023)]. The outcomes of these experiments demonstrated that taxifolin was indeed undergoing degradation or conversion by *S. albidoflavus* UO-FLAV-004. This assertion is supported by the

conspicuous reduction in taxifolin levels, which was exclusively observed when the taxifolin supplementation occurred in the presence of the microbial cells (Supplementary Figure S1A), whereas taxifolin levels remained largely stable in the unseeded medium (Supplementary Figure S1B).

In summary, the optimal strategy for taxifolin production involved a 5-day incubation period of the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX strain. However, it is important to note that this approach yielded only a modest 1.2-fold enhancement in taxifolin production compared to the highest production level achieved with CsF3H enzyme, which occurred after a 2-day incubation period and exhibited substantially reduced precursor accumulation (Figure 3C).

3.3 Heterologous biosynthesis of alphonin

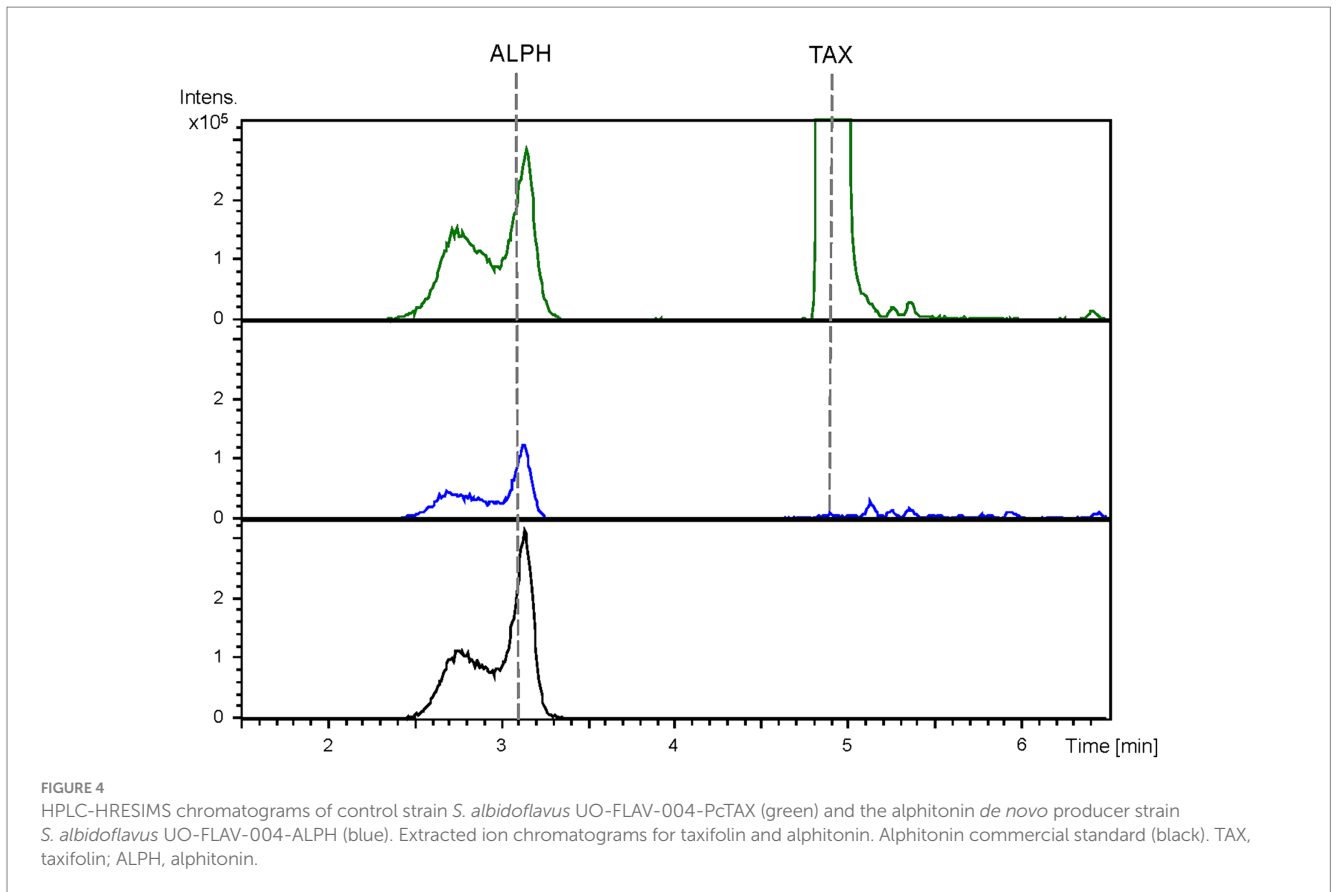
A chalcone isomerase (CHI) is needed to catalyze the C-ring contraction of (+)-aromadendrin and (+)-taxifolin to the aurones maepsin and alphonin, respectively (Figure 1). In this study, the CHI from *Eubacterium ramulus* (ErCHI) was selected to carry out this conversion (Braune et al., 2016).

Following the development of the previous strains, the alphonin producer *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH strain was generated [see Material and Methods; Supplementary data file (Plasmid Construction section)]. To confirm the heterologous production of alphonin, the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH was cultivated, its samples extracted with acidified organic solvents (see Materials and Methods) and analyzed by HPLC-HRESIMS. The strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX was used as the negative control.

The obtained BPCs were extracted for the mass peaks corresponding to taxifolin and alphonin. The obtained EICs unveiled the presence of a peak (rt: 3.1 min) corresponding to the proposed m/z value, which co-eluted with the pure commercial standard of alphonin. However, it is noteworthy that the same peak was also identified in the negative control, the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX strain (Figure 4). This observation suggests the absence of alphonin production. Conversely, the peak corresponding to the precursor taxifolin (rt: 4.9 min) was conspicuously absent in the extracts obtained from the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH (Figure 4). Moreover, no additional new peaks were detected, indicating the consumption of taxifolin as a consequence of ErCHI heterologous expression in this strain.

To investigate this matter, an initial examination of alphonin stability under our specified culture conditions was undertaken. In these experiments, fresh culture medium devoid of bacterial presence was supplemented with 50 μ M of commercial alphonin. Subsequently, it was subjected to incubation conditions identical to those employed in the production cultures, and the concentration of alphonin was monitored at time intervals of 0, 4, and 24 h. The outcomes of this investigation confirmed the spontaneous degradation of alphonin in culture medium, as evidenced by a progressive decline in alphonin concentrations over time, ultimately culminating in its complete disappearance after 24 h of incubation (Supplementary Figure S2).

Subsequent stability assays aimed to mitigate alphonin decomposition during culture were conducted. These efforts encompassed attempts to enhance alphonin stability by altering the



extraction conditions, specifically by employing higher concentrations of formic acid (0.1, 0.2, and 0.5%) in the organic solvents. Additionally, the supplementation of vitamin C (0.5 mM and 5 mM) was explored as a potential stabilizer in the NL333 medium (Zhang et al., 2022). Furthermore, investigations involved incubation of alphonin in different media (R5A, TSB, and LB) and modifying the pH of NL333 medium from 7.2 to 6.8 (Zhang et al., 2022). Regrettably, none of these strategies yielded improved recoveries of alphonin, as the results did not show any significant enhancement (data not shown).

3.4 Conversion of taxifolin and aromadendrin into alphonin and maesopsin, respectively, by an *ErCHI*-expressing *Streptomyces albidoflavus* strain

Given the established instability of alphonin under our culture conditions, an inquiry arose regarding whether the absence of discernible distinctions between the alphonin-producing strain and the control strain, in relation to the alphonin peak, could be attributed more to the alphonin decomposition rather than its non-conversion. In pursuit of clarifying this matter, an experimental approach was employed. Specifically, a strain of *S. albidoflavus* carrying only the *ErCHI* transcription unit, designated as strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-*ErCHI*, was utilized.

To elucidate the matter, strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-*ErCHI* was employed in feeding cultures with a 100 μ M concentration

of taxifolin. As negative controls, cultures of the same strain were performed without taxifolin supplementation, and the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004 was also cultured under both conditions. Samples were collected at designated time points of 0, 0.5, 1.5, 4, and 24 h post-feeding, promptly subjected to extraction, and subsequently analyzed using HPLC-DAD.

In the resulting UV chromatograms, a distinctive peak corresponding to alphonin (rt: 13.1 min) was consistently identified subsequent to taxifolin feeding in all samples derived from the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-*ErCHI* strain (Figure 5). This alphonin peak exhibited a maximal conversion rate of 74.6% from the total taxifolin provided at time 0 h, with declining concentrations at subsequent time points: 63.4, 59.5, 46.3, and 27% at 0.5, 1.5, 4, and 24 h, respectively. No remaining taxifolin was detected in any of the samples obtained from the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-*ErCHI* after the feeding. Conversely, in all samples overtime from the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004, taxifolin (rt: 19.6 min) was found to accumulate, with no alphonin production (Figure 5). These findings indicate the immediate conversion of taxifolin into alphonin catalyzed by *ErCHI*, followed by rapid degradation of alphonin within the culture.

Significantly, when samples from the control conditions were subjected to HPLC-HRESIMS analysis, the peak detected in the previous section of this study in both the control and the alphonin-producing strains, coeluting with alphonin standard, was conspicuously absent (Supplementary Figure S3). The potential identity of this peak will be discussed further in the subsequent sections.

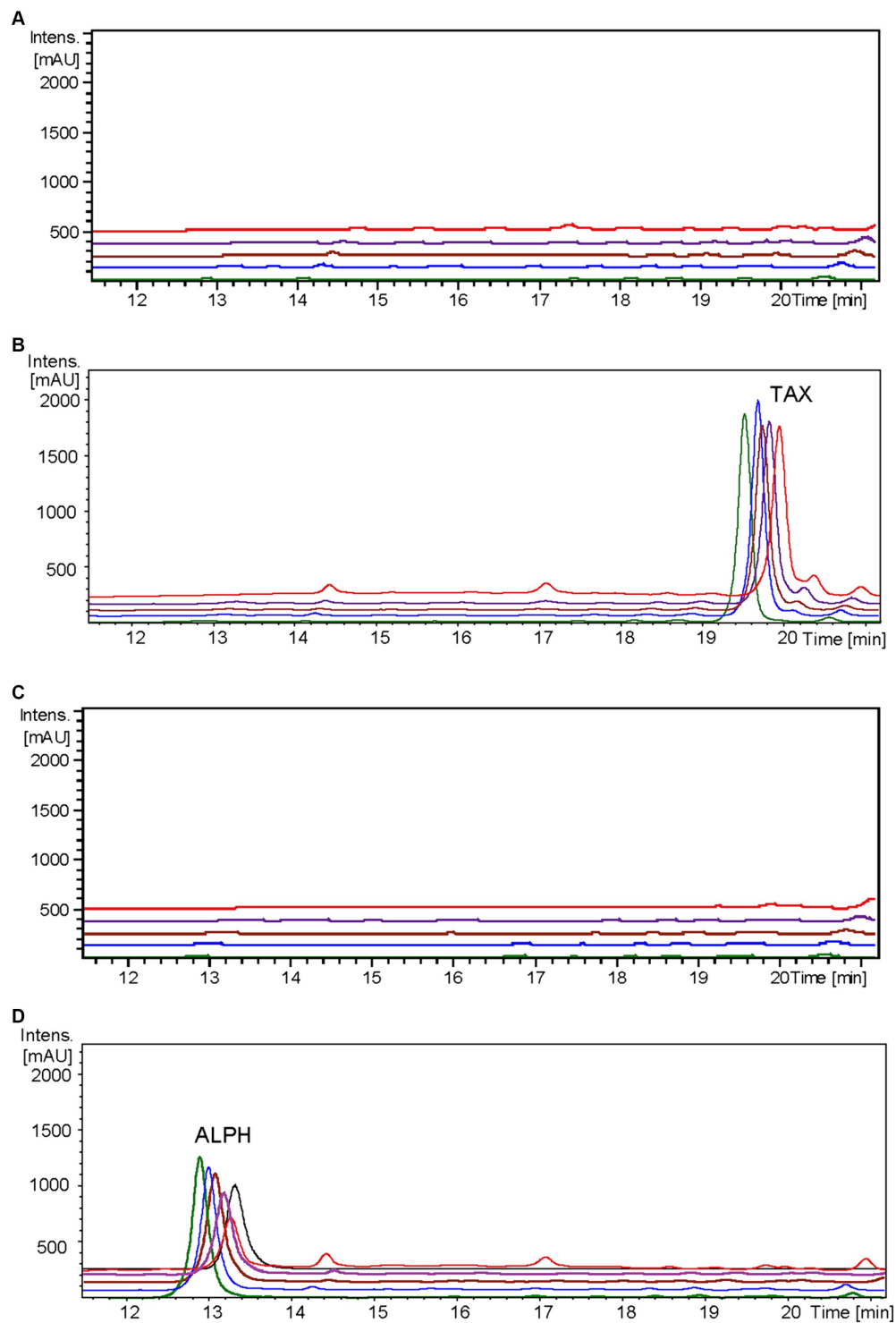


FIGURE 5
HPLC-DAD chromatograms at 279–281 nm of the time course for alphonitin biosynthesis after taxifolin feeding to *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI strain. **(A)** UO-FLAV-004 with DMSO. **(B)** UO-FLAV-004 with 100 μ M taxifolin feeding. **(C)** UO-FLAV-004-ErCHI strain with DMSO, and **(D)** UO-FLAV-004-ErCHI with 100 μ M taxifolin feeding. Samples are taken at 0 h (green), 0.5 h (blue), 1.5 h (brown), 4 h (purple), and 24 h (red) post-feeding. Alphonitin commercial standard (black). ALPH, alphonitin; TAX, taxifolin.

It has been previously documented that *Er*CHI has the capacity to catalyze reactions involving (+)-aromadendrin, yielding the auronol maesopsin (Braune et al., 2016). Consequently, an analogous experiment was conducted, but with the addition of 100 μ M of

aromadendrin to the cultures. In this investigation, a distinct peak corresponding to maesopsin (rt: 16.4 min) was consistently identified following aromadendrin supplementation in all samples derived from the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI strain (Figure 6). Maesopsin

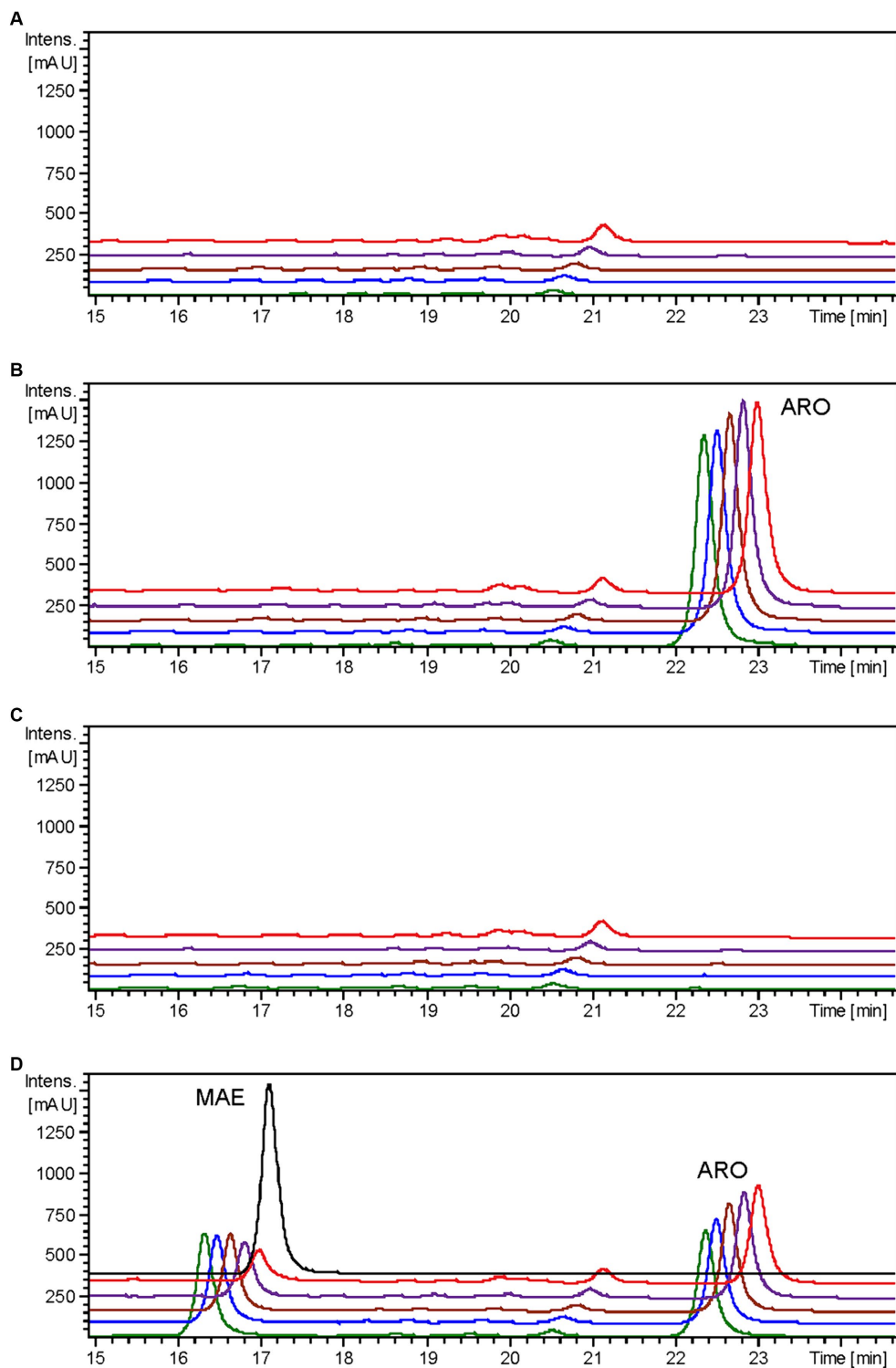


FIGURE 6

HPLC-DAD chromatograms at 279–281 nm of the time course for maesopsin biosynthesis after aromadendrin feeding to *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI strain. (A) UO-FLAV-004 with DMSO, (B) UO-FLAV-004 with 100 μ M aromadendrin feeding, (C) UO-FLAV-004-ErCHI strain with DMSO, and (D) UO-FLAV-004-ErCHI with 100 μ M aromadendrin feeding. Samples are taken at 0 h (green), 0.5 h (blue), 1.5 h (brown), 4 h (purple), and 24 h (red) post-feeding. Maesopsin commercial standard (black). MAE, maesopsin; ARO, aromadendrin.

production reached a maximum conversion rate of 38.1% at time 0h, with subsequent reductions in maesopsin concentrations observed over time: 32.2, 26.8, 19.3, and 11.7% at 0.5, 1.5, 4, and 24h, respectively. However, in this particular instance, aromadendrin (rt:

22.4min) was detected in all samples from the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI strain following the feeding experiment (Figure 6). This represented 44, 43.7, 43, 42.6, and 41% of the unutilized precursor. Consequently, ErCHI expressed in *S. albidoflavus*

demonstrated the capability to convert (+)-aromadendrin into maepsin, albeit with a lesser degree of efficiency compared to the conversion of taxifolin into alphonin.

3.5 *Streptomyces albidoflavus*/*Escherichia coli* co-cultures for heterologous *de novo* alphonin biosynthesis

In summary of the previous experiments conducted in this study, it was observed that the *de novo* alphonin generated by a single bacterial strain underwent degradation within the culture before becoming detectable. To overcome this issue, a single input of taxifolin is needed, as this taxifolin is promptly transformed into alphonin, only to be subsequently degraded at a rapid pace. Consequently, in order to facilitate *de novo* alphonin production, a co-culture system was established. This system involved a taxifolin-producing strain of *S. albidoflavus* in conjunction with *E. coli* JM109 pTI2 strain, the latter carrying the *ErCHI* gene (Braune et al., 2016).

The selection of the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX strain for the co-culture was based on its demonstrated proficiency as an early-stage taxifolin producer (within 2 days) with minimal accumulation of the precursor eriodictyol. This choice was made considering that eriodictyol competes with taxifolin for binding to the active site of *ErCHI* enzyme. Both the *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX strain and the *E. coli* JM109 pTI2 strain were cultured separately and subsequently combined in a single flask, as detailed in the Materials and Methods section. Samples for production analysis were obtained from individual cultures as controls and immediately following the establishment of the co-culture, as the available taxifolin was promptly converted into alphonin.

The extracted samples were subjected to analysis using HPLC-HRESIMS. BPCs were extracted for the mass peak corresponding to taxifolin and alphonin. In the case of the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX cultivated as a single culture, the taxifolin concentration reached 1.4 ± 0.3 mg/L, while alphonin production was not detected (Figure 7). However, upon the introduction of the *E. coli* strain into the culture and subsequent immediate sampling, taxifolin became undetectable, and alphonin was identified at a concentration of 1.9 ± 0.7 mg/L (Figure 7). This outcome unequivocally confirmed the conversion of taxifolin into alphonin.

4 Discussion

In previous investigations, the *de novo* biosynthesis of several flavonoids originating from naringenin in *S. albidoflavus* has been established (Marín et al., 2017, 2018, 2021; Pérez-Valero et al., 2023). In the present study, a genetically engineered *S. albidoflavus* J1074 strain, optimized for the production of 3.4 mg/L of naringenin (designated as *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR) (Pérez-Valero et al., 2023), was utilized, alongside a modular cloning platform. Consequently, this approach led to enhancements in the *de novo* synthesis of aromadendrin and taxifolin, as well as the production of two auronols, maepsin and alphonin, with the latter being produced *de novo* as well.

In this study, the reconstruction of the biosynthesis pathway for the flavanols aromadendrin and taxifolin was undertaken in

Streptomyces albidoflavus J1074 (Figure 1). During the course of this investigation, it was observed that both the enzymes, F3H and the chimeric enzyme F3'H/CPR, exhibited substrate flexibility. Consequently, it was demonstrated the capacity to produce taxifolin via two distinct enzymatic pathways, contingent upon the order of enzymatic reactions. In the primary pathway, the chimeric F3'H/CPR catalyzes the initial conversion of naringenin to eriodictyol, followed by the subsequent hydroxylation of eriodictyol by F3H to generate taxifolin. Conversely, in the secondary route, F3H catalyzes the initial conversion of naringenin to aromadendrin, which is then further converted into taxifolin by F3'H/CPR (Figure 1). This dual pathway arrangement allows for the maximization of taxifolin production.

The chimeric enzyme F3'H/CPR demonstrates high efficiency when acting upon both substrates, as evidenced by the absence of naringenin or aromadendrin accumulation in the cultures of the taxifolin-producing strain (Figure 3A). Nonetheless, our findings establish that the enzyme F3H serves as the primary limiting factor in the production of aromadendrin and taxifolin. This conclusion is affirmed by the substantial accumulation of precursor compounds, namely naringenin and eriodictyol, detected in the strains engineered for aromadendrin and taxifolin production, respectively (Figures 2A, 3A).

In an effort to enhance the production of aromadendrin and taxifolin, two additional F3Hs sourced from *Malus domestica* (*MdF3H*) and *Camellia sinensis* (*CsF3H*) were assessed for their potential to exhibit increased activity and reduced 2-hydroxylase side activity. In the context of aromadendrin production, both *CsF3H* and *MdF3H* demonstrated a similarly enhanced performance when acting upon naringenin, with *MdF3H* outperforming *PcF3H* by yielding a 13-fold greater quantity of aromadendrin (Figure 2B).

Notwithstanding the improvements achieved in aromadendrin production, F3H still emerged as the limiting factor, as evidenced by the accumulation of naringenin and 2-hydroxynaringenin. Therefore, further efforts would be needed to optimize F3H functionality. It has been previously documented in the literature that F3H activity has evolved from flavonol synthase (FLS) in plants, potentially through a transitional phase involving bifunctional FLS/F3H intermediate, concurrently with the existence of bifunctional FLS/F2H intermediate (Li et al., 2020). Studies have reported on site-directed mutagenesis efforts targeting key amino acids within canonical FLS, F3H, and bifunctional enzymes, leading to shifts from F3H activity to either F2H or FLS activities (Li et al., 2020; Fu et al., 2023). Numerous other approaches have been explored, involving site-directed mutagenesis that resulted in alterations in catalytic efficiency, substrate affinity, or regio/stereoselectivity (Choi et al., 2015; Zhou et al., 2022; Sui et al., 2023; Xu et al., 2023).

In this context, it is advisable to conduct structural studies at the protein level focusing on F3H, with the aim of identifying critical amino acid residues that can be modified to enhance F3H activity while concurrently diminishing its F2H side activity. Such modifications would hold promise for future applications in the biosynthesis of flavonoids.

In the context of taxifolin production, the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX, carrying the *CsF3H* enzyme, generated 1.7 ± 0.2 mg/L of taxifolin. This quantity represented a 2.4-fold increase in taxifolin production compared to its counterpart harboring the *PcF3H* enzyme, and this difference was observed after a cultivation period of 2 days (Figure 3C). Conversely, the strain *S. albidoflavus*

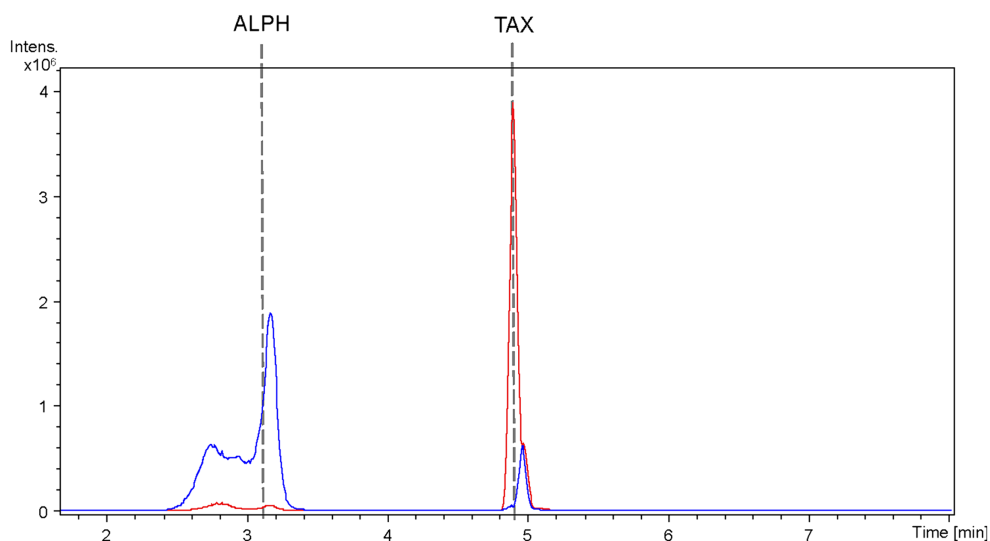


FIGURE 7
HPLC-HRESIMS extracted ion chromatograms of samples from the co-culture between the taxifolin producer strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsF3H and the *E. coli* ErCHI-expressing strain JM109 pTI2, for the *de novo* alphitonin biosynthesis. Samples were taken from the *S. albidoflavus* culture before establishing the co-culture (red) and immediately after (blue) and chromatograms extracted for taxifolin and alphitonin m/z. TAX, taxifolin; ALPH: alphitonin.

UO-FLAV-004-PcTAX yielded 2.1 ± 0.1 mg/L of taxifolin after an additional 3 days of cultivation, marking the highest recorded production of taxifolin *de novo* in the course of this study (Figure 3C). Therefore, while there was no enhancement in taxifolin production, the screening of F3H enzymes proved valuable in reducing the cultivation time and precursor accumulation, while maintaining comparable final levels of taxifolin production.

Given the observed trends of taxifolin degradation subsequent to the complete consumption of precursors, coupled with the achievement of maximum taxifolin yield in strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX (Figure 3C), and the challenges encountered in *de novo* alphitonin production using a single strain (Figure 4), an investigation into the stability of these target compounds within the culture environment was conducted. Experiments involving the addition of taxifolin to both seeded and unseeded cultures revealed that, unlike auronols, taxifolin exhibited stability under the culture conditions, however, it was susceptible to conversion or degradation by *S. albidoflavus* cells (Supplementary Figure S1). Nevertheless, this issue was successfully mitigated by optimizing the cultivation duration, which varied depending on the specific F3H variant employed (Figure 3C). In contrast, auronols exhibited pronounced instability within cell-free culture conditions (Supplementary Figure S2).

Confirmation of the conversion of aromadendrin into maesopsin and taxifolin into alphitonin by ErCHI was obtained through feeding experiments conducted on a strain of *S. albidoflavus* exclusively expressing the ErCHI enzyme. These experiments provided evidence of the immediate conversion of both precursor compounds into their respective auronols, subsequently followed by the rapid degradation of these auronols (Figures 5, 6). Furthermore, the results from these experiments indicated that a *S. albidoflavus* strain expressing ErCHI displayed greater efficiency in converting taxifolin into alphitonin compared to aromadendrin conversion into maesopsin. Specifically, when equal amounts (100 μ M) of the respective substrate were introduced into the culture, ErCHI achieved a 74.6% conversion of

taxifolin into alphitonin, whereas only 38.1% of aromadendrin was transformed into maesopsin. This finding aligns with earlier findings involving cell-free extracts of ErCHI expressed in *E. coli*, which demonstrated 60% activity with aromadendrin in comparison to taxifolin (Braune et al., 2016). ErCHI exhibited its highest activity within very short and early time frames, with maximum activity observed at the time of substrate feeding and no further activity subsequently recorded. This was evidenced by the complete conversion of taxifolin immediately after feeding (Figure 5) and the consistent presence of essentially the same quantity of unconverted aromadendrin throughout the corresponding experiment (Figure 6).

As all the attempts to stabilize alphitonin through modifications in culture and extraction conditions proved unsuccessful, a co-culture strategy was implemented between the strain *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX and an *E. coli* strain expressing the ErCHI (Braune et al., 2016). This approach ultimately yielded successful results, achieving *de novo* production of alphitonin at a concentration of 1.9 ± 0.7 mg/L, with no accumulation of its precursor, (+)-taxifolin (Figure 7). Optimization in the selection of the F3H enzyme and culture duration ensured a substantial taxifolin supply with negligible precursor accumulation (57.5-fold lower eriodictyol accumulation compared to its counterpart PcF3H) (Figure 3C). Consequently, the absence of the precursor prevented inhibition of ErCHI during the catalysis of taxifolin conversion into alphitonin.

For maesopsin, the limited titers of aromadendrin generated by the respective producer strains, coupled with precursor accumulation resulting from diminished F3H activity, will require further improvement at the enzyme level prior to embarking on the *de novo* production attempts.

Finally, it is pertinent to acknowledge and provide a plausible rationale for the conspicuous peak observed in Figure 4 and again in Figure 7, which co-elutes with alphitonin standard in the control taxifolin producer strain. Considering the previously reported F2H side activity of F3H (Marín et al., 2021), a product generated from naringenin associated with this activity was detected in the

aromadendrin producer strain, leading to the production of the derivative 2-hydroxynaringenin (Figures 1, 2A). Notably, the 2-hydroxynaringenin peak was absent in samples from the control *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR-M22106 strain (Figure 2A), which lacks F3H. Its identity was further confirmed through comparison with a pure commercial standard of 2-hydroxynaringenin. Intriguingly, both 2-hydroxynaringenin and maesopsin standards exhibited co-elution in both HPLC-HRESIMS and HPLC-DAD analyses, and they shared identical m/z, MS/MS, and UV/Vis spectra (Supplementary Figure S4).

In light of these findings, it is proposed that in the taxifolin producer strain, the F2H side activity associated with F3H may also act upon eriodictyol, leading to the formation of a corresponding 2-hydroxylated intermediate compound, 2-hydroxyeriodictyol (Figure 1). This side intermediate compound would co-elute with alphonin, mirroring the co-elution of 2-hydroxynaringenin with maesopsin. Unfortunately, a 2-hydroxyeriodictyol standard is not commercially available. However, the observation that these peaks, corresponding to 2-hydroxynaringenin and 2-hydroxyeriodictyol, exclusively appear in chromatograms when F3H and the corresponding precursor (naringenin and/or eriodictyol) are present strongly supports this hypothesis. Consequently, this unequivocally associates this activity with the F3H enzyme (Supplementary Figure S5).

In this study, we have comprehensively addressed the significance of culture time optimization and enzyme selection based on the desired final product. Effective optimization strategies were employed to achieve complete consumption of precursors during the production of taxifolin and alphonin. Nevertheless, additional optimization methodologies need to be explored to maximize the production of aromadendrin and maesopsin, particularly in light of the limited efficiency exhibited by F3H and *Er*CHI enzymes for their respective substrates. Moreover, this study represents the first report of *de novo* heterologous biosynthesis of alphonin accomplished through the judicious selection of optimal F3H enzyme and the establishment of a co-culture between *S. albidoflavus* J1074 and *E. coli*, owing to the observed high instability of this compound in cell-free culture.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary material.

Author contributions

PM-C: Investigation, Writing – original draft. SY: Supervision, Writing – review & editing. AB: Writing – review & editing. CV:

Supervision, Writing – review & editing. FL: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research was funded by Principado de Asturias (Spain) through the program “Ayudas a organismos públicos para apoyar las actividades de I+D+I de sus grupos de investigación” (grant AYUD/2021/51347), as well as by “Programa Severo Ochoa de Ayudas Predoctorales para la investigación y docencia” from Principado de Asturias (grant PA-20-PF-BP19-058 to PM-C), the research project PID2021-127812OB-I00 from MICINN (Spanish Ministry of Science and Innovation), and the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Program under Grant Agreement no. 814650 for the project SynBio4Flav.

Acknowledgments

Authors thank Explora Biotech SrL (Venice, Italy) for providing the synthetic genes, and Extrasynthese (Genay, France) for providing flavonoid pure standards. Authors thank Servicios Científico-Técnicos at the University of Oviedo (HPLC-HRESIMS Unit) for exact mass analyses.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2024.1378235/full#supplementary-material>

References

- Amić, A., and Mastilák Cagardová, D. (2023). A DFT study on the kinetics of HOO•, CH3OO•, and O2•– scavenging by quercetin and flavonoid Catecholic metabolites. *Antioxidants* 12:1154. doi: 10.3390/antiox12061154
- Bernatova, I., and Liskova, S. (2021). Mechanisms modified by (–)-Epicatechin and Taxifolin relevant for the treatment of hypertension and viral infection: knowledge from preclinical studies. *Antioxidants* 10:467. doi: 10.3390/antiox10030467
- Blázquez, B., León, D. S., Torres-Bacete, J., Gómez-Luengo, Á., Kniewel, R., Martínez, I., et al. (2023). Golden standard: a complete standard, portable, and interoperative MoClo tool for model and non-model proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 51:e98. doi: 10.1093/nar/gkad758
- Braune, A., Engst, W., Elsinghorst, P. W., Furtmann, N., Bajorath, J., Gütschow, M., et al. (2016). Chalcone isomerase from *Eubacterium ramulus* catalyzes the ring contraction of Flavanonols. *J. Bacteriol.* 198, 2965–2974. doi: 10.1128/JB.00490-16
- Braune, A., Gütschow, M., Engst, W., and Blaut, M. (2001). Degradation of quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5558–5567. doi: 10.1128/AEM.67.12.5558-5567.2001

- Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., and Chen, X. (2023). A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules* 28:4982. doi: 10.3390/molecules28134982
- Cheng, A.-X., Han, X.-J., Wu, Y.-F., and Lou, H.-X. (2014). The function and catalysis of 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1080–1095. doi: 10.3390/ijms15011080
- Choi, K.-Y., Yang, Y.-H., and Kim, B. (2015). Regioselectivity-driven evolution of CYP102D1 for improved synthesis of 3'-ortho-dihydroxyisoflavone. *Enzym. Microb. Technol.* 71, 20–27. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.01.004
- Cui, S., Cui, Y., Li, Y., Zhang, Y., Wang, H., Qin, W., et al. (2018). Inhibition of cardiac hypertrophy by aromadendrin through down-regulating NFAT and MAPKs pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 805–811. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.143
- Das, A., Baidya, R., Chakraborty, T., Samanta, A. K., and Roy, S. (2021). Pharmacological basis and new insights of taxifolin: a comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* 142:112004. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112004
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., and Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. *Molecules* 26:5377. doi: 10.3390/molecules26175377
- Elsinghorst, P. W., Cavlar, T., Müller, A., Braune, A., Blaut, M., and Gütschow, M. (2011). The thermal and enzymatic Taxifolin–Alphitonin rearrangement. *J. Nat. Prod.* 74, 2243–2249. doi: 10.1021/jp200639s
- Espírito-Santo, D. A., Cordeiro, G. S., Santos, L. S., Silva, R. T., Pereira, M. U., Matos, R. J. B., et al. (2023). Cardioprotective effect of the quercetin on cardiovascular remodeling and atherosclerosis in rodents fed a high-fat diet: a systematic review. *Chem. Biol. Interact.* 384:110700. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110700
- Fernández, E., Weißbach, U., Reillo, C. S., Braña, A. F., Méndez, C., Rohr, J., et al. (1998). Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* 180, 4929–4937. doi: 10.1128/JB.180.18.4929-4937.1998
- Fu, J., Wang, P.-Y., Ni, R., Zhang, J.-Z., Zhu, T.-T., Tan, H., et al. (2023). Molecular identification of a flavone synthase 1/flavanone 3 β -hydroxylase bifunctional enzyme from fern species *Ptilotum nudum*. *Plant Sci.* 329:111599. doi: 10.1016/j.plantsci.2023.111599
- Gao, S., Zhou, J., and Chen, J. (2020). Identification of flavonoids 3-hydroxylase from [*Silybum marianum* (L.) Gaertn] and its application in enhanced production of taxifolin. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 36, 2838–2849. doi: 10.13345/j.cjb.200178
- Huang, H., Wei, S., Wu, X., Zhang, M., Zhou, B., Huang, D., et al. (2023). Dihydrokaempferol attenuates CCl₄-induced hepatic fibrosis by inhibiting PARP-1 to affect multiple downstream pathways and cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 464:116438. doi: 10.1016/j.taap.2023.116438
- Hwang, S., Lee, Y., Kim, J. H., Kim, G., Kim, H., Kim, W., et al. (2021). *Streptomyces* as microbial chassis for heterologous protein expression. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:804295. doi: 10.3389/fbioe.2021.804295
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich. Available at: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=578365](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=578365) (Accessed April 18, 2023).
- Kim, T. H., Lee, J., Kim, H.-J., and Jo, C. (2017). Plasma-induced degradation of quercetin associated with the enhancement of biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 65, 6929–6935. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00987
- Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* 2013, 1–16. doi: 10.1155/2013/162750
- Lee, J.-W., Kim, N. H., Kim, J.-Y., Park, J.-H., Shin, S.-Y., Kwon, Y.-S., et al. (2013). Aromadendrin inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF- κ B and phosphorylation of JNK in RAW 264.7 macrophage cells. *Biomol. Ther. (Seoul)* 21, 216–221. doi: 10.4062/biomolther.2013.023
- Leonard, E., Yan, Y., and Koffas, M. (2006). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 8, 172–181. doi: 10.1016/j.ymben.2005.11.001
- Li, D.-D., Ni, R., Wang, P.-P., Zhang, X.-S., Wang, P.-Y., Zhu, T.-T., et al. (2020). Molecular basis for chemical evolution of flavones to Flavonols and anthocyanins in land plants. *Plant Physiol.* 184, 1731–1743. doi: 10.1104/pp.20.01185
- Liu, Y., Shi, X., Tian, Y., Zhai, S., Liu, Y., Xiong, Z., et al. (2023). An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. *Front. Pharmacol.* 14:1173855. doi: 10.3389/fphar.2023.1173855
- Ly, Y., Edwards, H., Zhou, J., and Xu, P. (2019). Combining 26s rDNA and the Cre-lox P system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* 8, 568–576. doi: 10.1021/acssynbio.8b00535
- Magadán-Corpas, P., Ye, S., Pérez-Valero, Á., McAlpine, P. L., Valdés-Chiara, P., Torres-Bacete, J., et al. (2023). Optimized *De novo* Eriodictyol biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* using an expansion of the Golden standard toolkit for its use in Actinomycetes. *Int. J. Mol. Sci.* 24:8879. doi: 10.3390/ijms24108879
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., and Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* 299:125124. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124
- Marin, L., Gutiérrez-del-Río, I., Entralgo-Cadierno, R., Villar, C. J., and Lombó, F. (2018). *De novo* biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* 13:e0207278. doi: 10.1371/journal.pone.0207278
- Marin, L., Gutiérrez-del-Río, I., Villar, C. J., and Lombó, F. (2021). *De novo* biosynthesis of garbanzol and fustin in *Streptomyces albus* based on a potential flavanone 3-hydroxylase with 2-hydroxylase side activity. *Microb. Biotechnol.* 14, 2009–2024. doi: 10.1111/1751-7915.13874
- Marin, L., Gutiérrez-del-Río, I., Yagüe, P., Manteca, Á., Villar, C. J., and Lombó, F. (2017). *De novo* biosynthesis of Apigenin, Luteolin, and Eriodictyol in the Actinomycete *Streptomyces albus* and production improvement by feeding and spore conditioning. *Front. Microbiol.* 8:921. doi: 10.3389/fmicb.2017.00921
- Myronovskiy, M., Tokovenko, B., Brötze, E., Rückert, C., Kalinowski, J., and Luzhetskyy, A. (2014). Genome rearrangements of *Streptomyces albus* J1074 lead to the carotenoid gene cluster activation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 795–806. doi: 10.1007/s00253-013-5440-6
- Park, S. R., Ahn, M. S., Han, A. R., Park, J. W., and Yoon, Y. J. (2011). Enhanced flavonoid production in *Streptomyces venezuelae* via metabolic engineering. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1143–1146. doi: 10.4014/jmb.1108.08012
- Park, S. R., Paik, J. H., Ahn, M. S., Park, J. W., and Yoon, Y. J. (2010). Biosynthesis of plant-specific flavones and Flavonols in *Streptomyces venezuelae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 1295–1299. doi: 10.4014/jmb.1005.05038
- Park, S. R., Yoon, J. A., Paik, J. H., Park, J. W., Jung, W. S., Ban, Y.-H., et al. (2009). Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *J. Biotechnol.* 141, 181–188. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.03.013
- Pérez-Valero, Á., Ye, S., Magadán-Corpas, P., Villar, C. J., and Lombó, F. (2023). Metabolic engineering in *Streptomyces albidoflavus* for the biosynthesis of the methylated flavonoids sakuranetin, acacetin, and genkwanin. *Microb. Cell Factories* 22:234. doi: 10.1186/s12934-023-02247-3
- Pozzessi, N., Pierangeli, S., Vacca, C., Falchi, L., Pettorossi, V., Martelli, M. P., et al. (2011). Maesopsin 4-O- β -D-glucoside, a natural compound isolated from the leaves of *Artocarpus tonkinensis*, inhibits proliferation and up-regulates HMOX1, SRXN1 and BCAS3 in acute myeloid leukemia. *J. Chemother.* 23, 150–157. doi: 10.1179/joc.2011.23.3.150
- Redondo-Blanco, S., Fernández, J., Gutiérrez-del-Río, I., Villar, C. J., and Lombó, F. (2017). New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. *Front. Pharmacol.* 8:109. doi: 10.3389/fphar.2017.00109
- Sui, S., Xie, K., Guo, R., Dai, J., and Yang, L. (2023). Molecular characterization of a Stereoselective and promiscuous flavanone 3-hydroxylase from *Carthamus tinctorius* L. *J. Agric. Food Chem.* 71, 1679–1689. doi: 10.1021/acs.jafc.2c07202
- Thuy, T. T., Thien, D. D., Quang Hung, T., Tam, N. T., Anh, N. T. H., Nga, N. T., et al. (2016). *In vivo* anticancer activity of maesopsin 4-O- β -glucoside isolated from leaves of *Artocarpus tonkinensis* a. Chev. Ex Gagnep. *Asian Pac J Trop Med* 9, 351–356. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.03.012
- Wu, X., Liu, J., Liu, D., Yuwen, M., Koffas, M. A. G., and Zha, J. (2022). Biosynthesis of eriodictyol from tyrosine by *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Factories* 21:86. doi: 10.1186/s12934-022-01815-3
- Xu, P., Li, X., Fan, J., Tian, S., Cao, M., Lin, A., et al. (2023). An arginine-to-histidine mutation in flavanone-3-hydroxylase results in pink strawberry fruits. *Plant Physiol.* 193, 1849–1865. doi: 10.1093/plphys/kiad424
- Yu, S., Li, M., Gao, S., and Zhou, J. (2022). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the production of dihydroquercetin from naringenin. *Microb. Cell Factories* 21:213. doi: 10.1186/s12934-022-01937-8
- Zhang, H. L., Wang, M. L., Yi, L. Z., Högger, P., Arroo, R., Bajpai, V. K., et al. (2022). Stability profiling and degradation products of dihydromyricetin in Dulbecco's modified eagle's medium. *Food Chem.* 378:132033. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.132033
- Zhou, J., Liu, C., Zhao, S., Liu, Y., Zhang, S., Zhao, Q., et al. (2022). Improved yield of theaflavin-3, 3'-digallate from *Bacillus megaterium* tyrosinase via directed evolution. *Food Chem.* 375:131848. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131848

RESULTADOS. Capítulo 4



Article

Gut Microbiota and Inflammation Modulation in a Rat Model for Ulcerative Colitis after the Intraperitoneal Administration of Apigenin, Luteolin, and Xanthohumol

Patricia Magadán-Corpas^{1,2,3}, Álvaro Pérez-Valero^{1,2,3} , Suhui Ye^{1,2,3} , Sandra Sordon⁴ , Ewa Huszcza⁴ , Jarosław Popłonski⁴, Claudio J. Villar^{1,2,3} and Felipe Lombó^{1,2,3,*}

¹ Research Group BIONUC (Biotechnology of Nutraceuticals and Bioactive Compounds), Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

² IUOPA (Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias), 33006 Oviedo, Spain

³ ISPA (Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias), 33006 Oviedo, Spain

⁴ Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

*Correspondence: lombofelipe@uniovi.es; Tel.: +34-985103593

Citation: Magadán-Corpas, P.; Pérez-Valero, Á.; Ye, S.; Sordon, S.; Huszcza, E.; Popłonski, J.; Villar, C.J.; Lombó, F. Gut Microbiota and Inflammation Modulation in a Rat Model for Ulcerative Colitis after the Intraperitoneal Administration of Apigenin, Luteolin, and Xanthohumol. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3236. <https://doi.org/10.3390/ijms25063236>

Academic Editors: Fernando Santos-Beneit and Rustam I. Aminov



Received: 24 January 2024; Revised: 5 March 2024; Accepted: 8 March 2024; Published: 12 March 2024

Abstract: Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disorder affecting the colon, with symptomatology influenced by factors including environmental, genomic, microbial, and immunological interactions. Gut microbiota dysbiosis, characterized by bacterial population alterations, contributes to intestinal homeostasis disruption and aberrant immune system activation, thereby exacerbating the inflammatory state. This study assesses the therapeutic efficacy of intraperitoneal (IP) injected flavonoids (apigenin, luteolin, and xanthohumol) in the reduction of inflammatory parameters and the modulation of the gut microbiota in a murine model of ulcerative colitis. Flavonoids interact with gut microbiota by modulating their composition and serving as substrates for the fermentation into other anti-inflammatory bioactive compounds. Our results demonstrate the effectiveness of luteolin and xanthohumol treatment in enhancing the relative abundance of anti-inflammatory microorganisms, thereby attenuating pro-inflammatory species. Moreover, all three flavonoids exhibit efficacy in the reduction of pro-inflammatory cytokine levels, with luteolin strongly demonstrating utility in alleviating associated physical UC symptoms. This suggests that this molecule is a potential alternative or co-therapy to conventional pharmacological interventions, potentially mitigating their adverse effects. A limited impact on microbiota is observed with apigenin, and this is attributed to its solubility constraints via the chosen administration route, resulting in its accumulation in the mesentery.

Keywords: inflammatory bowel disease; gut microbiota; flavonoid; anti-inflammatory

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a term that encompasses two conditions, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), both characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract. While CD can affect any part of the intestinal tract (from mouth to anus), UC only affects the colon, causing abdominal pain, mucus, diarrhea, and blood stool [1]. IBD represents a group of archetypal complex disorders distinguished by chronic and varied symptoms, influenced by the interplay among environmental, genomic, microbial, and immunological factors [2].

Multiple investigations have corroborated notable distinctions in the composition, diversity, and/or abundance of gut microbiota (dysbiosis) between healthy individuals and those with IBD, leading to the loss of intestinal homeostasis or improper immune activation [3,4,5]. A lot of research is being conducted to better understand how the composition of the gut microbiota may influence the development and progression of IBD, existing common microbial signatures shared among patients with this pathology, such as an increase in the phylum *Pseudomonadota* [6,7]. The gut microbiome dysbiosis present in IBD patients is closely related to inflammation, as it can increase the expression of inflammatory cytokines by the intestinal T lymphocytes. Several mediators contribute to the development of this chronic intestinal inflammation, with the primary ones being the interleukins IL-1 β , IL-6, and IL-17 [8,9,10,11]. Additionally, the disruption of the mucosal barrier associated with IBD leads to alterations in the taxa composition of mucus communities. Commensal microorganisms may transition into pathogenic entities (pathobionts), thereby initiating and perpetuating the inflammatory process through aberrant activation of the mucosal immune system [12,13,14]. Furthermore, the production of short-chain fatty acids (SCFAs), generated from the metabolism of certain microorganisms on the mucus layer and dietary prebiotic carbohydrates, is also compromised. These SCFAs are associated with anti-inflammatory properties, the maintenance of normal mucosal function, and the regulation of intestinal immune homeostasis [12,15,16,17]. It has not yet been possible to determine whether the dysbiosis associated with IBD is the cause or a consequence of this pathology. Nevertheless, it is certain that the deregulation of the gut microbiota balance contributes to the evolution and progression of the IBD, supporting and maintaining the inflammatory responses.

At the clinical level, UC requires long-term potent pharmacological treatment [18], and it may be difficult to find a suitable medication without serious side effects. Conversely, flavonoids constitute a family of natural polyphenolic compounds derived from plants, which have been previously demonstrated to have anti-inflammatory properties. In this work, we have evaluated the effectiveness of three intraperitoneal (IP) injected flavonoids (apigenin, luteolin, and xanthohumol) in the amelioration of the symptoms associated with UC in a rat model after dextran sodium sulfate (DSS) induction, as well as their influence on the gut microbiota composition. These three flavonoids have already been proven as antitumor compounds in previous *in vitro* experiments with human colon cancer cell lines [19], and their effectiveness in the treatment of IBD after oral administration has been shown *in vivo* [1,20,21,22,23]. Meanwhile, their therapeutic potential through IP administration remains an area warranting further comprehensive investigation to encompass the direct effects of flavonoids. This approach circumvents the initial gastrointestinal (GI) transit, thereby avoiding processes of degradation and modification of these biopharmaceutical compounds [24]. Studies also reported IP administration of small molecule pharmacological agents with a faster and more complete absorption, compared to oral routes [25]. Furthermore, a diminished dosage of flavonoids is required.

In addition, the impact of xanthohumol on the gut microbiota remains unexplored. In this work, we have characterized, for the first time, the gut microbiota changes induced by xanthohumol in a UC murine model.

The primary aim of this research was to assess the potential therapeutic efficacy of IP administration of flavonoids as a novel and potential therapeutic intervention for UC in a rat model of this disease. In pursuit of this goal, multiple parameters relevant to the progression of UC have been evaluated, including gut microbiota characterization. This approach has encompassed both the direct effects of flavonoids and their indirect effects mediated through the modulation of gut microbiota populations. The changes in the gut microbiota composition caused by the flavonoid treatments have been associated with specific bacterial taxa. These alterations in the bacterial populations may therefore modify the metabolic pathways of the production of bioactive metabolites [26,27]. Finally, these breakdown metabolites (e.g., SCFAs, aromatic flavonoid breakdown derivatives, etc.) may act at different levels in the colon mucosa, downregulating the inflammatory status (e.g., at the level of lymphocyte population modulation, myeloperoxidase, cytokines, barrier function, etc.)

The experiments described in this work demonstrate that luteolin, and to a lesser extent xanthohumol, are successful in the treatment of UC via IP injection. Our main findings are that both flavonoids exert their activity over the modulation of the gut microbiota community structure towards a decrease in pro-inflammatory taxa and an increase in anti-inflammatory taxa. Some of these anti-inflammatory taxa are well-known producers of beneficial compounds, such as SCFAs and flavonoid metabolites, which may further contribute to modulating pro-inflammatory cytokines in the intestinal mucosa. Statistically significant differences have been observed in the reduction of the cytokines IL-6 and IL-1 β in the three flavonoid treatment cohorts, likely linked to either the direct action of flavonoids or the metabolites resulting from the gut microbiota modulation. Finally, the luteolin observed effects are further extended to an improvement in colon ulceration and stool consistency parameters. However, in this study, IP administration has caused a reduced bioavailability of apigenin (and reduced protection against UC) due to the presence of precipitate granules in the mesentery, a fact that had not been previously described, and is probably derived from its lower hydrophilicity (in comparison with luteolin).

2. Results

Comparisons of the analyzed parameters were conducted between the PBS (phosphate buffer saline) control cohort, serving as the disease model, and each of the cohorts receiving flavonoid treatments. The analyzed parameters encompassed daily body weight measurements, serving as an indicator of effective digestive function, as animals with UC typically exhibit compromised nutrient absorption and consequent reductions in body weight. Additionally, the disease activity index (DAI), which integrates changes in body weight and stool consistency (including diarrhea severity and the presence of blood in feces) as clinical indicators of disease severity, was assessed. Following euthanasia at the conclusion of the experiment, three macroscopic histological parameters associated with inflammation were investigated: hyperplastic Peyer's patches, which are lymphoid tissues in the small intestine that undergo macroscopic enlargement in response to inflammation; colon length, which typically diminishes during inflammatory conditions; and colon ulceration, indicative of mucosal alteration. Also linked to the inflammatory status, two types of cytokines (IL-1 β and IL-6) were measured in plasma samples, and the myeloperoxidase concentration was evaluated in the colon mucosa (after tissue homogenization). Subsequently, the weight of the caecum was quantified, and bacterial populations within this organ were analyzed using 16S rRNA next-generation sequencing (NGS) on an Illumina platform.

2.1. Effect of Flavonoid Treatments on Body Weight and DAI

Body weight was monitored daily throughout the entire experimental period. Animals induced

with UC exhibited discernible patterns in the comparison between cohorts (Figure 1). Notably, there was an initial increase in body weight until day 9, followed by a subsequent decline in all the cohorts, attributed to the induction of UC. It is noteworthy that this decline in body weight was particularly pronounced in the UC-induced animals from the non-treated (phosphate-buffered saline, PBS) and apigenin-treated cohorts, reaching its limit at day 11. All cohorts exhibited a recuperation phase toward the conclusion of the experiment as the effects of DSS treatment gradually waned.

By the end of the experiment (day 12), the mean body weight value for the UC-induced animals in the PBS cohort was 139.7 ± 15.9 g, while the two healthy absolute control animals reached 181.3 ± 20.1 g on average. Regarding the apigenin, luteolin, and xanthohumol cohorts, the mean weights at day 12 in the case of the UC-induced animals were 143.8 ± 19.4 g, 150.2 ± 8.3 g, and 149.6 ± 18.6 g, respectively, while their corresponding healthy controls weights were 183.4 ± 9.3 g, 170.6 ± 3 g, and 154.4 ± 17.1 . Statistical analyses showed no significant differences between the PBS and either of the flavonoid treatment cohorts regarding body weight (Supplementary Figure S1a).

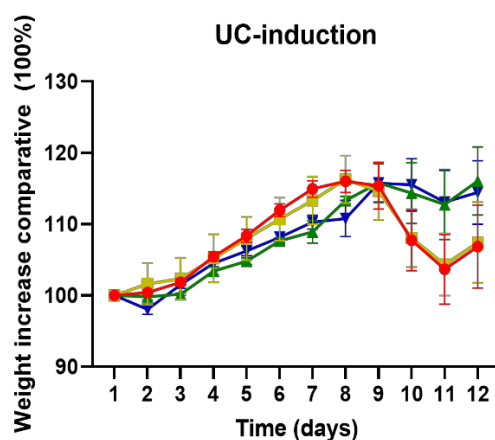


Figure 1. Comparison of the body weight increase in UC-induced animals from the four studied cohorts. The reductions in body weight observed around days 9 to 11 in UC-induced animals are due to the peak in UC symptoms (reduced feed ingest due to colon inflammation). Note that this reduction was minimal in luteolin and xanthohumol cohorts, thus showing a protective effect exerted by these treatments. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green); xanthohumol (blue).

The mean DAI scores on day 12 are represented in Figure 2a, exclusively for the UC-induced animal groups. A statistically significant difference was observed when comparing the luteolin-treated cohort to the control PBS cohort. Given the absence of statistically significant variations in body weight across cohorts, the enhancement in the DAI index in the luteolin cohort primarily stemmed from an amelioration in stool consistency (Figure 2b), one of the contributing parameters for DAI computation.

Furthermore, DAI index trends over the final five days of this study (Figure 2c) revealed a reduction in DAI scores within the luteolin and xanthohumol treatment cohorts, consistently maintaining lower scores compared to those observed in the PBS and apigenin cohorts during the peak period of UC induction.

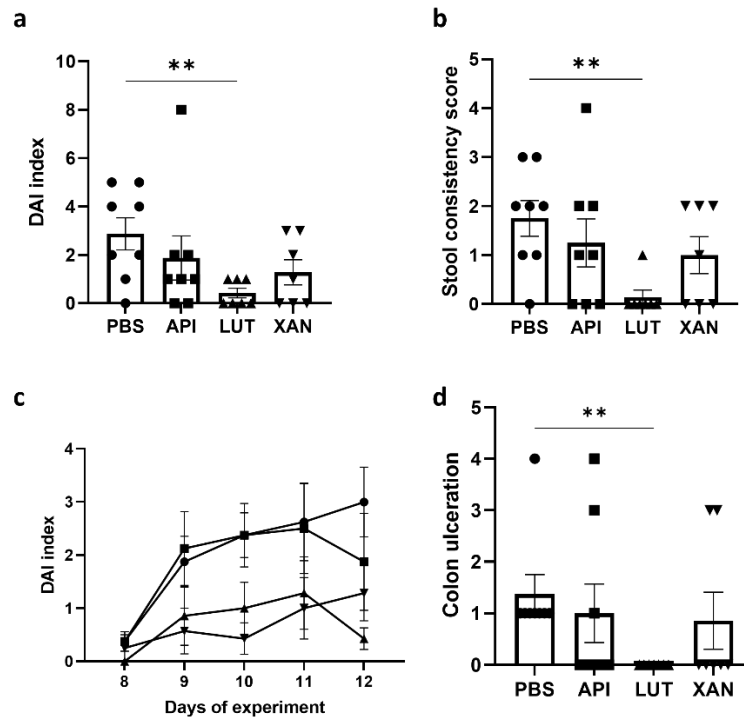


Figure 2. Measurements of several UC parameters in UC-induced animals from the four studied cohorts: (a) DAI index, (b) stool consistency score at day 12, (c) progression of the DAI index during the last five days of the experiment, and (d) colon ulceration at day 12. Comparisons were performed between the PBS control cohort and each flavonoid treatment cohort. In all cases, luteolin treatment showed a strong protective effect. Circle: control cohort; square: apigenin treatment cohort; upward triangle: luteolin treatment cohort; downward triangle: xanthohumol treatment cohort. Asterisks indicate statistically significant differences (** $p < 0.005$).

2.2. Effect of Flavonoid Treatments on Hyperplastic Peyer's Patches, Colon Length, and Colon Ulceration

Peyer's patches were macroscopically quantified along the small intestine after euthanasia as this lymphoid tissue becomes hyperplastic in response to inflammatory processes, showing rounded, protruding, white 2–3 mm ovals on the surface of the small intestine [28]. Their reduction in number could then be associated with lower inflammatory signals. A statistically significant lower number of hyperplastic Peyer's patches was not observed in the flavonoid-treated animals compared to the PBS cohort regarding the UC-induced animals (Supplementary Figure S1b).

Colon length was also measured in all the surviving rats, as an indicator of colitis severity: the shorter the colon, the more severe the colitis inflammation. Again, no statistically significant differences were observed in the UC-induced animals between the PBS cohort and each of the three treatment cohorts (Supplementary Figure S1c).

Finally, colon ulceration was quantified for each individual within this study, and the findings are represented in Figure 2d. A statistically significant disparity was observed in the reduction of colon ulceration between the group of animals that were induced with UC and received luteolin treatment and the untreated UC-induced animals from the PBS cohort. Notably, all animals within the luteolin cohort displayed a complete absence of ulceration.

2.3. Effect of Flavonoid Treatments on Pro-Inflammatory Cytokines and Myeloperoxidase (MPO)

Statistical analyses revealed strong significant reductions in the pro-inflammatory cytokine IL-6 levels across all three flavonoid treatment groups compared to the PBS control cohort in the

animals under UC induction. However, when examining cytokine IL-1 β levels, xanthohumol did not exhibit statistically significant differences compared to the PBS control group, while apigenin and luteolin exhibited significant differences (Figure 3a,b).

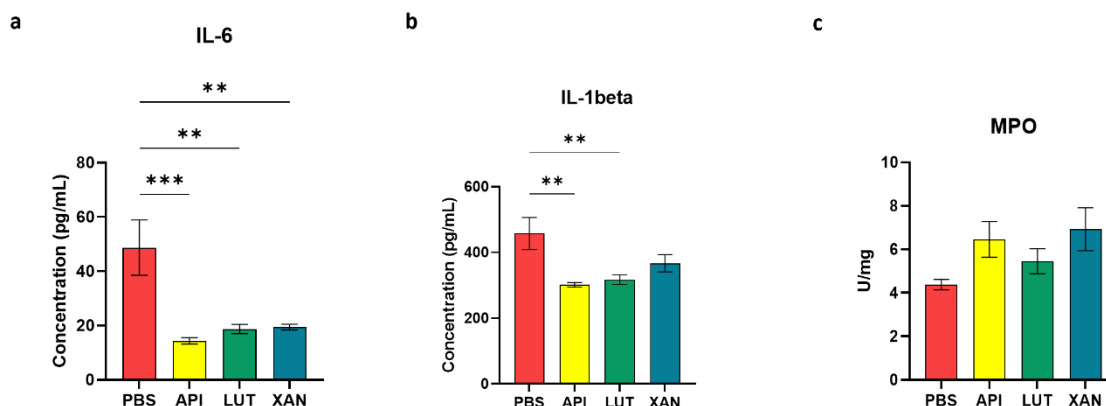


Figure 3. Measure of different pro-inflammatory biomarkers in UC-induced animals from the four studied cohorts: (a) IL-6, (b) IL-1 β , and (c) MPO. Comparisons were performed between the PBS control cohort and each flavonoid treatment cohort. All three flavonoids demonstrated efficacy in reducing the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6, whereas only apigenin and luteolin exhibited effectiveness in modulating IL-1 β . In contrast, flavonoids did not affect levels of MPO. PBS (red); apigenin (API, yellow); luteolin (LUT, green); xanthohumol (XAN, blue). Asterisks indicate statistically significant differences (** p < 0.005, *** p < 0.0005).

With respect to the enzymatic biomarker associated with colon mucosa inflammation (MPO), no statistically significant variances were detected in MPO tissue levels for either of the flavonoid treatments compared to the PBS control cohort (Figure 3c).

2.4. Caecum Weight and Metataxonomic Analyses of the Gut Microbiota

The caecum weight was assessed in the 38 surviving rats across the four cohorts, encompassing rats induced with UC. Statistical analysis revealed no significant differences in caecum weight in the comparison between the PBS cohort and each of the three treatment cohorts. (Supplementary Figure S1d).

In consideration of the microbiota studies, to assess the impact of flavonoid treatments on gut microbiota modulation subsequent to UC induction with DSS, comparisons were conducted on the composition of gut microbiota between the control PBS cohort and each specific flavonoid treatment cohort. Gut microbiota composition determination involved conducting a metataxonomics analysis of cecal content, utilizing 16S ribosomal RNA sequencing.

The two alpha diversity metrics, richness (observed OTUs: Operational Taxonomic Units) and evenness (a parameter that measures how numerically equal the bacterial community is in an experimental cohort, regarding the abundance and numbers of taxa), were measured within microbial communities, and alpha diversity was evaluated through the indices Chao1, Simpson, and Shannon. Boxplot representations of these indices are shown in Supplementary Figure S2. No statistically significant differences were found for any of these metrics between the UC-induced animals from the control PBS cohort and the flavonoid treatment cohorts, indicating no changes in terms of microbial alpha diversity.

The unweighted Unifrac beta diversity index (a qualitative parameter that measures the structural composition of bacterial communities between experimental animal cohorts, including the taxonomy data) was also calculated to evaluate differences between groups in terms of species complexity. The principal coordinate analysis (PCoA) plot for the visualization of microbial communities' structure is shown in Figure 4a. The analysis of beta diversity revealed notable

statistically significant distinctions. Specifically, significant dissimilarities were discerned when contrasting the control PBS cohort with both the luteolin and xanthohumol cohorts (Figure 4b). Conversely, no statistically significant variations were evident when comparing the PBS cohort with the apigenin cohort. Furthermore, statistically significant disparities were also identified when comparing the apigenin cohort with both the luteolin and xanthohumol cohorts. However, there were no statistically significant distinctions between the luteolin and xanthohumol cohorts (Figure 4b).

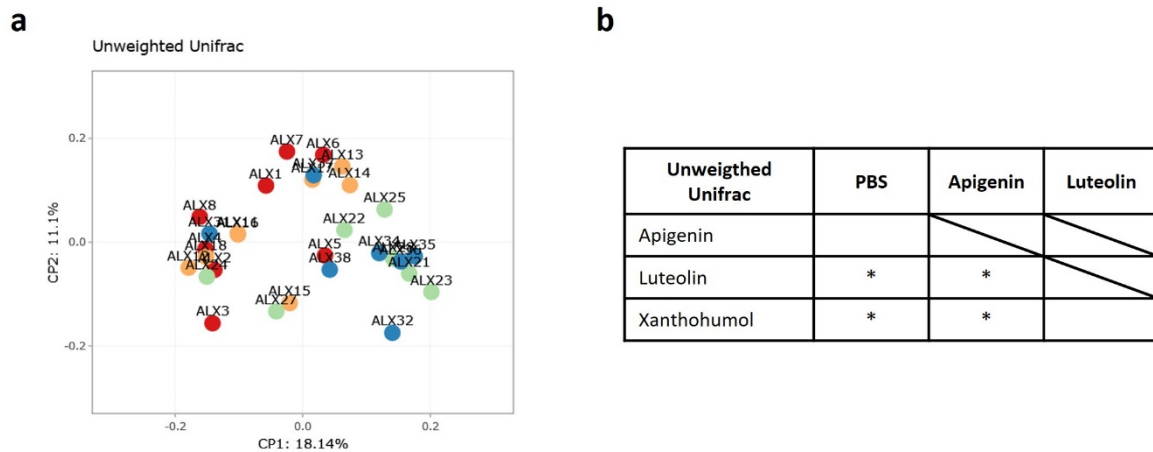


Figure 4. Comparisons of gut microbiota beta diversity metrics between the four studied cohorts: (a) unweighted Unifrac PCoA plot and (b) Permanova test for the unweighted Unifrac beta diversity measure. As ascertained by the unweighted Unifrac beta diversity analysis, the animals within the luteolin and xanthohumol cohorts exhibited greater similarity to each other, while they were more distinct from both the control (PBS) and apigenin cohorts. Conversely, the control and apigenin cohorts demonstrated similarity in terms of microbial community structure. In the PCoA plot, each dot represents one animal, and distances between dots represent the ecological distances between samples. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green); xanthohumol (blue). Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$).

The metataxonomics analysis of the UC-induced animals' gut microbiota showed statistically significant differences at different taxonomic levels and between different cohorts. In general, *Bacillota* and *Bacteroidota* constituted the most predominant phyla (90%) in all cohorts. The relative abundance of the other phyla varied depending on the treatment cohort (Figure 5, Table 1).

When the UC-induced animals from the PBS cohort were compared to the UC-induced animals from each flavonoid treatment cohort (Figure 5, Table 1), statistically significant differences were observed, with a significant reduction in the phylum *Bacillota* in the apigenin cohort (45.49% vs. 51.20% in the PBS animals), while the phylum *Bacteroidota* was significantly decreased in the xanthohumol cohort (34.99% vs. 40.05% in the PBS cohort). A reduction in the phylum *Pseudomonadota* was observed in the luteolin (0.23%) and xanthohumol (0.17%) cohorts with respect to the control cohort (1.28%). The phylum *Desulfobacterota*, with the genus *Bilophila* as its unique member, was also significantly decreased in the xanthohumol cohort (0.03% vs. 0.36% in the PBS animals). Also remarkable, and statistically significant, was the increase in the phylum *Verrucomicrobiota*, with *Akkermansia muciniphila* as its unique representative species, in the xanthohumol cohort (9.77% vs. 4.56% in the PBS cohort).

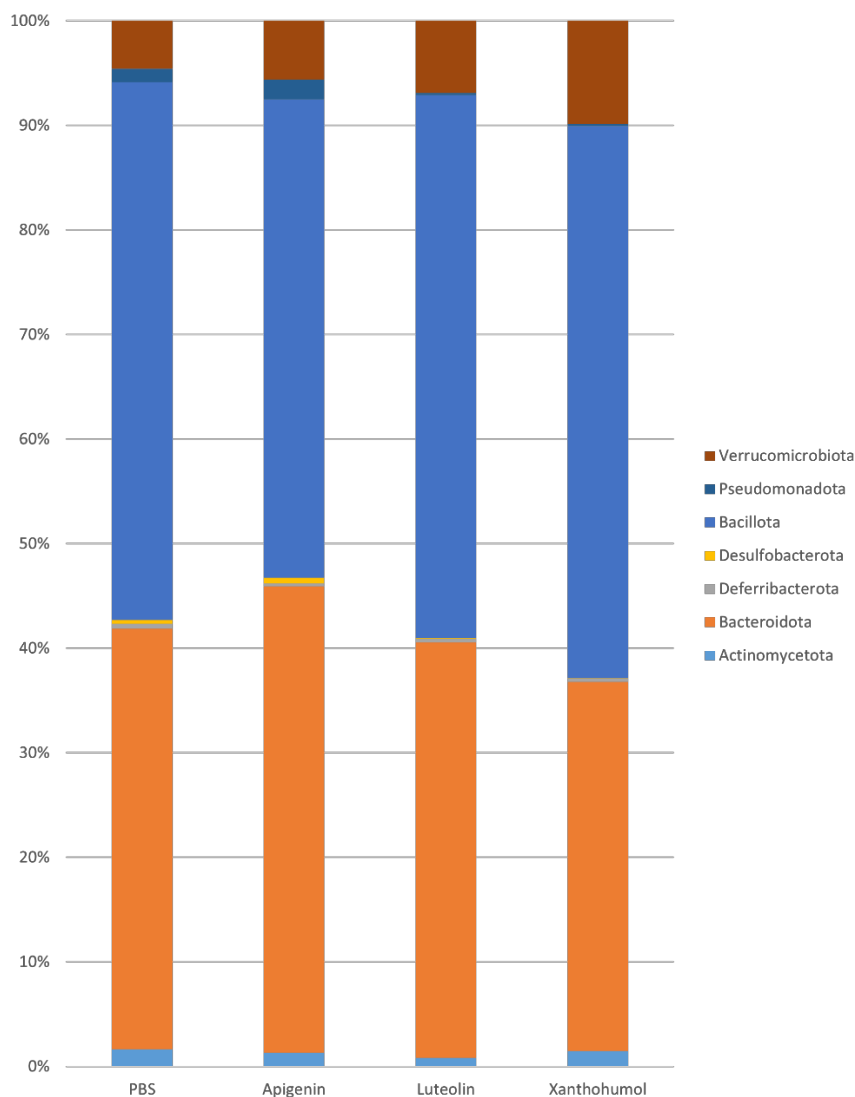


Figure 5. Barplot representation of the relative abundance (%) at the phylum level in the gut microbiota between animals induced with UC across the four experimental cohorts. *Bacillota* and *Bacteroidota* constitute 90% of the relative abundance in all cohorts. Higher differences between PBS and flavonoid treatment cohorts could be observed regarding the phyla *Pseudomonadota* and *Verrucomicrobiota*.

Table 1. Average relative abundance (%) at the phylum level in the gut microbiota between animals induced with UC, across the four experimental cohorts. The statistically significant differences in the comparisons between the control PBS cohort and each flavonoid treatment cohort are depicted. API: apigenin; LUT: luteolin; XAN: xanthohumol. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

Phylum	PBS	Apigenin	Luteolin	Xanthohumol	PBS vs. API	PBS vs. LUT	PBS vs. XAN
<i>Actinomycetota</i>	1.65	1.31	0.83	1.45			
<i>Bacteroidota</i>	40.05	44.32	39.40	34.99			*
<i>Deferribacterota</i>	0.46	0.29	0.33	0.35			
<i>Desulfobacterota</i>	0.36	0.53	0.07	0.03			*
<i>Bacillota</i>	51.20	45.49	51.48	52.32	*		
<i>Pseudomonadota</i>	1.28	1.87	0.23	0.17		**	***
<i>Verrucomicrobiota</i>	4.56	5.57	6.80	9.77			*

Regarding the comparisons between the three flavonoid treatment cohorts, statistically significant differences were observed in the case of the phyla *Bacteroidota*, *Desulfobacterota*, *Bacillota*, and *Pseudomonadota* between the apigenin and the xanthohumol cohorts. Luteolin showed a

statistically significant reduction in comparison with apigenin regarding phylum *Pseudomonadota*.

The main differences at the family level in the comparison between the UC-induced animals from the PBS cohort and those treated with flavonoids were observed after luteolin and xanthohumol administration (Figure 6, Table 2, Supplementary Figure S3). The phylum *Bacillota* was significantly reduced only in the apigenin cohort. However, major changes were observed at the family level regarding the luteolin and xanthohumol cohorts. A statistically significant reduction was observed in the animals from all three flavonoid treatment cohorts regarding the families *Erysipelotrichaceae* (0.53% in the apigenin cohort, 0.38% in the luteolin cohort, and 0.36% in the xanthohumol cohort vs. 2.08% in the PBS cohort), *Streptococcaceae* (0.02%, 0.003%, and 0.02% vs. 0.16% in the PBS cohort) and *Staphylococcaceae* (genus *Staphylococcus*) (0.05%, 0, and 0.003% vs. 0.35% in the PBS cohort). The family *Peptococcaceae* showed a statistically significant reduction in the xanthohumol cohort (0.17% vs. 0.39% in the PBS cohort). Also statistically significant were the reductions in the luteolin and xanthohumol cohorts regarding the families *Anaerovoracaceae* (0.13% and 0.11%, respectively, vs. 0.33% in the PBS cohort), *Peptostreptococcaceae* (genus *Romboutsia*) (0.21% and 0.86% vs. 2.88% in the PBS cohort), and *Clostridiaceae* (genus *Clostridium sensu stricto 1*) (0.11% and 0.12% vs. 0.40% in the PBS cohort). Conversely, the family *Lachnospiraceae* was significantly increased in the luteolin cohort (23.25% vs. 14.96% in the PBS cohort). The decrease in the phylum *Bacteroidota* observed in the xanthohumol cohort could be mainly attributed to a reduction in the family *Rikenellaceae* (0.46% vs. 7.76% in the PBS cohort). A statistically significant increase was observed in the family *Prevotellaceae* in the xanthohumol cohort (3.83% vs. 1.73% in the PBS cohort). Two families from phylum *Pseudomonadota* were reduced in the UC animals from the luteolin and xanthohumol cohorts: *Sutterellaceae* (0.11% and 0.08%, respectively, vs. 0.54% in the PBS cohort) and *Enterobacteriaceae* (0.05% and 0.03%, respectively, vs. 0.68% in the PBS cohort) (Supplementary Figure S3). In the luteolin cohort, the family *Bifidobacteriaceae* (genus *Bifidobacterium*) (0.03% vs. 0.52% in the PBS cohort) showed a reduction (Supplementary Figure S3).

At the genus level (Table 3, Supplementary Figure S4), most of the differences were observed in the luteolin and xanthohumol cohorts compared to the PBS cohort. The genera *Turicibacter* and *Streptococcus*, as the most abundant ones of their respective families (*Erysipelotrichaceae* and *Streptococcaceae*), showed a statistically significant reduction in the luteolin and xanthohumol cohorts, while the genus *Clostridia UCG-014* was increased in the same cohorts (3.07% in luteolin cohort and 5.10% in xanthohumol cohort vs. 1.57% in the PBS cohort). The genus *Lachnospiraceae NK4A136* group (family *Lachnospiraceae*) showed a statistically significant increase in the luteolin cohort (15.48% vs. 6.19% in the PBS cohort), while the genus *Blautia*, belonging to the same family, was significantly increased in both the apigenin (0.30%) and the luteolin (0.37% vs. 0.07% in the PBS cohort) cohorts. The genus *Ruminococcus* (family *Ruminococcaceae*) showed a statistically significant reduction in the luteolin cohort (1.48% vs. 6.19% in the PBS cohort). The genus *Alistipes* (family *Rikenellaceae*) showed a high statistically significant decrease in the xanthohumol cohort (0.39% vs. 7.66% in the PBS cohort). The observed reduction in the phylum *Pseudomonadota* in the luteolin and xanthohumol cohorts was due to reductions in the genera *Parasutterella* and *Escherichia-Shigella*. The genus *Adlercreutzia* (family *Eggerthellaceae*) showed a statistically significant reduction in the luteolin cohort (0.17% vs. 0.4% in the PBS cohort). Conversely, the genus *Enterorhabdus* showed a high increase in the luteolin and xanthohumol cohorts (0.55% and 0.46% vs. 0.17% in the PBS cohort) (Table 3, Supplementary Figure S4).

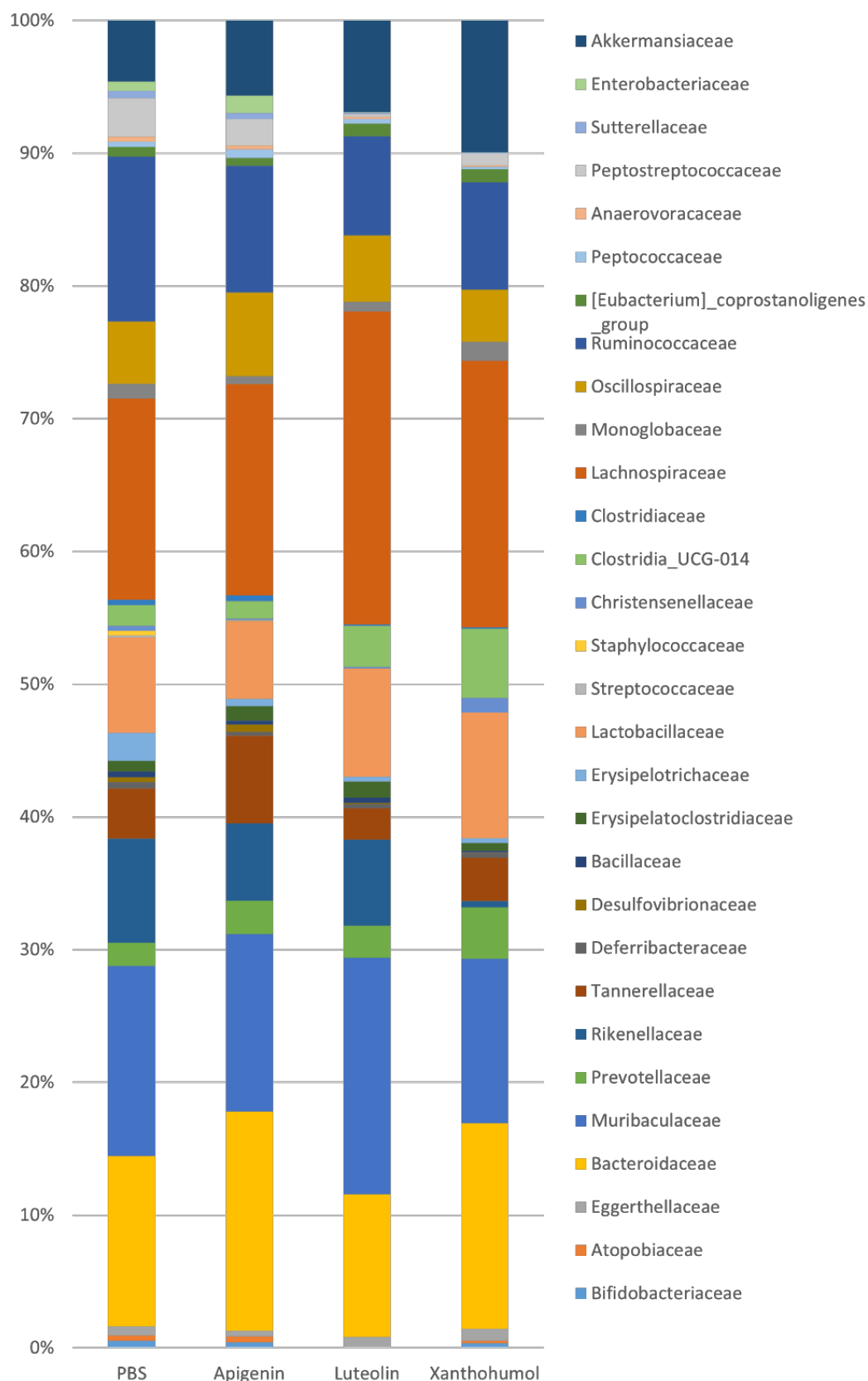


Figure 6. Barplot representation of the relative abundance (%) at the family level in the gut microbiota populations between the animals induced with UC across the four experimental cohorts. See Table 2 for a detailed list of statistically significant differences between the PBS control animals and each of the flavonoid treatments in the UC-induced animals.

Table 2. Average relative abundance (%) at the family level in the gut microbiota between animals induced with UC across the four experimental cohorts. Significant differences in the comparison between the control PBS cohort and each flavonoid treatment cohort are depicted. API: apigenin; LUT: luteolin; XAN: xanthohumol. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

Family	PBS	Apigenin	Luteolin	Xanthohumol	PBS vs. API	PBS vs. LUT	PBS vs. XAN
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.52	0.43	0.03	0.35		**	
<i>Atopobiaceae</i>	0.42	0.43	0.007	0.18		**	
<i>Eggerthellaceae</i>	0.68	0.43	0.79	0.89			
<i>Bacteroidaceae</i>	12.66	16.23	10.59	15.25			
<i>Muribaculaceae</i>	14.15	13.16	17.56	12.16			
<i>Prevotellaceae</i>	1.73	2.48	2.38	3.83			*
<i>Rikenellaceae</i>	7.76	5.71	6.39	0.46			****
<i>Tannerellaceae</i>	3.74	6.51	2.33	3.22			
<i>Deferribacteraceae</i>	0.46	0.29	0.33	0.35			
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.36	0.53	0.07	0.03			*
<i>Bacillaceae</i>	0.45	0.29	0.37	0.13			
<i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	0.79	1.09	1.20	0.57			
<i>Erysipelotrichaceae</i>	2.08	0.53	0.38	0.36	*	**	**
<i>Lactobacillaceae</i>	7.08	5.77	8.04	9.31			
<i>Streptococcaceae</i>	0.16	0.02	0.003	0.02	*	***	*
<i>Staphylococcaceae</i>	0.35	0.05	0	0.003	**	***	****
<i>Christensenellaceae</i>	0.36	0.10	0.08	1.07	*	*	
<i>Clostridia UCG-014</i>	1.57	1.30	3.07	5.10		**	****
<i>Clostridiaceae</i>	0.4	0.43	0.11	0.12		***	**
<i>Lachnospiraceae</i>	14.96	15.65	23.25	19.75		**	
<i>Monoglobaceae</i>	1.08	0.59	0.71	1.41			
<i>Oscillospiraceae</i>	4.63	6.21	4.92	3.89			
<i>Ruminococcaceae</i>	12.28	9.39	7.38	7.93			
<i>Eubacterium</i>	0.75	0.58	0.93	0.97			
<i>Peptococcaceae</i>	0.39	0.63	0.35	0.17			**
<i>Anaerovoracaceae</i>	0.33	0.29	0.13	0.11		**	***
<i>Peptostreptococcaceae</i>	2.88	1.96	0.21	0.86		****	*
<i>Sutterellaceae</i>	0.54	0.45	0.11	0.08		**	****
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.68	1.30	0.05	0.03		**	**
<i>Akkermansiaceae</i>	4.56	5.57	6.80	9.77			*

At the species level (Table 3, Supplementary Figure S5), an uncharacterized bacterium from the genus *Blautia* showed a statistically significant increase in all three flavonoid treatment cohorts (0.28% in the apigenin cohort, 0.33% in the luteolin cohort and 0.15% in the xanthohumol cohort vs. 0.01% in the PBS cohort). The observed changes in the family *Bifidobacteriaceae* are mainly associated with the species *Bifidobacterium animalis*, which was highly reduced in the luteolin cohort. The two species *Bacteoides dorei* (1.57% in xanthohumol vs. 0.87% in PBS cohort) and *Bacteroides thetaiotaomicron* (2.32% in xanthohumol vs. 1.31% in PBS cohort) showed an increase in the xanthohumol cohort, and *B. dorei* also increased in the apigenin cohort (1.59%), but decreased in the luteolin cohort (0.36%).

Regarding the comparisons between the three flavonoid treatment cohorts, the luteolin and xanthohumol cohorts only showed differences in the genera *Alistipes*, *Peptococcus*, and *Romboutsia* (Supplementary Figures S3 and S4). The apigenin cohort shared the same differences as the PBS cohort in comparison to the other two cohorts: *Bifidobacteriaceae*, *Atopobiaceae*, *Rickenellaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Staphylococcaceae*, *Clostridia UCG-014*, *Clostridiaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Sutterellaceae*, and *Enterobacteriaceae*. The apigenin cohort showed main differences compared to the luteolin cohort regarding the genera *Parabacteroides* and *Christenellaceae*

R7 group and compared to the xanthohumol cohort in the genus *Christenellaceae* R7 group.

Table 3. Average relative abundance (%) at the genus and species levels in the gut microbiota between animals induced with UC across the four experimental cohorts. Significant differences in the comparison between the control PBS cohort and each flavonoid treatment cohort are depicted. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$). API: apigenin; LUT: luteolin; XAN: xanthohumol.

Genus Species	PBS	Apigenin	Luteolin	Xanthohumol	PBS vs. API	PBS vs. LUT	PBS vs. XAN
<i>Bifidobacterium</i>	0.52	0.43	0.03	0.35		**	
<i>B. animalis</i>	0.41	0.41	0.03	0.28		*	
<i>Adlercreutzia</i>	0.40	0.22	0.17	0.24		*	
<i>Enterorhabdus</i>	0.17	0.15	0.55	0.46		****	***
<i>Bacteroides</i>	12.66	16.23	10.59	15.25			
<i>B. dorei</i>	0.87	1.59	0.36	1.57	*	**	*
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1.31	2.09	1.12	2.32			*
<i>Alistipes</i>	7.66	5.67	6.37	0.39			****
<i>Bilophila</i>	0.36	0.53	0.07	0.03			*
<i>Turicibacter</i>	0.85	0.35	0.10	0.22		****	*
<i>Streptococcus</i>	0.15	0.02	0.003	0.016		**	*
<i>Staphylococcus</i>	0.35	0.05	0	0.003	***	***	****
<i>Clostridia_UCG-014</i>	1.57	1.30	3.07	5.10		**	****
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	0.40	0.43	0.11	0.12		***	**
<i>Blautia</i>	0.07	0.30	0.37	0.19	*	*	
<i>Uncharacterized</i>	0.01	0.28	0.33	0.15	**	**	*
<i>Lachnospiraceae NK4A136</i>	6.19	7.32	15.48	12.27		*	
<i>Ruminococcus</i>	6.19	3.47	1.48	2.93		**	
<i>Peptococaceae uncultured</i>	0.36	0.53	0.31	0.17			***
<i>Romboutsia</i>	2.88	1.96	0.21	0.86		****	*
<i>Parasutterella</i>	0.54	0.45	0.11	0.08		**	****
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.68	1.30	0.05	0.03		**	**
<i>Akkermansia</i>	4.56	5.57	6.80	9.77			*
<i>A. muciniphila</i>	4.56	5.57	6.80	9.77			*

3. Discussion

UC is characterized by chronic inflammation and ulcers in the colon mucosa. This study evaluated the anti-inflammatory potential of IP injection of three different flavonoids (apigenin, luteolin, and xanthohumol) in the treatment of UC, identifying any direct effect, as well as potential changes in the gut microbiota composition that may explain or correlate with any beneficial effect in the UC pathophysiology observed (cytokines levels, mucosa alterations, etc.). These three compounds have previously demonstrated in vitro antitumor activity against HT-29, HCT116, and T84 human colon cancer cell lines [19]. Furthermore, oral administration of these flavonoids to murine models showed in vivo efficacy in the treatment of IBD. Assessments included a reduction in anti-inflammatory markers, mitigation of colon injuries, restoration of intestinal barrier integrity, and downregulation of immune pathways. An evaluation of the effects on gut microbiota modulation was conducted solely for apigenin and luteolin [1,20,21,22,23]. Conversely, oral administration of quercetin failed in the co-treatment enhancement of the anticancer effect compared to IP administration, further emphasizing the potential advantageous features of IP injection. Additionally, increased levels of quercetin were observed in tumor tissues following IP administration [29]. Using the IP administration route in this work, these nutraceuticals avoid GI first-pass and they are first transferred to the mesentery capillaries; from there, they reach the portal vein towards the liver. From the liver, they are secreted via the bile duct to the small intestine, where

they finally reach the gut microbiota, modulating the taxa present in the lumen and generating metabolism products (derived from the corresponding flavonoid skeleton), which may act at the colonocyte level or enter the portal circulation again [25].

In this study, a total of forty rats were utilized as a model for UC induced by DSS, and the progression of this condition was assessed across various parameters. The rats were divided into four cohorts, with three cohorts receiving IP injections of flavonoids and the fourth cohort serving as a control (receiving only PBS injections). Following UC induction, each flavonoid treatment was compared to the PBS control cohort in terms of efficacy. Biomarkers from body, tissue, and plasma samples were analyzed, alongside metataxonomic data of the gut microbiota. No adverse effects on the animals' health were observed following flavonoid treatments, as indicated by biomarker comparisons between healthy control animals (those sentinels not subjected to UC induction) across the different cohorts.

Among the three evaluated flavonoids, the present study has shown a superior effectiveness of luteolin in mitigating UC across all measured parameters. In this regard, a total absence of colon mucosa ulceration (Figure 2d) and a high reduction in the DAI index (Figure 2a,c) could be assessed after luteolin administration, in accordance with previous observations by other authors using oral administration [1]. The reduction in the DAI index in the luteolin cohort could be mainly attributed to an improvement in the stool consistency score (Figure 2b) since no significant differences were observed in body weight gain between the different cohorts (Supplementary Figure S1a). Although not statistically significant, it was notable how the decrease in the body weight on days 9 to 11, due to the UC stage, was markedly more pronounced in the PBS and apigenin cohorts, indicating a more acute manifestation of UC in these two cohorts (Figure 1).

The reductions observed in the pro-inflammatory IL-6 and IL-1 β cytokines (Figure 3a,b) may be attributed to either the direct systemic anti-inflammatory properties of the flavonoids or the generation of bioactive metabolites resulting from the microbial metabolism of these flavonoids in the gut. Most known microbial gut metabolites derived from the flavones apigenin and luteolin comprise 3-(4'-hydroxyphenyl) propionic acid and 3-(3',4'-dihydroxyphenyl) propionic acid, respectively, generated by the cleavage of C-ring, with phloroglucinol being released in both cases [24,26,27,30]. In the case of xanthohumol, the resulting gut metabolite is the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin [26]. These gut microbiota metabolites have been described with antioxidant, anticancer, and antimicrobial bioactives [31], as well as anti-inflammatory, and are able to inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) [32]. In our particular assay, xanthohumol, which has been described as being degraded by some microorganisms present in the human gut microbiota [24,26], caused a reduction in IL-6 circulating levels but had no significant effect on the IL-1 β plasma levels in the analyzed rats, while apigenin and luteolin, which are metabolized in a different way, seemed to have similar effects over both cytokines in our animal model for UC (Figure 3a,b).

According to the literature, the gut microbiota plays a critical role in the pathogenesis of UC [33,34,35]. Dysbiotic gut microbiota was reported to be necessary for inflammation, and thus, this is associated with the development and progression of this IBD [12,36]. In this regard, a metataxonomics analysis of the cecal content was performed and the gut microbiota composition was determined through 16S ribosomal RNA sequencing. As a result, some interesting changes in the gut microbiota composition have emerged here as the most significant ones among all the comparisons performed. Based on these findings, we can affirm that IP administration enables flavonoids to reach the colon lumen through mesenteric absorption into the portal vein, their subsequent transfer to the liver, and eventual secretion into the intestinal lumen via the bile duct, thereby exerting an effect on the intestinal luminal ecosystem.

Thus, while richness and evenness were similar in all the cohorts of this study (Supplementary

Figure S2), interesting differences were observed in terms of beta diversity of gut microbiota composition between the different groups (Figure 4). These beta diversity analyses suggest that the PBS and apigenin cohorts showed a similar gut microbiota community structure, while the same cohorts are barely related to the luteolin and xanthohumol cohorts, which in turn, seemed to share a resemblance (Figure 4b). This observation also became apparent when a heatmap clustering of the samples based on the abundance of genera was depicted (Supplementary Figure S6). Subsequently, a comprehensive analysis of the microbiota reaffirmed this finding (Figure 6, Table 2 and Table 3).

Major statistically significant differences were observed in the comparison of UC animals' gut microbiota after luteolin and/or xanthohumol administration compared to the control PBS cohort. These differences included reductions and increases in pro-inflammatory and anti-inflammatory bacteria, respectively. The genera *Turicibacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Romboutsia*, *Parasutterella*, and *Escherichia-Shigella* [37,38,39,40] were reduced both in the luteolin and the xanthohumol cohorts (Table 3, Supplementary Figure S4). The *Parasutterella* and *Escherichia-Shigella* genera (phylum *Pseudomonadota*) are considered part of an unstable gut microbial community, and they are associated with the genesis and development of IBD, as well as with chronic intestinal inflammation [37,41,42]. Conversely, the genera *Clostridia UCG-014* and *Enterorhabdus* [26,43] were increased in these luteolin and xanthohumol cohorts (Table 3, Supplementary Figure S4). In particular, the genus *Enterorhabdus* belongs to the polyphenol-degrading family *Eggerthellaceae* (phylum *Actinomycetota*), which is associated with health status and reported to potentiate the production of the previously mentioned bioactive phenolic metabolites [26,44,45].

Changes associated only with the xanthohumol cohort were also observed, including a reduction in the family *Peptococcaceae* and the genera *Alistipes* and *Bilophila* (Table 2 and Table 3) [28,46,47]. The genus *Alistipes*, highly reduced in the UC animals from the xanthohumol cohort, has been correlated with the development of dysbiosis and disease [48]. The genus *Bilophila* has been described to have a potential role in chronic inflammation [49], and it has been found to be reduced in animal models treated orally with anthocyanins [28]. In the phylum *Bacteroidota*, statistically significant increases were observed in the family *Prevotellaceae* in the xanthohumol cohort (Table 2, Supplementary Figure S3) [39,50], as well as in the species *Bacteroides dorei* and *Bacteroides thetaiotaomicron*, both being species reported with anti-inflammatory activity (Table 3, Supplementary Figure S5) [51,52]. The species *Akkermansia muciniphila* (phylum *Verrucomicrobiota*) is mainly considered a potential second-generation probiotic for the treatment of intestinal microbiome-associated diseases [53]. In this study, *A. muciniphila* was increased in the UC animals of the xanthohumol cohort (Table 3, Supplementary Figure S5). This species is a mucin-degrading bacteria reported to release monosaccharides, amino acids, and SCFAs into the environment, stimulating beneficial intestinal bacteria metabolic functions and contributing to the alleviation of microbial dysbiosis due to IBD [54,55,56].

Meanwhile, changes exclusively associated with the luteolin cohort included increases in the genera *Blautia* and *Lachnospiraceae NK4A136 group*, both belonging to the family *Lachnospiraceae*, and reductions in the genus *Ruminococcus* (Table 3) [37,39,57,58]. The family *Lachnospiraceae* (Table 2) is one of the main butyrate-producing bacteria, and it has been associated with the control of gut inflammatory processes via the reduction of the expression of pro-inflammatory cytokines, the conversion of primary to secondary bile acids, and the resistance against the colonization of intestinal pathogens [59,60,61,62]. The increase in the genus *Lachnospiraceae NK4A136 group* has been previously related to inflammation alleviation after polyphenol administration [63]. Interestingly, an uncharacterized bacterium was increased in all three flavonoid treatment cohorts (Table 3, Supplementary Figure S5). This species belongs to the genus *Blautia*, a commensal SCFAs-producing bacteria, with a role in maintaining the environmental balance in the intestine and in preventing

inflammation by upregulating intestinal regulatory T_{reg} cells [57]. Although a significant reduction was observed in the common probiotic species *Bifidobacterium animalis* in the UC animals of the luteolin cohort in comparison with the PBS cohort ones, this was the result of a maintained abundance of this species in all animals (healthy controls and UC-induced) in the luteolin cohort (Table 3, Supplementary Figure S5). Consistent with this observation, the literature has previously reported a bacteriostatic effect of luteolin over lactic acid bacteria and *B. animalis* [64].

Collectively, although numerous studies have reported the effectiveness of apigenin in the amelioration of IBD [20,21], our investigations demonstrate that, in the context of this UC animal model, the outcomes associated with apigenin treatment closely resemble those of the control cohort administered with PBS. This similarity extends across multiple domains, including physiological parameters, tissue biomarkers, and microbiota analyses, but not in the case of cytokines, where apigenin administration actually causes significant statistical differences in plasma levels of IL-1 β and IL-6 (a direct effect of flavonoids IP injections).

In contrast, luteolin, and to a lesser extent xanthohumol, emerged as promising therapeutic agents for the prevention and treatment of UC disease when administered via IP injection. Both luteolin and xanthohumol exhibited an ability to modulate the composition of the gut microbiota community, favoring the enrichment of anti-inflammatory taxa, capable of producing advantageous compounds, like SCFAs or phenolic metabolites derived from flavonoids, while concurrently reducing the presence of pro-inflammatory taxa within the intestinal lumen. They could potentially elicit their beneficial effects towards UC directly, or their effects can be mediated through the bioactive metabolites produced by the gut microbiota during flavonoid metabolism.

A primary contributing factor for the observed lower efficacy of apigenin, with a profile more akin to the PBS cohort, compared to luteolin and xanthohumol, in terms of modulation of gut ecosystem, appeared to be its reduced bioavailability following IP administration. This assertion was substantiated by the conspicuous presence of apigenin precipitate granules dispersed throughout the mesentery after euthanasia (Supplementary Figure S7). These deposits of apigenin suggested that, in contrast to luteolin and xanthohumol, apigenin experienced limited translocation into the mesentery capillaries, thus preventing its ultimate entry into the gut lumen. This disparity in translocation could likely be attributed to a lower solubility of apigenin, stemming from its chemical structure, wherein it possesses only one hydroxyl group on ring C, in contrast to luteolin, which possesses two.

The primary limitation of this study was mainly related to the timing of euthanasia, which occurred several days after the peak of symptoms in the UC challenge, during the animals' recovery period (day 12). This timing may have avoided the detection of peak concentrations of pro-inflammatory cytokines in plasma and MPO in colon mucosa. Conversely, the study of gut microbiota populations during the symptomatic peak of UC (days 7 to 8) would have rendered a substantially altered composition of the gut microbiota and structural changes in the colon mucosa. During this period, the potential therapeutic effects of the administered flavonoids may have been masked due to factors such as reduced food intake by the animals and significant alterations in the digestive tract caused by the presence of blood.

The main contributions of this work include the detection of a lower bioavailability in the case of apigenin when administered intraperitoneally, probably due to its lower hydrophilicity. Also, there was a strong reduction in IL-6 and IL-1 β cytokines exerted by the flavonoids, and a reduction in the UC-associated weight loss (a symptom caused by the DSS treatment during pathology onset) in the case of luteolin and xanthohumol. At the tissular level, the strong reduction caused by luteolin in the DAI index and colon ulceration is remarkable. Finally, numerous and very significant changes were exerted by luteolin and xanthohumol regarding colon microbiota modulation (a strong increase in some anti-inflammatory populations and a strong reduction in some pro-inflammatory and

commensal taxa), an aspect that is entirely new for this pathology in the case of xanthohumol.

4. Materials and Methods

4.1. Drugs and Chemicals

Dextran Sodium Sulfate (DSS, 40,000 g/mol) was purchased from VWR Chemicals (Madrid, Spain). Apigenin and luteolin were provided by Fluorochem (Dublin, Ireland). Xanthohumol was purified following a modified procedure described previously [65]. The same batch of spent hops, stored in high-density polyethylene (HDPE) industrial barrels and closed under a nitrogen atmosphere, was used. The modification involved only the initial extract preparation step as it was fully completed at the Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Environmental and Life Sciences laboratories. Eighteen kilograms of spent hops were extracted with 90 L of acetone in 0.2 kg:1.4 L batches, each made in a 2-L Erlenmeyer flask shaken for 3 h on a rotary shaker (120 rpm). The formed pulp was vacuum-filtered on Whatman filter paper no. 4 and concentrated using a laboratory rotary evaporator. The combined extracts were further subjected to polyphenol precipitation and Sephadex LH-20 column chromatography steps, resulting in 20.233 g of Xanthohumol (>98% purity by HPLC). The flavonoids were resuspended for injection in Tween 80 and phosphate-buffered saline (PBS) at a stock concentration of 5 mg/mL for apigenin and luteolin and 2.5 mg/mL for xanthohumol.

4.2. Animals

A total of 40 five-week-old male Fischer 344 rats (*Rattus norvegicus*), were maintained in the Animal Facilities at the University of Oviedo (authorized facility No. ES330440003591). All animal experiments were approved by the Ethics Committee of the Principality of Asturias (authorization code PROAE 29/2021).

The rats were provided by Charles River (Lyon, France). Sterile drinking water and standard pelleted feed (Teklad Irradiated Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet) (Envigo, Gannat, France) were provided ad libitum. The animals were housed in a room under controlled temperature (21 °C) and humidity and 12 h light/darkness cycles.

4.3. Experimental Design

After being acclimated for 1 week, the animals were randomized into four cohorts of 10 animals each, according to the administered treatment. These animals were intraperitoneally injected with PBS (cohort 1, negative control) or the corresponding flavonoid treatment (10 mg/kg of body weight): apigenin (cohort 2), luteolin (cohort 3), or xanthohumol (cohort 4). The IP injections were administered daily since the start of the experiment and for a period of eleven days.

Eight rats from each experimental group underwent UC induction through the addition of 3% DSS to the autoclaved drinking water, which was administered ad libitum from the initiation of the experiment and for one week. The remaining two animals from each group served as absolute healthy control animals and were not subjected to UC induction. These absolute control animals were utilized as sentinels to assess the effects of the treatment compounds (flavonoids) on healthy animals and to detect any possible side (negative) effects.

On day twelve, the animals were anesthetized (with isoflurane) (Zoetis, Madrid, Spain) and sacrificed (via pneumothorax). Two rats, designated as rat number 6 within the luteolin-treated cohort and rat number 3 within the xanthohumol-treated cohort, necessitated euthanasia on days eight and nine of the experiment, respectively, due to severe weight loss conditions.

The parameters that were monitored daily during the whole experiment included body weight,

food and water intake, stool consistency, and rectal bleeding.

4.4. Tissue Sample Collection

After euthanasia, 2 mL of blood was extracted via heart puncture from each animal and centrifuged at 3000 rpm for 15 min and then, the plasmas were frozen. The small intestine was removed, and then, the hyperplastic Peyer's patches were macroscopically quantified. The caecums were immediately weighed after extraction using a precision scale and then frozen at -20°C . Finally, the colons were removed, opened longitudinally, and washed with PBS (VWR, Madrid, Spain) in order to macroscopically assess the length and ulceration status. Also, proximal and distant samples from colons were collected and frozen at -80°C .

4.5. Histological Studies

The hyperplastic Peyer's patches were counted along each small intestine. Their number in the experimental animals was compared with respect to the hyperplastic Peyer's patches of the 2 absolute control animals from each cohort (animals 9 and 10).

The percentage of colon length reduction in the UC animals was compared with respect to the colon length of the 2 control (healthy) animals from each cohort.

Regarding the macroscopic score assessment of UC, this parameter was quantified as follows: 0—no symptoms; 1—local hyperemia but no ulceration; 2—ulceration without hyperemia; 3—ulceration and inflammation in only one site; 4—two or more ulceration and inflammation sites; 5—ulceration bigger than 2 cm; values 6 to 1—one score point per each 1 cm of extra ulceration [66].

4.6. Assessment of the Disease Activity Index (DAI)

In order to quantify the clinical evolution of the UC, the Disease Activity Index (DAI) [66] was used. This index is a numerical disease activity measurement comprising the sum of two parameters: changes in growth rate (0: more than 5% body weight gain; 1: less than 5% body weight gain and less than 5% body weight loss; 2: 5 to 10% body weight loss; 3: 10 to 20% body weight loss; 4: more than 20% body weight loss), and stool consistency score (0: normal feces; 1: loose stool; 2: watery diarrhea; 3: slimy diarrhea with little blood; 4: severe watery diarrhea with blood).

4.7. Pro-Inflammatory Cytokine Analysis in Plasma

IL-1 β and IL-6 tests were performed in plasma samples, using commercial Rat IL-1 β and IL-6 ELISA Kits (Diacclone, Besançon, France) and following the manufacturer's instructions.

4.8. Myeloperoxidase (MPO) Assays

A 0.5-cm longitudinal section from each distal colon was excised, and this pro-inflammatory enzyme was quantified following a published protocol [66].

4.9. 16S rRNA Sequencing and Gut Microbiota Analysis

A metagenomics analysis of the stool samples, obtained from the caecums, was also performed. For this, the Pathogen Detection Protocol from the E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit (VWR, Madrid, Spain) was used. Caecums were thawed on ice for 30 min, and then, 200 mg of feces from a middle section of each caecum were placed in a 25-mL tube to continue with the extraction protocol. Finally, 200 μL of genomic DNA were obtained and quantified using a BioPhotometer[®] (Eppendorf, Madrid, Spain). The total DNA samples were frozen at -20°C in order to be subsequently analyzed via the

amplification and sequencing of the variable regions V3 and V4 of the 16S ribosomal RNA gene using Illumina MiSeq (Microomics Systems, Barcelona, Spain). Amplification was performed after 25 PCR cycles. A negative control of the DNA extraction as well as a positive Mock Community control were included to ensure quality control. These studies allowed us to describe and quantify microbial alpha and beta diversities, as well as the taxonomic profiles from phylum to species levels.

4.10. Microbiota Analysis

Phylotype data were used to calculate the alpha diversity metrics in order to analyze the diversity of microbial communities. Alpha diversity analysis was used to measure the community richness (observed Operating Taxonomic Units or OTUs), defined as the number of different phylotypes present in a community. Alpha diversity was also used to measure the community evenness, given as the Pielou's evenness index, which quantifies how equal the community is numerically, taking into account the number and the abundance of phylotypes in a community. The Chao1 (species richness), Simpson (level of biodiversity), and Shannon (species diversity) indices were also calculated.

Phylotype and phylogenetic data were used to calculate the beta diversity metrics in order to assess the microbial community's structure. A principal coordinate analysis (PCoA) was performed, based on unweighted Unifrac distance, a phylogenetic qualitative measure, in order to detect differences in beta diversity.

4.11. Statistical Methods

For the metataxonomics analysis, alpha diversity comparisons were performed using a linear model with the appropriate distribution (negative binomial model for Chao1, beta regression for Simpson, and linear model for Shannon). Beta diversity distance matrices were used to calculate PCoA and to make ordination plots using the R software package version 4.2.0. The significance of the groups present in the community structure was tested using the Permanova test. The differential relative abundance of taxa was tested using a linear model based on the negative binomial distribution and ANOVA. Biodiversity R version 2.14-1, PMCMRplus version 1.9.4, RVAideMemoire version 0.9-8, and Vegan version 2.5-6 packages were used for the different statistical analyses carried out.

For the rest of the comparisons, outliers have been identified and excluded from the statistical analyses. The normality of the different variables was tested using Shapiro–Wilk's test. In light of these results, the data were then expressed as the mean value \pm standard error of the mean (S.E.M.), and parametric methods were used for statistical analyses. Differences between cohorts were tested by a one-way ANOVA (analysis of variance). When the quantitative data were not normal, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used. The graphic representation was carried out using GraphPad Prism software (version 9, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In each case, a p-value < 0.05 was considered statistically significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25063236/s1>.

Author Contributions: Investigation, P.M.-C., Á.P.-V., and S.Y.; Resources, S.S., J.P., and E.H.; Supervision, F.L. and C.J.V.; Writing—original draft preparation, P.M.-C.; Writing—review and editing, F.L.; Funding acquisition, F.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Principado de Asturias (Spain) through the program “Ayudas a organismos públicos para apoyar las actividades de I+D+I de sus grupos de investigación” (grant

AYUD/2021/51347), “Programa Severo Ochoa de Ayudas Predoctorales para la investigación y docencia” from Principado de Asturias (grant PA-20-PF-BP19-058 to P.M.-C. and grant PA-21-PF-BP20-150 to Á.P.-V.), the research project PID2021-127812OB-I00 from MICINN (Spanish Ministry of Science and Innovation), and the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Program under Grant Agreement no. 814650 for the project SynBio4Flav.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the Principality of Asturias (protocol code PROAE 29/2021, 29 October 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Publicly available datasets (metagenome sequences) were analyzed in this study. These data can be found in the NCBI SRA database with accession number PRJNA1068569.

Acknowledgments: The authors wish to thank the University of Oviedo Animal Facility Unit (Servicios Científico-Técnicos, SCTs).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of this study, the collection, analyses, or interpretation of the data, the writing of the manuscript, or the decision to publish the results.

References

- Li, B.; Du, P.; Du, Y.; Zhao, D.; Cai, Y.; Yang, Q.; Guo, Z. Luteolin Alleviates Inflammation and Modulates Gut Microbiota in Ulcerative Colitis Rats. *Life Sci.* **2021**, *269*, 119008. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Souza, H.S.P.; Fiocchi, C.; Iliopoulos, D. The IBD Interactome: An Integrated View of Aetiology, Pathogenesis and Therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 739–749. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Carding, S.; Verbeke, K.; Vipond, D.T.; Corfe, B.M.; Owen, L.J. Dysbiosis of the Gut Microbiota in Disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 26191. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mosca, A.; Leclerc, M.; Hugot, J.P. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 455. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Oligschlaeger, Y.; Yadati, T.; Houben, T.; Condello Oliván, C.M.; Shiri-Sverdlov, R. Inflammatory Bowel Disease: A Stressed “Gut/Feeling”. *Cells* **2019**, *8*, 659. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hirano, A.; Umeno, J.; Okamoto, Y.; Shibata, H.; Ogura, Y.; Moriyama, T.; Torisu, T.; Fujioka, S.; Fuyuno, Y.; Kawarabayasi, Y.; et al. Comparison of the Microbial Community Structure between Inflamed and Non-inflamed Sites in Patients with Ulcerative Colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *33*, 1590–1597. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nishino, K.; Nishida, A.; Inoue, R.; Kawada, Y.; Ohno, M.; Sakai, S.; Inatomi, O.; Bamba, S.; Sugimoto, M.; Kawahara, M.; et al. Analysis of Endoscopic Brush Samples Identified Mucosa-Associated Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 95–106. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Atreya, R.; Neurath, M.F. Involvement of IL-6 in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2005**, *28*, 187–196. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Eastaff-Leung, N.; Mabarrack, N.; Barbour, A.; Cummins, A.; Barry, S. Foxp3+ Regulatory T Cells, Th17 Effector Cells, and Cytokine Environment in Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Immunol.* **2010**, *30*, 80–89. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Liso, M.; Verna, G.; Cavalcanti, E.; De Santis, S.; Armentano, R.; Tafaro, A.; Lippolis, A.; Campiglia, P.; Gasbarrini, A.; Mastronardi, M.; et al. Interleukin 1 β Blockade Reduces Intestinal Inflammation in a Murine Model of Tumor Necrosis Factor-Independent Ulcerative Colitis. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *14*, 151–171. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Shahini, A.; Shahini, A. Role of Interleukin-6-Mediated Inflammation in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Focus on the Available Therapeutic Approaches and Gut Microbiome. *J. Cell Commun. Signal* **2023**, *17*, 55–74. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- Lee, M.; Chang, E.B. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology* **2021**, *160*, 524–537. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

13. Himmel, M.E.; Yao, Y.; Orban, P.C.; Steiner, T.S.; Levings, M.K. Regulatory T-cell Therapy for Inflammatory Bowel Disease: More Questions than Answers. *Immunology* **2012**, *136*, 115–122. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Jochum, L.; Stecher, B. Label. or Concept—What Is a Pathobiont? *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 789–792. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ahmad, M.S.; Krishnan, S.; Ramakrishna, B.S.; Mathan, M.; Pulimood, A.B.; Murthy, S.N. Butyrate and Glucose Metabolism by Colonocytes in Experimental Colitis in Mice. *Gut* **2000**, *46*, 493–499. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Belzer, C.; Chia, L.W.; Aalvink, S.; Chamlagain, B.; Piironen, V.; Knol, J.; de Vos, W.M. Microbial Metabolic Networks at the Mucus Layer Lead to Diet-Independent Butyrate and Vitamin B 12 Production by Intestinal Symbionts. *mBio* **2017**, *8*, e00770-17. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Macfarlane, S.; Macfarlane, G.T. Regulation of Short-Chain Fatty Acid Production. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 67–72. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhao, H.; Cheng, N.; Zhou, W.; Chen, S.; Wang, Q.; Gao, H.; Xue, X.; Wu, L.; Cao, W. Honey Polyphenols Ameliorate DSS-Induced Ulcerative Colitis via Modulating Gut Microbiota in Rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, e1900638. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Fernández, J.; Silván, B.; Entrialgo-Cadierno, R.; Villar, C.J.; Capasso, R.; Uranga, J.A.; Lombó, F.; Abalo, R. Antiproliferative and Palliative Activity of Flavonoids in Colorectal Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *143*, 112241. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Fu, R.; Wang, L.; Meng, Y.; Xue, W.; Liang, J.; Peng, Z.; Meng, J.; Zhang, M. Apigenin Remodels the Gut Microbiota to Ameliorate Ulcerative Colitis. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 1062961. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Ai, X.-Y.; Qin, Y.; Liu, H.-J.; Cui, Z.-H.; Li, M.; Yang, J.-H.; Zhong, W.-L.; Liu, Y.-R.; Chen, S.; Sun, T.; et al. Apigenin Inhibits Colonic Inflammation and Tumorigenesis by Suppressing STAT3-NF-KB Signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 100216–100226. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Xue, L.; Jin, X.; Ji, T.; Li, R.; Zhuge, X.; Xu, F.; Quan, Z.; Tong, H.; Yu, W. Luteolin Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice via Suppressing Macrophage Activation and Chemotaxis. *Int. Immunopharmacol.* **2023**, *124*, 110996. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cho, J.-M.; Yun, S.-M.; Choi, Y.-H.; Heo, J.; Kim, N.-J.; Kim, S.-H.; Kim, E.-H. Xanthohumol Prevents Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis via Inhibition of IKK β /NF-KB Signaling in Mice. *Oncotarget* **2018**, *9*, 866–880. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Braune, A.; Gutschow, M.; Engst, W.; Blaut, M. Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium Ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5558–5567. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Al Shoyaib, A.; Archie, S.R.; Karamyan, V.T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should It Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm. Res.* **2020**, *37*, 12. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Makarewicz, M.; Drożdż, I.; Tarko, T.; Duda-Chodak, A. The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. *Antioxidants* **2021**, *10*, 188. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ozdal, T.; Sela, D.A.; Xiao, J.; Boyacioglu, D.; Chen, F.; Capanoglu, E. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients* **2016**, *8*, 78. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fernández, J.; García, L.; Monte, J.; Villar, C.; Lombó, F. Functional Anthocyanin-Rich Sausages Diminish Colorectal Cancer in an Animal Model and Reduce Pro-Inflammatory Bacteria in the Intestinal Microbiota. *Genes* **2018**, *9*, 133. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Chan, S.-T.; Lin, Y.-C.; Chuang, C.-H.; Shiau, R.-J.; Liao, J.-W.; Yeh, S.-L. Oral and Intraperitoneal Administration of Quercetin Decreased Lymphocyte DNA Damage and Plasma Lipid Peroxidation Induced by TSA In Vivo. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 580626. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Marín, L.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 905215. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Zieniuk, B. Dihydrocaffeic Acid—Is It the Less Known but Equally Valuable Phenolic Acid? *Biomolecules* **2023**, *13*, 859. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Li, H.; Christman, L.M.; Li, R.; Gu, L. Synergic Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota in Mitigating Inflammatory Bowel Diseases. *Food Funct.* **2020**, *11*, 4878–4891. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Nishihara, Y.; Ogino, H.; Tanaka, M.; Ihara, E.; Fukaura, K.; Nishioka, K.; Chinen, T.; Tanaka, Y.; Nakayama, J.; Kang, D.; et al. Mucosa-Associated Gut Microbiota Reflects Clinical Course of Ulcerative Colitis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13743. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

34. Qiu, P.; Ishimoto, T.; Fu, L.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Liu, Y. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 733992. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Cui, L.; Guan, X.; Ding, W.; Luo, Y.; Wang, W.; Bu, W.; Song, J.; Tan, X.; Sun, E.; Ning, Q.; et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi Polysaccharide Ameliorates DSS-Induced Ulcerative Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Modulating Gut Microbiota. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *166*, 1035–1045. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Gophna, U.; Sommerfeld, K.; Gophna, S.; Doolittle, W.F.; Veldhuyzen van Zanten, S.J.O. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 4136–4141. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Shang, L.; Liu, H.; Yu, H.; Chen, M.; Yang, T.; Zeng, X.; Qiao, S. Core Altered Microorganisms in Colitis Mouse Model: A Comprehensive Time-Point and Fecal Microbiota Transplantation Analysis. *Antibiotics* **2021**, *10*, 643. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Bajer, L.; Kverka, M.; Kostovcik, M.; Macinga, P.; Dvorak, J.; Stehlikova, Z.; Brezina, J.; Wohl, P.; Spicak, J.; Drastich, P. Distinct Gut Microbiota Profiles in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 4548. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Zou, J.; Shen, Y.; Chen, M.; Zhang, Z.; Xiao, S.; Liu, C.; Wan, Y.; Yang, L.; Jiang, S.; Shang, E.; et al. Lizhong Decoction Ameliorates Ulcerative Colitis in Mice via Modulating Gut Microbiota and Its Metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 5999–6012. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wang, H.; Zhang, M.; Wen, X.; He, L.; Zhang, M.; Zhang, J.; Yang, X. Cepharanthine Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-induced Colitis through Modulating Gut Microbiota. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15*, 2208–2222. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Chen, Y.; Wu, H.; Wu, S.; Lu, N.; Wang, Y.; Liu, H.; Dong, L.; Liu, T.; Shen, X. *Parasutterella*, in Association with Irritable Bowel Syndrome and Intestinal Chronic Inflammation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *33*, 1844–1852. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Li, W.; Cheng, F.; Zhang, J.; Li, C.; Yu, D.; Simayijiang, H.; Liu, H.; Li, S.; Yan, J. Changes in Gut Microbiota and Metabolites in Papillary Thyroid Carcinoma Patients Following Radioactive Iodine Therapy. *Int. J. Gen. Med.* **2023**, *16*, 4453–4464. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Yu, Z.; Xiaojia, L.; Wei, Z.; Jian, Z.; Aiting, W.; Jing, W.; Lin, Y.; Bangwei, C.; Dan, Y. Baicalin Circumvents Anti-PD-1 Resistance by Regulating the Gut Microbiota Metabolite Short-Chain Fatty Acids. *Pharmacol. Res.* **2024**, *199*, 107033. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Rodríguez-Daza, M.-C.; Roquim, M.; Dudonné, S.; Pilon, G.; Levy, E.; Marette, A.; Roy, D.; Desjardins, Y. Berry Polyphenols and Fibers Modulate Distinct Microbial Metabolic Functions and Gut Microbiota Enterotype-Like Clustering in Obese Mice. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2032. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
45. Taladrí, D.; Zorraquín-Peña, I.; Molinero, N.; Silva, M.; Manceñido, N.; Pajares, R.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. Polyphenols and Ulcerative Colitis: An Exploratory Study of the Effects of Red Wine Consumption on Gut and Oral Microbiome in Active-Phase Patients. *Mol. Nutr. Food Res.* **2022**, *66*, e2101073. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Chen, L.; Li, X.; Gu, Q. Chimonanthus salicifolius Extract Alleviates DSS-induced Colitis and Regulates Gut Microbiota in Mice. *Food Sci. Nutr.* **2023**, *11*, 3019–3030. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Rowan, F.E.; Docherty, N.G.; Coffey, J.C.; O'Connell, P.R. Sulphate-Reducing Bacteria and Hydrogen Sulphide in the Aetiology of Ulcerative Colitis. *Br. J. Surg.* **2009**, *96*, 151–158. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Parker, B.J.; Wearsch, P.A.; Veloo, A.C.M.; Rodríguez-Palacios, A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria with Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 906. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Feng, Z.; Long, W.; Hao, B.; Ding, D.; Ma, X.; Zhao, L.; Pang, X. A Human Stool-Derived *Bilophila wadsworthia* Strain Caused Systemic Inflammation in Specific-Pathogen-Free Mice. *Gut Pathog.* **2017**, *9*, 59. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Wang, M.; Zhou, B.; Cong, W.; Zhang, M.; Li, Z.; Li, Y.; Liang, S.; Chen, K.; Yang, D.; Wu, Z. Amelioration of AOM/DSS-Induced Murine Colitis-Associated Cancer by Evodiamine Intervention Is Primarily Associated with Gut Microbiota-Metabolism-Inflammatory Signaling Axis. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 797605. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Delday, M.; Mulder, I.; Logan, E.T.; Grant, G. *Bacteroides Thetaiotaomicron* Ameliorates Colon Inflammation in Preclinical Models of Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2019**, *25*, 85–96. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. Yoshida, N.; Emoto, T.; Yamashita, T.; Watanabe, H.; Hayashi, T.; Tabata, T.; Hoshi, N.; Hatano, N.; Ozawa, G.; Sasaki, N.; et al. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation* **2018**, *138*, 2486–2498. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

53. He, X.; Bai, Y.; Zhou, H.; Wu, K. *Akkermansia muciniphila* Alters Gut Microbiota and Immune System to Improve Cardiovascular Diseases in Murine Model. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 6920. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Zheng, M.; Han, R.; Yuan, Y.; Xing, Y.; Zhang, W.; Sun, Z.; Liu, Y.; Li, J.; Mao, T. The Role of *Akkermansia muciniphila* in Inflammatory Bowel Disease: Current Knowledge and Perspectives. *Front. Immunol.* **2023**, *13*, 1089600. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
55. Xue, L.; Zhao, Y.; Wang, H.; Li, Z.; Wu, T.; Liu, R.; Sui, W.; Zhang, M. The Effects of Live and Pasteurized *Akkermansia muciniphila* on DSS-Induced Ulcerative Colitis, Gut Microbiota, and Metabolomics in Mice. *Food Funct.* **2023**, *14*, 4632–4646. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Xu, Y.; Wang, N.; Tan, H.-Y.; Li, S.; Zhang, C.; Feng, Y. Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions with Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 219. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
57. Liu, X.; Mao, B.; Gu, J.; Wu, J.; Cui, S.; Wang, G.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. *Blautia*—A New Functional Genus with Potential Probiotic Properties? *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1875796. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Hall, A.B.; Yassour, M.; Sauk, J.; Garner, A.; Jiang, X.; Arthur, T.; Lagoudas, G.K.; Vatanen, T.; Fornelos, N.; Wilson, R.; et al. A Novel *Ruminococcus Gnavus* Clade Enriched in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Genome Med.* **2017**, *9*, 103. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Ćesić, D.; Lugović Mihić, L.; Ozretić, P.; Lojkić, I.; Buljan, M.; Šitum, M.; Zovak, M.; Vidović, D.; Mijić, A.; Galić, N.; et al. Association of Gut *Lachnospiraceae* and Chronic Spontaneous Urticaria. *Life* **2023**, *13*, 1280. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Lobionda, S.; Sittipo, P.; Kwon, H.Y.; Lee, Y.K. The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. *Microorganisms* **2019**, *7*, 271. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Vacca, M.; Celano, G.; Calabrese, F.M.; Portincasa, P.; Gobbetti, M.; De Angelis, M. The Controversial Role of Human Gut *Lachnospiraceae*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 573. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Zhang, K.; Zhu, L.; Zhong, Y.; Xu, L.; Lang, C.; Chen, J.; Yan, F.; Li, J.; Qiu, J.; Chen, Y.; et al. Prodrug Integrated Envelope on Probiotics to Enhance Target Therapy for Ulcerative Colitis. *Adv. Sci.* **2023**, *10*, 2205422. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
63. Xia, T.; Duan, W.; Zhang, Z.; Li, S.; Zhao, Y.; Geng, B.; Zheng, Y.; Yu, J.; Wang, M. Polyphenol-Rich Vinegar Extract Regulates Intestinal Microbiota and Immunity and Prevents Alcohol-Induced Inflammation in Mice. *Food Res. Int.* **2021**, *140*, 110064. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
64. Puupponen-Pimia, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kahkonen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.-M. Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds from Berries. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 494–507. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
65. Nowak, B.; Poźniak, B.; Popłoński, J.; Bobak, Ł.; Matuszewska, A.; Kwiatkowska, J.; Dziewiszek, W.; Huszcza, E.; Szeląg, A. Pharmacokinetics of Xanthohumol in Rats of Both Sexes after Oral and Intravenous Administration of Pure Xanthohumol and Prenylflavonoid Extract. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2020**, *29*, 1101–1109. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
66. Fernández, J.; de la Fuente, V.G.; García, M.T.F.; Sánchez, J.G.; Redondo, B.I.; Villar, C.J.; Lombó, F. A Diet Based on Cured Acorn-Fed Ham with Oleic Acid Content Promotes Anti-Inflammatory Gut Microbiota and Prevents Ulcerative Colitis in an Animal Model. *Lipids Health Dis.* **2020**, *19*, 28. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DISCUSIÓN

Los flavonoides son compuestos polifenólicos derivados de plantas y reconocidos por sus múltiples propiedades bioactivas. A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral se han expuesto las amplias y variadas aplicaciones terapéuticas en humanos (como antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, inmunomoduladores, cardioprotectores, etc.) de la gran diversidad de flavonoides existentes. Más específicamente, las hidroxilaciones representan las modificaciones más comunes para la diversificación de los flavonoides, incrementando su solubilidad y estabilidad metabólica. Dependiendo del número y la posición de los grupos hidroxilo, estas modificaciones pueden mejorar significativamente las propiedades biológicas de los flavonoides como compuestos antioxidantes y antiinflamatorios (Chu et al., 2016; Das et al., 2021; Lv et al., 2019). En particular, la presencia del grupo catecol (dos grupos hidroxilo en posiciones *meta* y *para*) en el anillo B de los flavonoides confiere una marcada actividad antiinflamatoria (Ginwala et al., 2019), constituyendo ejemplos de flavonoides que contienen este grupo catecol, el eriodictiol, la taxifolina o la luteolina.

El análisis del potencial antiinflamatorio de los flavonoides adquiere una relevancia adicional, considerando la significativa participación del proceso inflamatorio crónico en el desarrollo y avance de diversas enfermedades. Recientemente, las investigaciones relacionadas con la interacción entre el microbioma y las enfermedades inflamatorias han experimentado un notable crecimiento, dado el papel crucial de la microbiota intestinal en la regulación del sistema inmunitario y su interconexión con multitud de órganos del cuerpo humano, incluyendo los ejes intestino-cerebro, intestino-piel, intestino-pulmón o intestino-hígado. En este contexto, se ha observado que los flavonoides poseen la capacidad de modular la composición de la microbiota intestinal, estableciéndose además una relación recíproca entre ambas entidades. Por consiguiente, los flavonoides son capaces de ejercer efectos antiinflamatorios a través de diversas vías de acción.

El valor de mercado de los flavonoides es dependiente del logro de unos niveles de producción adecuados, predecibles, precisos en cuanto al tipo de flavonoide y económicamente viables. El género *Streptomyces* ha sido objeto de estudio como hospedador para la expresión heteróloga de estos metabolitos secundarios, destacando sus sistemas de secreción y su capacidad para producir una amplia gama de precursores en común con las rutas de biosíntesis de flavonoides, gracias a su capacidad intrínseca para expresar diversos tipos de BGCs. Más en concreto, la especie *S. albidoflavus* J1074 muestra propiedades adicionales de cara a su manipulación en laboratorio como hospedador heterólogo, incluyendo la ausencia del sistema *SaII* de R/M, su genoma reducido o sus características de crecimiento. Sin embargo, hasta el momento, los rendimientos de producción heteróloga de flavonoides en esta especie se han mantenido notablemente bajos, presumiblemente debido a la disponibilidad limitada de precursores y cofactores, destinados a la biosíntesis de compuestos nativos, y/o a la falta de optimización a nivel enzimático y de ruta de los genes heterológamente expresados. Además, la falta de estandarización de las herramientas de ingeniería genética para la expresión génica y edición del genoma de uso en este género ha ralentizado los avances en este campo.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad de *S. albidoflavus* J1074 como hospedador heterólogo para la expresión de rutas biosintéticas de producción de varios tipos de flavonoides, así como la efectividad de varias estrategias de optimización de la producción. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de una librería de vectores que permiten la estandarización en el ensamblaje *in vitro* para la edición genómica del hospedador y la expresión génica de rutas de producción de estos compuestos, y cuyas aplicaciones son extensibles a su uso en otros actinomicetos. Adicionalmente, con el fin de estudiar el potencial antiinflamatorio y modulador de la microbiota intestinal de los flavonoides, se ha realizado un estudio *in vivo* en un modelo murino de colitis ulcerosa, una enfermedad inflamatoria intestinal muy frecuente en la Unión Europea.

1. *Desarrollo y aplicación práctica de una librería de vectores bifuncionales E. coli/Streptomyces, basada en la arquitectura SEVA, para su uso en actinomicetos*

La demanda de un mayor número de herramientas de ingeniería genética aplicables en actinomicetos, así como la necesidad de que el uso de éstas sea universal, ha conducido al desarrollo de una colección de vectores modulares dentro del marco de la arquitectura SEVA. Estos vectores son bifuncionales, lo que permite simplificar el proceso de clonación, llevado a cabo en *E. coli*, mientras que el hospedador final para la expresión génica es *Streptomyces* spp. Sus módulos intercambiables y las partes genéticas disponibles permiten adaptar los vectores a las necesidades específicas de cada momento, para realizar el ensamblaje por GS de las rutas biosintéticas y/o la edición genómica mediante el sistema CRISPR/Cas9. De esta manera, se garantiza la universalidad tanto de los vectores de clonación como del ensamblaje de las partes genéticas.

Para la expresión génica por ensamblaje GS se generaron un total de 28 vectores, todos ellos con el pUC como origen de replicación para *E. coli*, y variando el origen de replicación de *Streptomyces* spp. (siempre integrativo en Φ C31, Φ BT1 o SAM2), el “carga” para el ensamblaje GS, y la resistencia antibiótica. El uso de vectores integrativos (una sola copia presente en el genoma de las cepas generadas) facilita comparaciones precisas de producción entre cepas, evitando al mismo tiempo posibles problemas derivados de los compuestos expresados en vectores replicativos (con número de copias variable de los genes a expresar). Además, el hecho de que la integración sea estable evita el uso mantenido de antibióticos en el medio de cultivo.

Para cada una de las tres integrasas utilizadas en este trabajo (Φ C31, Φ BT1 y pSAM2) se han ensamblado siete vectores por variaciones del módulo “carga”, de modo que cuatro pertenecen a vectores receptores de nivel 1, que permiten ocupar hasta la posición 4 en el nivel 2, y tres pertenecen a niveles 2, para el ensamblaje de hasta cuatro UTs juntas. En ocasiones, los mismos módulos “carga” para el ensamblaje por GS han sido diseñados con la misma integrasa, pero variando la resistencia antibiótica. Esto hace posible poder integrar UTs o circuitos genéticos en cepas que tengan otros vectores ya integrados y sean, por tanto, resistentes a algún antibiótico, quedando este invalidado para la selección de cepas portadoras de los nuevos genes.

A lo largo de los sucesivos trabajos se han generado nuevos vectores que han aumentado esta colección, adaptándola a las necesidades de ensamblaje en *E. coli* y de integración en *Streptomyces* spp. Se ha ampliado la variedad de resistencias antibióticas disponibles, y también se han generado vectores cambiando el origen de replicación de *E. coli* (pUC) por uno de número medio de copias (pBBR1).

La colección de vectores y partes genéticas adaptados a la arquitectura SEVA y al ensamblaje GS desarrollada en este trabajo ha sido utilizada para el ensamblaje y expresión de las rutas biosintéticas de todos los flavonoides recogidos a lo largo de esta tesis. Una ventaja añadida del ensamblaje GS es que permite el ensamblaje de UTs completas de manera sencilla y, por tanto, su expresión monocistónica, ya que cada región codificante se encuentra regulada por su propio promotor, RBS y terminador, permitiendo así un control transcripcional y traduccional individual de cada gen. Como elementos reguladores para el ensamblaje GS, en este trabajo se han diseñado niveles 0 de cuatro promotores con variadas fuerzas de activación transcripcional (*ermE**, SF14, SP25 y SP43), un RBS (SR41) (Bai et al., 2015) y un terminador (*tt_{sbiB}*) (Horbal et al., 2018), siendo estos últimos los más fuertes descritos en cada caso para su uso en *Streptomyces* spp. o actinobacterias en general. Además, el nivel 0 del RBS lleva unido el RiboJ (RiboJ-RBS(SR41)).

En referencia a los vectores para la edición genómica por el sistema CRISPR/Cas9, se generaron un total de 8 vectores CRISPR/Cas9 por variaciones en la resistencia antibiótica y en la nucleasa Cas9 (Cas9 nativa y nicasa). Estos vectores portadores de dos variantes diferentes de la Cas9 permitieron, tras la evaluación de su eficiencia comparada, la determinación de la versión nativa de la Cas9 como la más eficaz de cara a la edición genómica por este sistema en *Streptomyces albidoflavus* J1074, al demostrar una eficiencia de recombinación mayor (90%), en comparación con la versión nicasa (70%).

Uno de estos vectores de edición genómica por CRISPR/Cas9, portador de la endonucleasa Cas9 nativa, se aplicó en esta tesis para llevar a cabo dos ediciones del genoma de *S. albidoflavus* J1074, ya encaminadas al incremento en la producción heteróloga de flavonoides. En primer lugar, se eliminó un *pseudo*-sitio de integración *attB* (pSEB4), muy activo para la integración de vectores utilizando el sistema Φ C31 (Combes et al., 2002). El objetivo de esta delección consistió en evitar diferentes niveles de transcripción de los genes, por su integración en pSEB4 en lugar de en el sitio canónico, así como la duplicación de los genes, por integración en ambos sitios. Esta modificación dio lugar a la cepa nombrada UO-FLAV-001 (**Figura 19**). A continuación, y de manera aditiva, se creó la cepa UO-FLAV-002 por delección de 3 BGCs nativos (antimicinas, candicidinas y una PKS-NRPS), para así minimizar la desviación de precursores cruciales, en concreto el malonil-CoA, hacia otras rutas metabólicas que no contribuyan a la producción del compuesto de interés, pudiendo estos ser redirigidos entonces a la producción de los compuestos codificados por las nuevas rutas heterólogas introducidas. En paralelo, estos BGCs fueron reemplazados por los genes *matB/C* de *R. trifolii*, involucrados en la captación de malonato extracelular y su activación intracelular a malonil-CoA (Leonard et al., 2008) (**Figura 19**). De este modo, tras la adición exógena de malonato al medio de cultivo, esto supondría un aporte extra de malonil-CoA que también podría ser potencialmente redirigido a la biosíntesis de flavonoides.

De forma acumulativa, sobre la cepa de *S. albidoflavus* J1074 UO-FLAV-002, y también a través del uso de los vectores CRISPR/Cas9 de la librería, se realizaron posteriores deleciones de BGCs nativos consumidores de precursores, dando lugar a las cepas editadas UO-FLAV-003, por eliminación del BGC productor de macrolactamas tetramato policíclicas, y UO-FLAV-004, por deleción del BGC de biosíntesis de las paulomicinas (Pérez-Valero et al., 2023) (**Figura 19**). La cepa UO-FLAV-004 fue utilizada en este trabajo para la expresión de rutas de biosíntesis de flavanoles y auronoles.

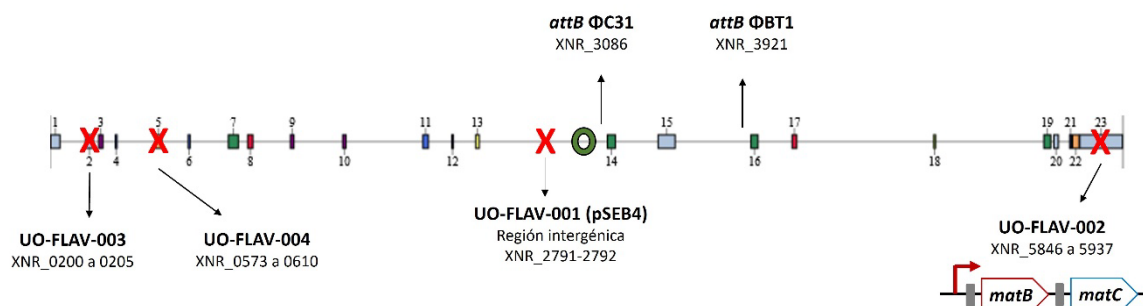


Figura 19. Representación del genoma de *S. albidoflavus* J1074 con la localización de las deleciones/sustituciones realizadas (cruces rojas), y el nombre de la cepa a la que dieron lugar, así como la localización de los sitios de integración ΦC31 y ΦBT1. La numeración hace referencia a la localización de los BGCs predichos por antiSMASH en el genoma. El círculo verde en el centro del genoma corresponde al origen de replicación.

2. Biosíntesis heteróloga de flavanonas, flavanoles y auronoles por *S. albidoflavus* J1074

Una de las ventajas del uso de la librería de vectores, y su adaptación al ensamblaje GS para la expresión génica, tiene que ver con el ahorro que supone, tanto en tiempo como en dinero, en comparación con la adopción de técnicas clásicas. Gracias a estos vectores se hace posible el ensamblaje tanto de las partes genéticas como de las UTs en una única reacción, haciendo uso siempre de la misma combinación de enzimas de restricción de tipo IIS. En contraposición, el uso de enzimas de restricción tipo II obliga a un ensamblaje secuencial fragmento a fragmento, sumando este hecho al número limitado de sitios de restricción existentes en los sitios de clonación múltiple de los vectores.

Las partes genéticas sintetizadas como niveles 0 pueden, además, ser reutilizadas las veces necesarias para dar lugar a múltiples combinaciones de UTs. Por el momento, la variación en el control de la expresión de los genes se realiza únicamente a nivel del promotor. Sin embargo, la librería es siempre susceptible de ser ampliada acorde a las necesidades particulares. Adicionalmente, una misma CDS puede formar parte de rutas de diversificación de diferentes flavonoides, por tanto, las UTs generadas pueden ser también reutilizadas para el ensamblaje combinatorio con otras UTs, dando así lugar a nuevos circuitos genéticos.

De este modo, para reconstruir el BGC capaz de dar lugar a la flavanona naringenina, los niveles 0 tanto de los elementos reguladores como de las cuatro CDSs conformantes de esta ruta de biosíntesis (TAL, 4CL, CHS, CHI), fueron sintetizados y ensamblados por GS en las correspondientes UTs (niveles 1). A continuación, estas cuatro UTs se ensamblaron formando un circuito genético en un vector de GS de nivel

2. Al constituir la naringenina un flavonoide central de estas rutas, su BGC fue integrado de forma estable en el sitio Φ C31 del genoma de *S. albidoflavus* J1074 (*S. albidoflavus* WT-NAR), mientras que las modificaciones posteriores se introdujeron en el sitio Φ BT1 (**Figura 20**). A partir de naringenina, por medio de la integración de una o dos hidroxilasas, se crearon cepas capaces de expresar las rutas biosintéticas de los compuestos eriodictiol, aromadendrina y taxifolina. Más tarde, se ensayó la producción de auronoles por adición de un enzima CHI a las hidroxilasas anteriores, formando parte de un circuito genético de nivel 2 de tres UTs integrado en el sitio Φ BT1.

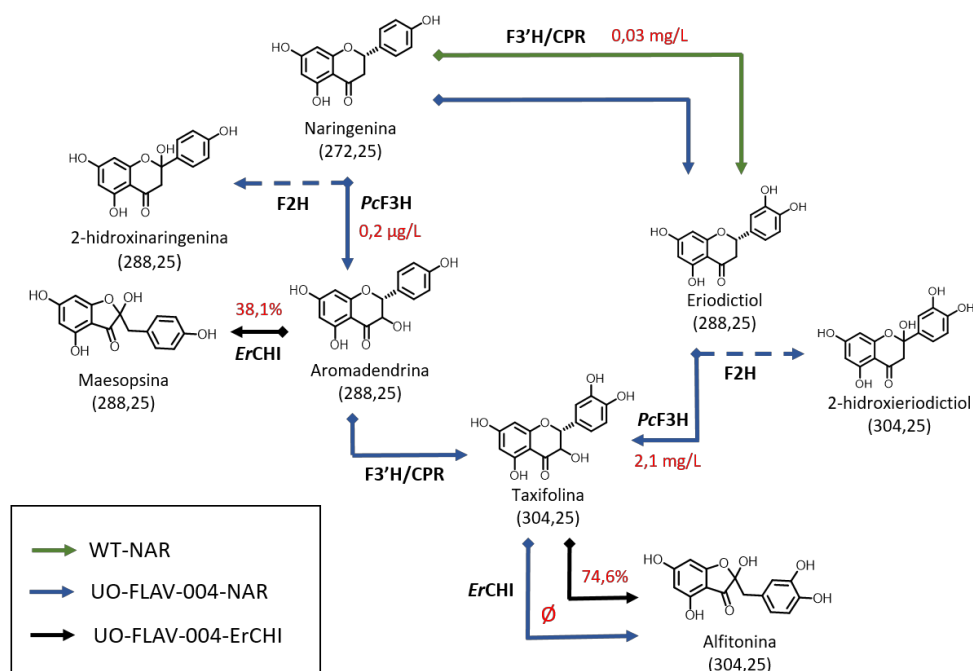
La biosíntesis de varios de los flavonoides generados en esta tesis ya fue conseguida en *S. albidoflavus* J1074 en experimentos previos de nuestro grupo de investigación, sin embargo, los rendimientos observados fueron muy bajos (Marín et al., 2018, 2017). En contraste con los estudios anteriores, en esta ocasión la expresión de los genes ha sido llevada a cabo de forma monocistrónica en lugar de policistrónica, y se han usado vectores integrativos en lugar de replicativos, lo que ha supuesto una ventaja en el aumento en los niveles de producción de dichos flavonoides.

La biosíntesis de la flavanona eriodictiol tiene lugar por medio de la hidroxilación de la naringenina en el C3' del anillo B, catalizada por el enzima F3'H. Haciendo uso de la librería de vectores descrita, se realizó el ensamblaje del enzima quimérico F3'H/CPR en el correspondiente nivel 1, el cual fue integrado en el sitio Φ BT1 de la cepa *S. albidoflavus* WT-NAR (BGC integrado en Φ C31) dando lugar a la cepa *S. albidoflavus* WT-ERI. Tras el cultivo de esta cepa en el medio de cultivo R5A se consiguieron unos niveles de producción de eriodictiol de 0,03 mg/L (**Figura 20**).

Un único enzima, el F3H, cataliza la hidroxilación en el C3 del anillo C para dar lugar al flavanonol aromadendrina desde naringenina. Siguiendo el mismo esquema, este enzima F3H fue ensamblado por GS en el respectivo vector de nivel 1 e integrado de forma independiente en el sitio Φ BT1 de la cepa editada de *S. albidoflavus* J1074 UO-FLAV-004 portadora del BGC de naringenina (*S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR). La cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR es capaz de producir 3,4 mg/L de naringenina, sin embargo, tras el cultivo de la nueva cepa productora de aromadendrina (*S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO) en el medio de cultivo NL333, se observaron unos rendimientos de este flavanonol notablemente bajos (0,2 μ g/L) (**Figura 20**), con gran cantidad del precursor naringenina aún sin consumir. Además, también se observó la producción del derivado 2-hidroxinaringenina, resultado de la actividad secundaria F2H del enzima F3H (Marín et al., 2021).

Por su parte, la taxifolina es producida por hidroxilación de la aromadendrina en el C3' del anillo B por parte del enzima F3'H. Por tanto, para la producción de este flavanonol, los niveles 1 correspondientes a las UTs del enzima F3H, utilizado para la biosíntesis de aromadendrina desde naringenina, y del enzima quimérico F3'H/CPR, utilizado para la producción de eriodictiol desde naringenina, pudieron ser reutilizados y ensamblados en una única reacción para dar lugar a un nivel 2 de GS. Este nuevo nivel 2, conformado por dos UTs, fue integrado en el sitio Φ BT1 de la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR, dando lugar a la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX. El cultivo de esta cepa en NL333 generó unos niveles de taxifolina de 2,1 mg/L (**Figura 20**).

A



B

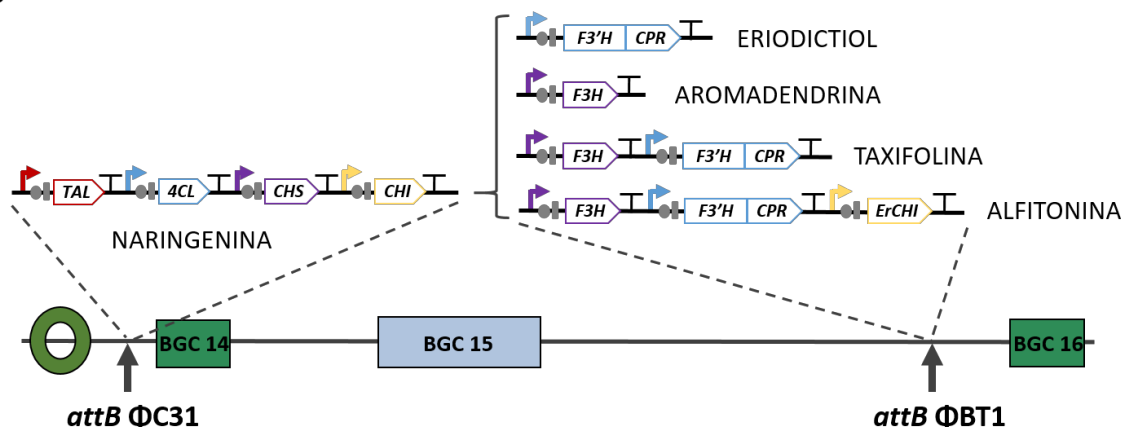


Figura 20. A) Representación de las rutas biosintéticas de las flavanonas, flavanones y auronos generados en este trabajo, así como de las cepas en las que se integraron los genes correspondientes a los enzimas implicados en dichas rutas. La flecha verde hace referencia a la cepa *S. albidoflavus* WT-ERI creada por integración del enzima F3'H/CPR en la cepa *S. albidoflavus* WT-NAR. Las flechas azules indican los diferentes enzimas integrados en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR para dar lugar a las cepas *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO, UO-FLAV-004-PcTAX y UO-FLAV-004-ALPH. La línea discontinua hace referencia a la actividad secundaria F2H del enzima F3H sobre naringenina y eriodictiol. Las flechas negras señalan la suplementación con flavanones a la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ErCHI. En rojo se muestran los niveles de producción obtenidos en cada caso, y entre paréntesis debajo de la figura de cada molécula se indica la masa de cada compuesto. **B)** Esquema del ensamblaje y lugar de integración de los enzimas de las rutas de biosíntesis de cada compuesto generado, en el genoma de *S. albidoflavus* J1074.

Los resultados de este trabajo permitieron establecer la vía preferente para la biosíntesis de taxifolina en *S. albidoflavus* J1074. El nivel de producción de taxifolina obtenido indicó que su conversión no había podido tener lugar a partir de aromadendrina, dados los bajos rendimientos obtenidos de este flavanone, debido a la reducida actividad del enzima F3H. En cambio, los dos enzimas implicados en la producción de taxifolina a partir de naringenina, F3H y F3'H, exhiben flexibilidad de sustrato y son intercambiables en su orden de actuación para dar lugar al mismo producto. Así, los niveles de taxifolina obtenidos fueron

posibles gracias a la gran eficiencia demostrada por el enzima F3'H/CPR en la transformación de naringenina en eriodictiol, sumado a que el enzima F3H demostró una eficiencia catalítica muy superior sobre el eriodictiol (2,1 mg/L, 6,9 μM de taxifolina), con respecto a la observada sobre la naringenina (0,2 $\mu\text{g/L}$, 7×10^{-4} μM de aromadendrina). No obstante, la actividad del enzima F3H tampoco resultó en este caso en un consumo total del precursor eriodictiol.

Avanzando más en la ruta de biosíntesis, a partir de los flavanoles aromadendrina y taxifolina, se estudió en *S. albidoflavus* J1074 la actividad de un enzima CHI proveniente de la bacteria de la microbiota intestinal, *Eubacterium ramulus* (*Er*CHI) (Braune et al., 2016), para la producción heteróloga de auronoles. La cepa productora del auronol alfitonina (*S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH) fue creada por ensamblaje de un nivel 2 de GS a partir de los niveles 1 de tres UTs, las ya ensambladas anteriormente y pertenecientes a las UTs de los enzimas F3H y F3'H/CPR, y el nivel 1 de nueva creación perteneciente a la *Er*CHI. Este nivel 2 con tres UTs fue integrado en el sitio ΦBT1 de la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR (**Figura 20**). Dados los bajos rendimientos obtenidos en la producción *de novo* de aromadendrina, no se consideró útil en este punto la generación de la cepa productora *de novo* de su auronol derivado, la maesopsina.

En este caso, la alta inestabilidad de la alfitonina en las condiciones de cultivo utilizadas, sumado a las características de acción del enzima *Er*CHI, no permitieron la detección de su biosíntesis *de novo* en una única cepa portadora de la ruta completa. Sin embargo, los ensayos realizados para llegar a estas conclusiones permitieron revelar varios aspectos importantes, que resultaron cruciales para comprender las limitaciones y desafíos asociados con la biosíntesis de estos compuestos en nuestro sistema heterólogo.

A pesar de la aparente ausencia de producción de alfitonina observada con la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH, la actividad del enzima *Er*CHI en *S. albidoflavus* J1074 fue confirmada mediante la adición exógena de intermediarios de ruta a una cepa de *S. albidoflavus* J1074 UO-FLAV-004, portadora únicamente del nivel 1 de GS correspondiente a la UT del enzima *Er*CHI (*S. albidoflavus* UO-FLAV-004-*Er*CHI) (**Figura 20**). Esto es algo que ya se sospechaba debido a la completa desaparición de la taxifolina en la cepa productora *de novo* de alfitonina.

Los experimentos de suplementación con flavanoles en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-*Er*CHI proporcionaron otras observaciones interesantes, que pudieron ser aplicadas en experimentos posteriores. Se concluyó que la conversión de los flavanoles en sus respectivos auronoles, por parte del enzima *Er*CHI, tiene lugar de forma inmediata y alcanza su capacidad máxima tras la adición del precursor. Es decir, el enzima responde rápidamente a la presencia del precursor y alcanza en ese momento su máxima eficiencia en la conversión. Tras alcanzar este pico máximo, los auronoles comienzan a degradarse rápidamente en el medio, revelando este hecho una alta inestabilidad. Además, se observó una mayor eficiencia en la actividad del enzima *Er*CHI para la bioconversión de taxifolina a alfitonina (74,6%) que para la bioconversión de aromadendrina a maesopsina (38,1%) (**Figura 20**).

Experimentos de suplementación con el estándar comercial de alfitonina al medio de cultivo NL333 sin células confirmaron su inestabilidad, de modo que, tras solo 4 horas de cultivo, el 80% de la concentración añadida había sido degradada y, tras 24 horas, ya no se observó compuesto alguno. Los múltiples esfuerzos realizados para tratar de estabilizar la alfitonina en cultivo no resultaron efectivos, incluyendo estas variaciones en el medio de cultivo, en los solventes de extracción, la adición de compuestos antioxidantes y cambios en el pH del medio.

En conjunto, el enzima *ErCHI* resulta funcional en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH, siendo capaz de convertir la taxifolina en alfitonina muy rápidamente, sin embargo, la rápida degradación de la alfitonina en cultivo impide su acumulación y detección tras la expresión de la ruta de biosíntesis completa en una única cepa.

Un desafío adicional en la detección de la biosíntesis de auronoles involucró la presencia de la actividad secundaria F2H del enzima F3H. La biosíntesis *de novo* de alfitonina por la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-ALPH fue descartada por la observación de un pico cromatográfico que, aunque coeluyente con el estándar comercial de este compuesto, se encontró también presente en la cepa utilizada como control negativo (*S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX). Múltiples resultados asociarían este pico con el compuesto 2-hidroxieriodictiol, derivado de la actividad F2H sobre el eriodictiol (**Figura 20**), el cual estaría co-eluyendo con la alfitonina tanto en HPLC-DAD como en HPLC-MS, de igual manera que la 2-hidroxinaringenina, derivada de la actividad F2H sobre naringenina, lo hace con la maesopsina.

3. Optimización de la biosíntesis de flavonoides en *S. albidoflavus* J1074

La continua expansión en la generación de nuevos derivados flavonoides, mediante biosíntesis heteróloga, ha resaltado la importancia de la optimización de su producción. Esto implica identificar y abordar los cuellos de botella que restringen la biosíntesis de estos metabolitos secundarios. Dentro de este contexto, la producción heteróloga de flavonoides se ve enfrentada a diversas limitaciones, que están principalmente relacionadas con la disponibilidad de precursores y la expresión de los enzimas involucrados en sus rutas biosintéticas.

3.1. Optimización de las condiciones de fermentación y disponibilidad de precursores

La optimización a nivel de las condiciones de fermentación ha demostrado también ser de gran importancia a lo largo de este trabajo, en concreto, en lo referido al medio y al tiempo de cultivo. El medio de cultivo es un factor fundamental, ya que proporciona los nutrientes esenciales para el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos, constituyendo las fuentes de carbono y nitrógeno las más importantes para la obtención de energía y la biosíntesis de biomoléculas. En este contexto, el ensayo del medio de cultivo NL333 dio lugar a un incremento de 33,3 veces (2 mg/L vs 0,06 mg/L) en la biosíntesis de naringenina, con respecto a los niveles descritos en el medio de cultivo R5A utilizado hasta el momento para la producción de flavonoides. Esto dejó establecido al NL333 como el medio de cultivo a utilizar para todos los experimentos de producción posteriores a esta observación. El almidón, la peptona y el

extracto de levadura han sido descritos en la literatura como las fuentes preferidas de carbono y nitrógeno del género *Streptomyces* para la producción de metabolitos secundarios (Barbuto Ferraiuolo et al., 2021; Souagui et al., 2018). El medio NL333 posee estas tres fuentes, mientras que el medio R5A carece de almidón y peptona, pudiendo ser esta la causa del incremento observado a este nivel.

Por su parte, la relevancia del tiempo de cultivo para la obtención de los niveles óptimos de producción de un determinado compuesto, quedó evidenciada en este trabajo tanto en el caso de la naringenina, en relación con la variación en el medio de cultivo, como en el caso de la taxifolina, en relación con las características específicas de los enzimas empleados. En el primer caso, se observó cómo la misma cepa (*S. albidoflavus* WT-NAR) inoculada en diferentes medios de cultivo alcanzaba sus máximos de producción de naringenina a diferentes tiempos, 5 días en R5A, frente a 2 días en NL333 y TSB. En el segundo caso, la velocidad de acción del enzima, así como la concentración disponible del sustrato para ese enzima, determinaron el tiempo de cultivo que permitió obtener los mejores niveles de producción de taxifolina según la variante del enzima F3H empleada. De esta manera, en las condiciones de cultivo ensayadas, el tiempo óptimo de cultivo que permitió conseguir la máxima producción de taxifolina *de novo* con el enzima F3H procedente de *Petroselinum crispum* (PcF3H) fue de 5 días, mientras con la variante de la F3H originaria de *Camellia sinensis* (CsF3H) fue de 2 días.

Los compuestos como la naringenina no sufren procesos de degradación, manteniéndose estables en el medio de cultivo tras alcanzar sus máximos niveles de producción. Sin embargo, otros flavonoides son inestables en las condiciones de cultivo utilizadas, bien por degradación por parte del microorganismo, o por inestabilidad en el medio de cultivo. El tiempo de cultivo se hace aquí también relevante de cara a mitigar la inestabilidad de compuestos en los que se presente una degradación lenta, como se evidenció en el caso de la taxifolina. Por su parte, resolver la rápida degradación de los auronoles en cultivo resulta considerablemente más desafiante.

El género *Streptomyces* spp. ha sido descrito como un hospedador heterólogo óptimo para la biosíntesis de metabolitos secundarios como los flavonoides, especialmente por su capacidad intrínseca para producir una amplia gama de este tipo de compuestos y, por consiguiente, su gran disponibilidad de precursores en común. Sin embargo, muchos de estos precursores se derivan a la biosíntesis de sus compuestos endógenos, y no a las rutas heterólogas introducidas.

El precursor malonil-CoA es considerado como uno de los principales cuellos de botella para la biosíntesis de flavonoides, al ser necesario incorporar 3 moléculas de este metabolito al tioéster cumaroil-CoA para dar lugar a la chalcona de naringenina, por acción del enzima CHS. Existen varias estrategias descritas para el aumento en este precursor, sin embargo, en este trabajo se ha demostrado que la utilidad de esas estrategias varía dependiendo de las condiciones.

En este contexto, la cepa editada *S. albidoflavus* J1074 UO-FLAV-002, generada a través del uso de la librería de vectores para la edición genómica por el sistema CRISPR/Cas9, fue ensayada para el incremento en la producción de las flavanonas naringenina (*S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR) y

eriodictiol (*S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI) por aumento en la disponibilidad del precursor malonil-CoA. En este contexto, el malonil-CoA se confirmó como factor limitante en el medio R5A para la biosíntesis de ambas flavanonas, obteniéndose un incremento de 4 veces en la producción de naringenina (0,24 mg/L vs 0,06 mg/L) y de 1,6 veces en la producción de eriodictiol (0,05 mg/L vs 0,03 mg/L) con respecto a las cepas silvestres (WT-NAR y WT-ERI, respectivamente), gracias al desvío del malonil-CoA hacia estas rutas por eliminación de los BGCs endógenos competidores.

Por el contrario, utilizando la misma estrategia, el malonil-CoA no constituyó un cuello de botella para la producción de naringenina en el medio NL333. En este medio de cultivo el factor limitante lo estableció la dosis génica, ya que la duplicación del BGC de naringenina sí llevó a un aumento casi de las mismas proporciones en la producción de esta flavanona tanto en la cepa editada (*S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR) (3,21 mg/L vs 1,63 mg/L), tras la eliminación de los 3 BGCs nativos, como en la silvestre (*S. albidoflavus* WT-NARNAR) (3,14 mg/L vs 1,71 mg/L), con la maquinaria nativa completa para la biosíntesis de metabolitos secundarios.

En cuanto a la expresión heteróloga de los genes *matB/C*, la adición de malonato exógeno al medio de cultivo no se vio reflejada en un incremento adicional en la producción de eriodictiol (*S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI) en el medio R5A, indicando que, tras la eliminación de los 3 BGCs consumidores de malonil-CoA, este precursor dejó de ser limitante para la producción heteróloga de eriodictiol en este medio. Sin embargo, el correcto funcionamiento de los genes *matB/C*, y por lo tanto la efectividad de esta estrategia, quedó confirmada cuando, tras la adición de malonato al medio NL333, se observó un incremento de 1,38 veces (4,43 mg/L vs 3,21 mg/L) en la producción de naringenina, pero únicamente tras la duplicación de la dosis génica (*S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR), señalando esto que el aumento de dosis génica convirtió al malonil-CoA en limitante para la producción de naringenina en este medio.

La lógica detrás de estas variaciones observadas en base al medio de cultivo utilizado, en cuanto a la disponibilidad de malonil-CoA y al incremento en la producción de naringenina mencionado anteriormente, estaría relacionada con el hecho de que cada medio supone unas condiciones particulares para el organismo, por lo que los cambios a este nivel influyen en la disponibilidad de precursores, en las redes de regulación de BGCs nativos y, en general, en el equilibrio metabólico del organismo cultivado.

Como se ha visto con el malonil-CoA, el incremento en la disponibilidad de sustratos específicos en el entorno celular hace posible el estímulo en la producción del metabolito deseado. En el mismo contexto, el ácido *p*-cumárico y la L-tirosina han sido identificados como los principales cuellos de botella para la biosíntesis de naringenina en *S. albidoflavus* J1074, observándose, además, que las mejoras en la producción tras la adición de estos precursores a la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR están altamente influenciadas por la dosis empleada y el tiempo de cultivo.

En particular, los niveles máximos de producción de naringenina utilizando el ácido *p*-cumárico como precursor (18,68 mg/L) se alcanzaron utilizando una concentración de 0,5 mM y tras 96 horas de cultivo,

lo cual supuso un incremento de 5,8 veces en la producción de naringenina con respecto a la cepa sin suplementación. En cambio, los niveles máximos tras la adición de L-tirosina (15,55 mg/L) se lograron a una concentración de 2 mM tras un mayor tiempo de cultivo, 144 horas, suponiendo un incremento de 4,8 veces en la producción de naringenina. El retraso en el alcance del tiempo óptimo de cultivo tras la adición de L-tirosina, en comparación con la del ácido *p*-cumárico, se debe, probablemente, a que la conversión de L-tirosina en naringenina implica la acción de un enzima adicional, la TAL. Este hecho vuelve así a destacar la relevancia de la optimización del tiempo de cultivo en el logro de los máximos niveles de producción.

Por el contrario, no se observó un incremento en la producción de naringenina tras la adición de L-fenilalanina al medio, presumiblemente debido a que este aminoácido podría estar siendo derivado a otras rutas en *S. albidoflavus* J1074. El incremento esperado derivaría de un aumento indirecto en la concentración intracelular de L-tirosina, debido a la retroalimentación negativa que la L-fenilalanina ejerce sobre su propia biosíntesis (Speedie y Park, 1980).

Los estudios realizados durante el transcurso de esta investigación ratifican la eficacia del empleo de la suplementación con precursores, y/o intermediarios de ruta, como una herramienta de gran utilidad práctica. Este enfoque no solo permite identificar factores limitantes en la biosíntesis de compuestos específicos, como se evidenció en el caso de la naringenina, sino que también facilita la elucidación de potenciales actividades enzimáticas sobre un sustrato, como en el caso de la *Er*CHI. Además, proporciona información relevante sobre las cinéticas enzimáticas, que han sido aplicables tanto en el contexto del enzima *Er*CHI, como con las variantes del enzima F3H. Asimismo, este enfoque revela características distintivas de ciertos compuestos, como es el caso de los auronoles.

Finalmente, se pudo concluir que la adición del inhibidor específico cerulenina, para el aumento en la producción de naringenina por aumento en la disponibilidad de malonil-CoA, no resulta de utilidad en *Streptomyces* spp. como productor heterólogo de flavonoides, sino todo lo contrario. Este efecto se podría atribuir a la capacidad de la cerulenina de inhibir las PKSs, como se ha descrito previamente en *S. griseus* (Martin y McDaniel, 1975). La CHS del BGC de naringenina es una PKS tipo III, por tanto, la cerulenina podría estar actuando sobre este enzima, implicado en las rutas de biosíntesis de flavonoides, inhibiendo la biosíntesis de naringenina.

En conjunto, la aplicación de un enfoque multifacético a través de la implementación combinada de estrategias de ingeniería metabólica, optimización de las condiciones de fermentación e identificación de cuellos de botella, supuso una muy significativa mejora de 375 veces en los niveles de producción de naringenina en *S. albidoflavus* J1074, sin afectación notable en su tasa de crecimiento, lo cual indica que este compuesto no es tóxico para este organismo a esas concentraciones. Partiendo de unos niveles iniciales de 0,06 mg/L en la cepa *S. albidoflavus* WT-NAR cultivada en el medio R5A y sin adición de precursores, se ha logrado llegar a 22,47 mg/L tras la aplicación acumulativa de las mejoras ensayadas en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR cultivada en el medio NL333 y suplementada con ácido *p*-cumárico, L-tirosina y malonato a las concentraciones óptimas.

3.2. Optimización a nivel enzimático y establecimiento de co-cultivos

En la literatura existen múltiples técnicas de optimización enzimática que permiten mejorar tanto la eficiencia de producción como la viabilidad de los procesos biotecnológicos. Un enfoque básico y ampliamente extendido es la optimización de codones. Esta estrategia es especialmente sencilla de aplicar dentro del marco de la Biología Sintética, ya que se permite el diseño de genes a la carta. De este modo, se superan las limitaciones referidas a la expresión heteróloga de genes en organismos hospedadores con un uso de codones diferente al nativo.

En el contexto de la optimización enzimática, los enzimas F3'H y F3H representan ejemplos perfectos de enzimas susceptibles de mejoras a este nivel, debido a las restricciones asociadas a su expresión. Estas limitaciones las convierten en cuellos de botella críticos para la diversificación de flavonoides en rutas metabólicas que dependen de la expresión de dichos enzimas.

El enzima F3'H, perteneciente a la familia de las CYP, exhibe limitaciones en su expresión en organismos procariotas por dos razones principales: su asociación a la membrana del retículo endoplásmico de las células vegetales, la cual está ausente en procariotas, y su necesidad de poder reductor suministrado por una CPR, que también se encuentra anclada a la membrana. En cuanto al enzima F3H, que forma parte de la familia de las 2-OGD, se caracteriza por una eficiencia catalítica baja (Gao S et al., 2020), además de poseer una actividad secundaria F2H, lo que le permite realizar dos modificaciones distintas sobre un mismo sustrato (Marín et al., 2021). Ambos enzimas están implicados en la biosíntesis de todos los flavonoides desarrollados en esta tesis.

A este respecto, el diseño de una proteína quimérica F3'H/CPR permitió la biosíntesis efectiva de eriodictiol, al proporcionar al enzima F3'H el poder reductor necesario para su correcto funcionamiento. Además, este diseño convirtió ambas proteínas en solubles, abordando así los problemas vinculados a su expresión en sistemas heterólogos procariotas. La construcción de esta quimera se llevó a cabo mediante la eliminación de los dominios transmembrana, presentes tanto en la hidroxilasa como en la reductasa, seguido de su fusión a través de un enlace aminoacídico, de modo que se evita la formación de estructuras secundarias no deseadas entre las dos proteínas.

Gracias al diseño de esta proteína quimera se consiguieron unos niveles de producción de eriodictiol en la cepa *S. albidoflavus* WT-ERI que fueron 15 veces superiores con respecto a los conseguidos en estudios anteriores (0,03 mg/L vs 0,002 mg/L), aumentando esta diferencia a 25 veces (0,05 mg/L vs 0,002 mg/L) tras la mejora experimentada por la expresión de este enzima F3'H/CPR en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR.

El enzima F3H se ha identificado como el principal factor limitante en la biosíntesis de los flavanoles aromadendrina y taxifolina, así como de los auronoles maesopsina y alfitonina. Esta limitación es debida a la acumulación de los precursores naringenina y eriodictiol, respectivamente, y a su actividad secundaria F2H, la cual deriva los sustratos a otros productos no deseados (2-hidroxinaringenina y 2-

hidroxieriodictiol) y enmascara la producción de los auronoles. La selección de enzimas procedentes de diferentes fuentes genéticas fue la estrategia adoptada en este estudio para intentar abordar este obstáculo.

Para ello, sumado a la variante *PcF3H*, ya ensayada en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcARO y capaz de producir 0,2 µg/L de aromadendrina por conversión de la naringenina, se eligieron otras dos fuentes enzimáticas vegetales, correspondientes al árbol *Malus domestica* (*MdF3H*) y a la planta *Camellia sinensis* (*CsF3H*). Estas dos variantes fueron ensambladas por GS en los respectivos niveles 1, e integrados de forma independiente en el sitio ΦBT1 de la cepa editada de *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR, dando lugar a las cepas *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-MdARO y UO-FLAV-004-CsARO (**Figura 21**). La producción comparada de aromadendrina entre las 3 cepas productoras de este flavonoide fue posible gracias a que la expresión de las diferentes variantes del enzima F3H estuvo regulada por el mismo promotor.

Tras la evaluación experimental de las diferentes versiones enzimáticas se observaron destacados incrementos de 13 y 10 veces en los niveles de aromadendrina mediados por *MdF3H* (2,6 µg/L) y *CsF3H* (2,1 µg/L), respectivamente, en comparación con los niveles obtenidos con la *PcF3H*. No obstante, los rendimientos de este flavanonol resultaron aún notablemente bajos en relación con la capacidad de producción de naringenina de la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR (3,4 mg/L), quedando una gran cantidad de este precursor aún sin consumir. La actividad secundaria F2H de este enzima se detectó también en las dos nuevas variantes enzimáticas ensayadas, resultando en la producción del derivado 2-hidroxinaringenina.

Ensayos del comportamiento de esas dos nuevas variantes del enzima F3H, por suplementación con el precursor eriodictiol, señalaron a la variante *CsF3H* como la mejor para la producción de taxifolina. Por lo que una nueva cepa productora de taxifolina *de novo* fue creada mediante el ensamblaje de un nivel 2 de GS conformado por dos UTs, las correspondientes a los enzimas *CsF3H* y la quimera F3'H-CPR, ya disponibles para su uso de experimentos previos. Este nuevo nivel 2 de GS fue integrado en el sitio ΦBT1 de la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-NAR, dando lugar a la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX, la cual fue comparada en producción con la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-004-PcTAX (**Figura 21**).

En este contexto, a pesar de que los rendimientos máximos de taxifolina fueron observados con la variante *PcF3H* del enzima (2,1 mg/L), alcanzados en los ensayos iniciales, estos experimentos permitieron identificar a la variante *CsF3H* como la más eficiente en el consumo del precursor eriodictiol. Además, esta *CsF3H* produjo niveles de taxifolina (1,7 mg/L) comparables a los obtenidos con la *PcF3H*, pero en un intervalo temporal reducido (2 días).

En conjunto, el ensayo de diferentes fuentes genéticas del enzima F3H no resultó de gran eficacia para superar la limitación impuesta por este enzima, manteniéndose como el principal cuello de botella para la biosíntesis de los flavanonoles aromadendrina y taxifolina.

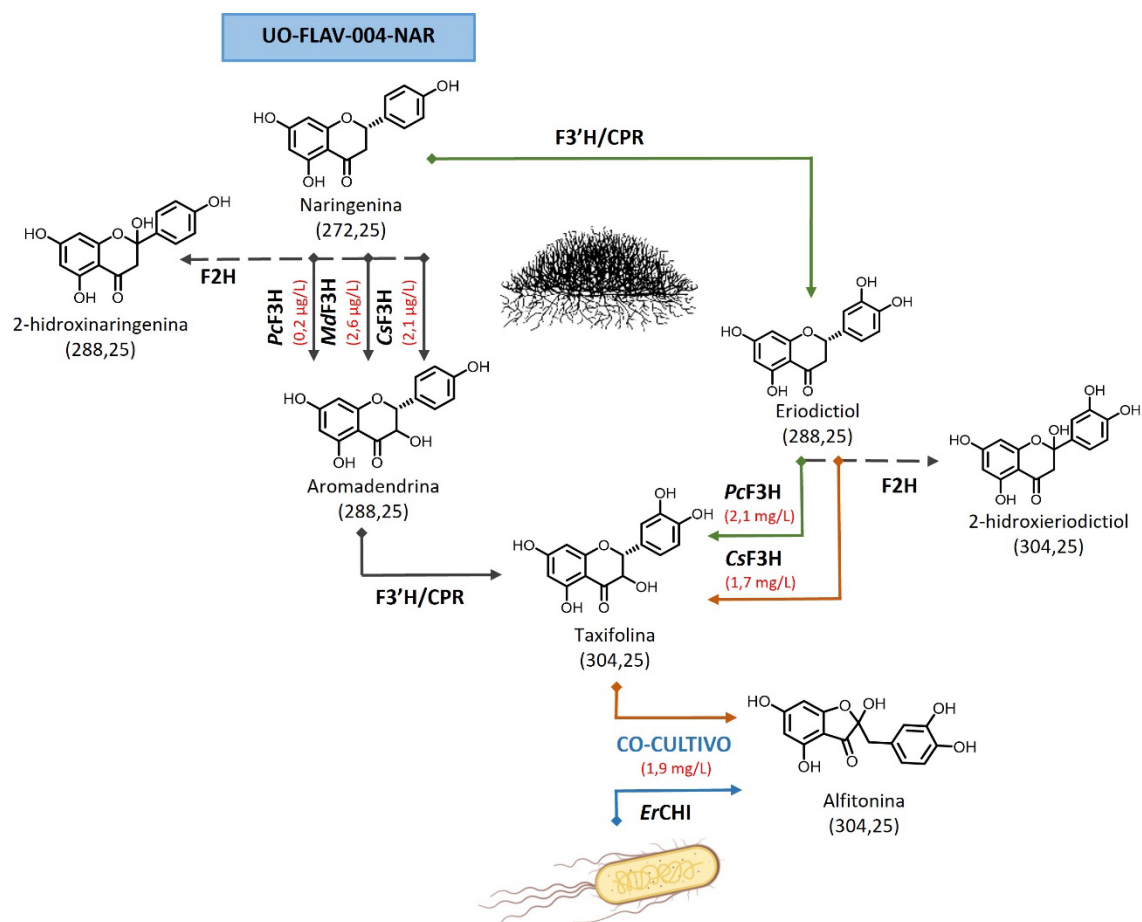


Figura 21. Representación de los flujos de actividad enzimática estudiados en *S. albidoflavus* J1074 para la producción de los flavanoles aromadendrina y taxifolina, y para la biosíntesis de novo del auronol alfitonina. En rojo se muestran los niveles de producción de aromadendrina y taxifolina obtenidos tras el ensayo de las diferentes variantes del enzima F3H, así como el rendimiento de alfitonina logrado tras el co-cultivo. En gris se representan las vías de biosíntesis menos favorecidas y en verde la más favorecida. La línea naranja indica la cepa productora de taxifolina elegida para el co-cultivo con la cepa de *E. coli* portadora del enzima ErCHI. La línea discontinua hace referencia a la actividad secundaria F2H del enzima F3H sobre naringenina y eriodictiol.

Las limitaciones encontradas en la biosíntesis *de novo* de alfitonina relacionadas con la rápida actuación del enzima ErCHI sobre la taxifolina, en paralelo a la rápida degradación de la alfitonina en cultivo, requirieron la implementación de otras técnicas de optimización. En este caso, la producción *de novo* de 1,9 mg/L de alfitonina se consiguió mediante una estrategia de co-cultivo. El establecimiento de este co-cultivo se realizó entre una cepa de *S. albidoflavus* productora de taxifolina y una cepa *E. coli* portadora del enzima ErCHI (Braune et al., 2016) (**Figura 21**). De este modo, se aseguró un suministro único de taxifolina para su rápida conversión en alfitonina por el enzima ErCHI.

El co-cultivo se llevó a cabo a través de la adecuada selección de la cepa de *S. albidoflavus* J1074 productora de taxifolina. Esta elección fue de especial relevancia, ya que el centro activo del enzima ErCHI se ve bloqueado por la presencia de los precursores naringenina y eriodictiol (Braune et al., 2016). En este sentido, la acumulación de naringenina no supuso un problema, ya que la quimera F3'H/CPR consume este sustrato eficientemente; sin embargo, hemos visto cómo el enzima F3H limita la producción de flavanoles debido a la acumulación de precursores. No obstante, la variante CsF3H de este enzima

fue identificada en este trabajo como consumidora eficiente de eriodictiol, y capaz de producir niveles aceptables de taxifolina (1,7 mg/L) en un corto periodo de tiempo (2 días), por lo que la cepa portadora de esta variante (*S. albidoflavus* UO-FLAV-004-CsTAX) fue la seleccionada para el co-cultivo (**Figura 21**).

Para la implementación de este co-cultivo ambas cepas fueron inicialmente cultivadas de forma independiente, conforme a sus requerimientos particulares dependiendo del organismo, y durante sus respectivos periodos óptimos de crecimiento. Posteriormente, fueron combinadas en un único matraz para llevar a cabo la interacción metabólica. Las muestras se recogieron y extrajeron inmediatamente después de la unión de las dos cepas. Este proceso permitió la detección final de alfítonina, en paralelo con un consumo total de la taxifolina disponible. Es relevante destacar también que la optimización de las condiciones de extracción jugó un papel crucial debido a la inherente inestabilidad de los auronoles.

Por consiguiente, aunque el ensayo de diferentes fuentes enzimáticas no logró un aumento significativo en la producción de flavanones, resultó ser de gran beneficio para la biosíntesis de auronoles. Este estudio subraya por tanto la relevancia de una selección enzimática estratégica basada en el producto final deseado. En particular, se observó que la variante del enzima F3H que proporciona los mejores rendimientos de taxifolina (*PcF3H*), no es óptima para la biosíntesis de auronoles, debido a las especificidades inherentes del enzima *ErCHI*. Este hallazgo resalta la importancia de considerar las particularidades enzimáticas en la ingeniería metabólica y en la optimización de rutas biosintéticas específicas.

4. *Evaluación del potencial antiinflamatorio de los flavonoides apigenina, luteolina y xanthohumol en un modelo murino de colitis ulcerosa*

El importante papel de la inflamación crónica como factor desencadenante o causa del empeoramiento de multitud de trastornos como el cáncer, junto a la relación descrita entre una microbiota intestinal alterada (disbiosis) y el desarrollo de enfermedades inflamatorias (**Figura 8**), han dado relevancia en este trabajo a la investigación de la eficacia de la administración de tres flavonoides (apigenina, luteolina y xanthohumol) en el tratamiento de la sintomatología inflamatoria y la modulación de la microbiota disbiótica en un modelo murino de colitis ulcerosa. Debido a que la microbiota intestinal es un sistema interdependiente, los cambios asociados a ésta solo pueden ser estudiados adecuadamente a través de experimentos *in vivo*.

Los tres compuestos estudiados han demostrado previamente efectividad *in vivo* en el tratamiento de diversos parámetros asociados a la colitis ulcerosa tras su administración por vía oral, como nutraceuticos (Cho et al., 2018; Fu et al., 2022; Li et al., 2021; Xue et al., 2023). Sin embargo, en este trabajo se ha estudiado su administración intraperitoneal, como tratamiento farmacológico (**Figura 22**). La inyección intraperitoneal de flavonoides permite evaluar tanto sus efectos sistémicos directos, al eludir el paso inicial por el tracto gastrointestinal, lo cual previene su degradación y modificación por la microbiota, como sus efectos indirectos, a través de la modulación de la microbiota y la generación de los compuestos

derivados de los flavonoides por parte de esa microbiota. Además, este método de administración facilita una absorción más rápida y completa (mayores niveles en los tejidos) de los flavonoides, con dosis menores en comparación con la administración oral (Al-Shoyaib et al., 2020; Chan et al., 2014).

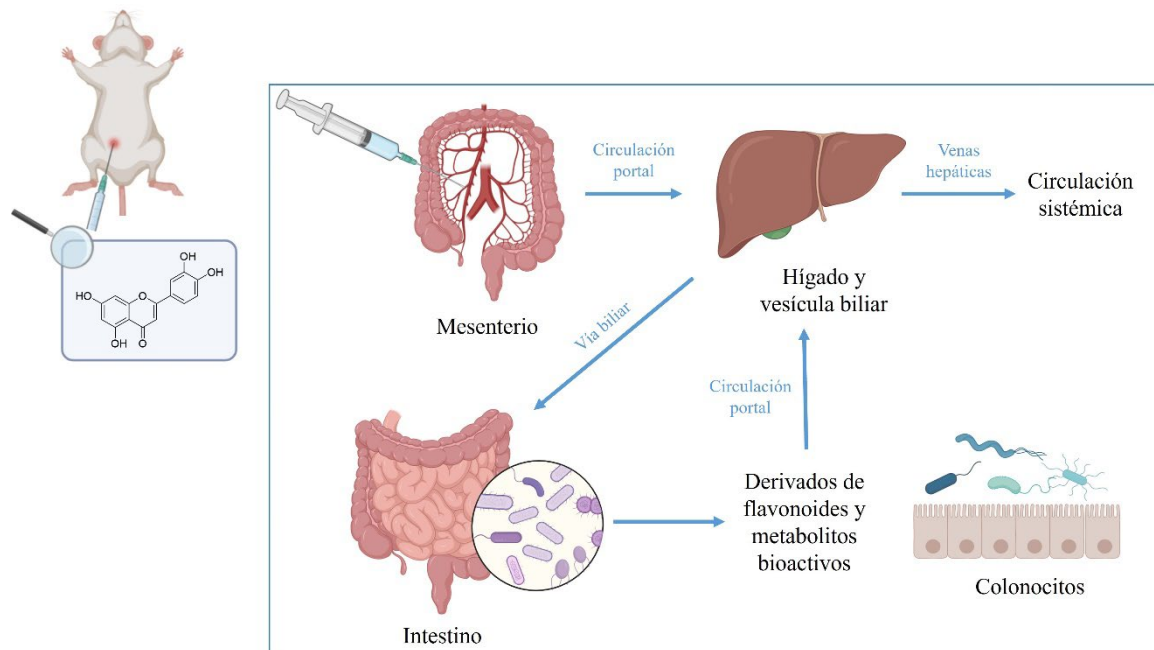


Figura 22. Representación del tránsito de los flavonoides por el organismo tras su administración intraperitoneal [Figura elaborada con BioRender].

Como resultado, la luteolina demostró una eficacia superior, al ser el único compuesto de entre los tres ensayados con el que se registró una mejoría significativa de los parámetros físicos inflamatorios, en relación con una ausencia total de ulceración del colon, así como con una reducción significativa en el “índice de actividad de enfermedad” (DAI) al final del experimento. Este efecto podría ser debido al hecho de que en su estructura presenta tanto el grupo catecol del anillo B como el grupo carbonilo y el doble enlace entre los C2 y C3 del anillo C, todas ellas características atribuidas a un aumento del potencial antiinflamatorio (Ginwala et al., 2019).

Sin embargo, aunque no alcanzó significación estadística, el grupo de animales tratados con xanthohumol evidenció una tendencia similar al de la luteolina en la evolución del DAI durante los últimos 5 días de la inducción de la colitis ulcerosa, mostrando ambas cohortes un índice notablemente inferior al de los animales del grupo control (inyectados con tampón fosfato salino o PBS) y a los de la cohorte tratada con apigenina. De igual manera, se observó que, tanto la luteolina como el xanthohumol, tuvieron un efecto beneficioso sobre la pérdida de peso durante los días más críticos de la inducción de la enfermedad, mostrando una reducción de peso más suave en comparación con los otros dos grupos.

Los tres flavonoides evaluados demostraron ser efectivos en la reducción de dos citoquinas pro-inflamatorias, la IL-6 y la IL-1 β . Estos efectos pueden ser atribuidos tanto a los efectos directos de los flavonoides como a los efectos indirectos, relacionados con los metabolitos fenólicos bioactivos derivados

del procesamiento de estos flavonoides por la microbiota intestinal. Sin embargo, mientras que la luteolina y la apigenina consiguieron disminuir ambas citoquinas de forma estadísticamente significativa, el tratamiento con xanthohumol solo logró reducir la IL-6.

La microbiota, tomada en conjunto, es capaz de catalizar diversas reacciones de catabolismo, conjugación y modificación de los flavonoides, gracias a la gran variedad de enzimas de los que disponen. Las reacciones catabólicas de los flavonoides incluyen hidrólisis, ruptura y reducción (Wang et al., 2021). En este sentido, la apigenina y la luteolina se metabolizan de forma similar, ya que sus estructuras solo difieren en un grupo hidroxilo en el anillo B. La degradación de las flavonas por la microbiota intestinal comienza con la reducción del doble enlace entre los C2 y C3, previa a la ruptura del anillo C. Los metabolitos de degradación de las flavonas son ácidos hidroxifenilpropiónicos (Feng et al., 2018). En el caso particular de la luteolina la reducción inicial lleva a la formación de eriodictiol, seguido de la ruptura del anillo C del eriodictiol, que conduce a una estructura de chalcona, la cual se reduce a dihidrochalcona, que es posteriormente degradada en ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico y otros compuestos fenólicos (Braune et al., 2001).

Por su parte, el principal metabolito derivado del xanthohumol, la 8-prenilnaringenina, se ha descrito como producto del procesamiento por dos microorganismos del tracto gastrointestinal humano, *Eubacterium limosum* y *Eubacterium ramulus* (Makarewicz et al., 2021). Estos microorganismos, que catalizan la desmetilación del xanthohumol, no se encontraron presentes en la microbiota de los roedores analizados, pudiendo ser esta la causa del efecto reducido del xanthohumol sobre una de las citoquinas estudiadas.

La homeostasis intestinal requiere de un equilibrio entre la microbiota y el sistema inmune. Esta microbiota puede verse alterada por diversos factores ambientales (tóxicos, dieta, etc.), desencadenando en una respuesta inmune aberrante que lleva a reacciones de oxidación y a respuestas inflamatorias (**Figura 8**). Por el momento se desconoce si la disbiosis asociada a la colitis ulcerosa es la causa o una consecuencia de la enfermedad. Aun así, considerando la implicación de la alteración de la microbiota intestinal en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, es relevante el estudio del efecto de los flavonoides en la modulación de esta microbiota disbiótica, en asociación con la enfermedad. En el contexto de la colitis ulcerosa, y en comparación con individuos sanos, se han identificado notables distinciones en relación a la abundancia y la diversidad de los microorganismos conformantes de la microbiota, lo que resulta en un desequilibrio en la homeostasis intestinal y en respuestas inmunitarias anómalas.

Como punto de partida de este análisis, la ausencia de diferencias en el peso del ciego entre cohortes resultó predecible, dado que los flavonoides no son compuestos fermentables y, por tanto, no generan un incremento en la masa microbiana.

Más en profundidad, en este trabajo se utilizó el análisis metataxonómico del contenido cecal, mediante secuenciación del ARNr 16S, con el fin de determinar variaciones en la composición de la microbiota

intestinal entre los grupos estudiados. Este análisis reveló la capacidad de modulación de la microbiota como uno de los efectos más significativos ejercido por los flavonoides en relación al tratamiento de la colitis ulcerosa, siendo además el primer estudio en informar acerca del impacto del xanthohumol sobre la microbiota intestinal. Además, el hecho de observar estos cambios, demuestra que la inyección intraperitoneal de flavonoides es un método de administración efectivo a este nivel.

Mientras que el análisis de la diversidad alfa (diversidad de especies dentro de una comunidad) no arrojó diferencias entre las cohortes, el análisis de la diversidad beta, centrado en la variación en la composición de especies entre diferentes comunidades, reveló una estructura comunitaria microbiana análoga entre las cohortes tratadas con luteolina y xanthohumol, las cuales, simultáneamente, difirieron significativamente de las cohortes tratadas con PBS y apigenina, estas últimas muy similares entre sí.

Esta tendencia se mantuvo también a lo largo de todo el análisis de la microbiota, de modo que, tras el tratamiento con luteolina y xanthohumol, se observaron numerosos cambios significativos en la reducción de microorganismos relacionados con actividades pro-inflamatorias, mientras que otros táxones, caracterizados como antiinflamatorios, experimentaron incrementos. Más en detalle, el filo *Pseudomonadota* (géneros *Parasutterella* y *Escherichia-Shigella*) fue, en ambas cohortes, el más significativamente reducido de entre todas las comparaciones realizadas a este nivel. Los aumentos en este filo son la principal firma microbiana compartida entre pacientes con colitis ulcerosa (Hirano et al., 2018). Especialmente llamativa fue la reducción en el género *Alistipes* en la cohorte de xanthohumol, asociado en la literatura con disbiosis e inflamación (Parker et al., 2020).

Entre los incrementos más significativos en ambas cohortes (luteolina y xanthohumol), con relación a microorganismos antiinflamatorios, se encuentran los géneros *Clostridia UCG-014* y *Enterorhabdus*. El primero de ellos fue asociado con una mejora de la disbiosis y de la inflamación del colon en un modelo de colitis ulcerosa en ratón, gracias a la producción del catabolito antiinflamatorio ácido indol-3-acético, procedente de la degradación del triptófano (Yang et al., 2021). Por su parte, el segundo se relaciona con la producción de metabolitos fenólicos bioactivos, derivados de la degradación de los flavonoides (Makarewicz et al., 2021). La especie *Akkermansia muciniphila*, comúnmente reconocida como probiótica y productora de ácidos grasos de cadena corta implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria (He et al., 2022), se encontró aumentada en la cohorte de xanthohumol. Mientras que la familia *Lachnospiraceae*, incrementada en la cohorte de luteolina, se relaciona con la disminución de citoquinas pro-inflamatorias y la producción ácidos biliares secundarios y butirato (ácido graso de cadena corta, también antiinflamatorio) (Lobionda et al., 2019). Los ácidos biliares secundarios son relevantes para la digestión, la absorción de grasas y nutrientes y la regulación del metabolismo lipídico, además, pueden tener efectos sobre el microbioma intestinal y la salud metabólica.

A lo largo de todo el estudio se observó una mayor relación entre las cohortes de luteolina y xanthohumol frente a las manifestaciones inflamatorias de la colitis ulcerosa en comparación con la cohorte control (PBS), evidenciándose una mayor eficacia de éstas en la reducción de los síntomas inflamatorios y la modulación de la microbiota en relación con la colitis ulcerosa. Por el contrario, la cohorte tratada con

apigenina apenas mostró cambios en la modulación de la microbiota con respecto a la cohorte control (PBS). El hecho de que la apigenina, a pesar de los numerosos estudios que demuestran su efectividad en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del intestino, haya mantenido una tendencia más cercana a la cohorte control, excepto en lo que respecta a las citoquinas pro-inflamatorias, quedó explicado con la observación de una llamativa acumulación de gránulos de este compuesto en el mesenterio, durante la eutanasia de los animales. Esto habría resultado en una absorción limitada de este flavonoide, y, por tanto, en la incapacidad de ejercer efectos significativos a nivel del epitelio intestinal. La posible causa de esta reducción en su biodisponibilidad estaría influenciada por el método de administración empleado, y podría ser atribuible a la menor solubilidad de la apigenina en comparación con la luteolina, debido a la ausencia de un segundo grupo hidroxilo en el anillo B.

5. *Perspectivas futuras*

El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha permitido el desarrollo de un amplio abanico de vectores modulares y partes genéticas de uso en ingeniería genética de actinomicetos. Esta colección es susceptible de ser ampliada rápidamente con aportaciones derivadas de las necesidades de su uso por parte de los grupos de investigación que la adopten. De esta manera, se facilita la implementación de técnicas de clonación y expresión génica, al mismo tiempo que supone un ahorro de tiempo y dinero, al ser sus integrantes genéticos, una vez generados, aprovechables para otros estudios. El uso de esta colección ha permitido determinar que la endonucleasa Cas9 es óptima para la realización de experimentos de mutación genómica en *Streptomyces albidoflavus* J1074, de modo que permitirá llevar a cabo deleciones o inserciones que resulten de potencial interés de una manera más efectiva.

Las estrategias de optimización ensayadas para el incremento en la producción de la flavanona naringenina han permitido la implementación de mejoras que fueron aprovechadas en sucesivos experimentos de esta tesis, incluyendo la adopción de un nuevo medio de cultivo, o la deleción de agrupamientos génicos consumidores de precursores en común con las rutas de biosíntesis de flavonoides. Sin embargo, quedan otras mejoras pendientes de adoptar, y que serían de gran utilidad de cara a lograr incrementos en la producción heteróloga de flavonoides. Un ejemplo de esto sería la integración estable de una copia adicional del BGC de naringenina en el genoma, ya que se ha visto como el aumento en la dosis génica lleva al incremento en la producción. De este modo, el BGC de naringenina podría ser introducido por CRISPR/Cas9 en sustitución de un BGC a eliminar, dejando los sitios de integración libres para otros enzimas de diversificación.

Por otra parte, las estrategias de suplementación con precursores han evidenciado al ácido *p*-cumárico y a la L-tirosina como los principales cuellos de botella para la producción de naringenina en el medio de cultivo NL333. En este sentido, sería de gran interés el estudio en detalle tanto de las vías metabólicas como de los enzimas implicados en la producción de estos precursores, para facilitar la comprensión de las necesidades metabólicas del organismo productor. Los hallazgos derivados de este estudio podrían orientar futuras modificaciones por edición genómica que permitieran la capacitación del organismo

heterólogo, eliminando así la necesidad de añadir precursores que, a menudo, resultan poco viables económicamente.

El diseño eficaz de una proteína quimera, que superó el obstáculo de la expresión en organismos procariotas del enzima F3'H, ha abierto la puerta al uso de esta técnica en el resto de los enzimas del tipo CYP, lo cual permitirá seguir incrementando la diversidad de flavonoides a producir por el género *Streptomyces*.

En este estudio se ha determinado qué versión del enzima F3H muestra mayor eficiencia en la producción de taxifolina en las condiciones ensayadas, sin embargo, sería de interés la determinación del tiempo óptimo de cultivo al cual se alcanzan los niveles máximos de producción para cada una de esas F3H ensayadas, con el fin de hacer la elección definitiva. No obstante, el enzima F3H sigue suponiendo un problema de cara a la producción de flavanones, especialmente de aromadendrina, así como de sus derivados posteriores de ruta, entre los que se encuentran las antocianinas. A este respecto, se deja pendiente el estudio a nivel estructural de la proteína, con el fin de detectar aminoácidos del centro catalítico que puedan ser potencialmente susceptibles de modificación por mutagénesis dirigida. El objetivo de este estudio estaría enfocado a lograr un incremento en la afinidad por el sustrato del enzima F3H, un aumento en la eficiencia catalítica, así como la eliminación de la actividad secundaria F2H de este enzima que, no solo está derivando el sustrato a un subproducto indeseado, sino que está enmascarando la producción de los auronoles.

Finalmente, a pesar de que se ha logrado la producción heteróloga de auronoles a través del establecimiento de un co-cultivo entre *E. coli* y *Streptomyces*, se necesitan mejoras para conseguir una producción estable de estas moléculas. Este estudio ha abierto nuevas vías de investigación en cuanto a la problemática que supone la gran inestabilidad de estos compuestos en cultivo.

En conclusión, aún queda un largo camino para convertir a *Streptomyces* spp. en una bacteria capaz de producir flavonoides a gran escala, sin embargo, en este trabajo se han ensayado multitud de estrategias efectivas, así como propuesto otras muchas de potencial aplicación futura. El género *Streptomyces* tiene aún mucho potencial para ser explorado como microorganismo destinado a la producción heteróloga de compuestos bioactivos y, más en concreto, de flavonoides.

CONCLUSIONES

1. Se ha generado una colección formada por 28 vectores para la expresión génica mediante el ensamblaje GS y 8 vectores para la edición genómica por el sistema CRISPR/Cas9, proporcionando una plataforma versátil de uso en Biología Sintética para la exploración de las capacidades biosintéticas de los actinomicetos como hospedadores heterólogos. La plataforma se ha validado en *Streptomyces albidoflavus* J1074.
2. La variante nativa de la endonucleasa Cas9 demuestra una eficacia superior para la edición del genoma de *S. albidoflavus* J1074 por el sistema CRISPR/Cas9 en comparación con la variante nicasa.
3. El uso de la colección de vectores ha facilitado la expresión génica de las rutas de biosíntesis de los flavonoides naringenina, eriodictiol, aromadendrina, taxifolina, maesopsina y alfitonina en *S. albidoflavus* J1074.
4. Se ha conseguido la edición del genoma de *S. albidoflavus* J1074 por el sistema CRISPR/Cas9 dando lugar a las cepas UO-FLAV-001 y UO-FLAV-002. UO-FLAV-001 se ha generado por eliminación del *pseudo*-sitio de integración pSEB4, mientras que UO-FLAV-002 se ha generado a partir de UO-FLAV-001 por reemplazamiento de 3 BGCs nativos, correspondientes a los compuestos antimicinas, candicidinas y una PKS-NRPS, por los genes *matB/C* de *Rhizobium trifolii*.
5. El medio de cultivo NL333 resulta de elección frente a los medios de cultivo R5A y TSB para la biosíntesis heteróloga de flavonoides en *S. albidoflavus* J1074, dejando patente la importancia de la correcta selección de las fuentes de carbono y nitrógeno.
6. La optimización del tiempo de cultivo es necesaria para la biosíntesis heteróloga de flavonoides en *S. albidoflavus* J1074 en relación con variaciones en el medio de cultivo, las variantes enzimáticas utilizadas y la estabilidad de los compuestos producidos.
7. El ensayo de la cepa editada *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 ha resultado en incrementos de 4 y 1,6 veces en la producción de las flavanonas naringenina y eriodictiol, respectivamente, en el medio R5A, en comparación con las cepas salvajes WT-NAR y WT-ERI, por eliminación de rutas endógenas.
8. En el medio de cultivo NL333, el factor limitante para la biosíntesis de naringenina en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NAR lo supone la dosis génica.
9. El aumento en la dosis génica convierte al malonil-CoA y al ácido *p*-cumárico en factores limitantes de la biosíntesis de naringenina en el medio NL333, dado que el aporte exógeno de malonato, ácido *p*-cumárico y/o L-tirosina a la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-NARNAR se traduce en un incremento en la biosíntesis de esta flavanona, especialmente con los dos últimos.
10. Se ha conseguido un incremento de 375 veces en la biosíntesis de naringenina en *S. albidoflavus* J1074 gracias al cambio en el medio de cultivo, al aumento de la dosis génica, la captación de un aporte extracelular de malonato y su conversión en malonil-CoA por integración de los genes *matB/C*, y a la suplementación con los precursores ácido *p*-cumárico y L-tirosina.
11. La construcción de un enzima quimérico CYP/CPR ha permitido funcionalizar el enzima F3'H en *S. albidoflavus* J1074, solucionando tanto su insolubilidad como su necesidad de poder reductor.
12. El uso de la colección de vectores integrativos, la expresión monocistrónica de los genes derivada del ensamblaje GS y la expresión del enzima quimérico F3'H/CPR, han supuesto un incremento de 15

Conclusiones

veces en la biosíntesis heteróloga de eriodictiol en la cepa *S. albidoflavus* WT-ERI respecto a estudios anteriores. Si a esto se le añade la mejora experimentada en la cepa *S. albidoflavus* UO-FLAV-002-ERI, este incremento asciende a 25 veces.

13. El enzima F3H se mantiene como una importante limitación para la biosíntesis de los flavanoles aromadendrina y taxifolina en *S. albidoflavus* J1074.
14. La variante *PcF3H* del enzima F3H ha surgido como la óptima para la biosíntesis de taxifolina en *S. albidoflavus* J1074 de entre las ensayadas en este estudio, mientras que la variante *CsF3H* lo es para la biosíntesis de auronoles. Se pone de manifiesto la relevancia de una selección enzimática estratégica en base a las características enzimáticas y al producto final deseado.
15. El enzima *ErCHI* responde inmediatamente a la presencia del precursor (aromadendrina o taxifolina) y alcanza en ese momento su máxima eficiencia de conversión en *S. albidoflavus* J1074. La eficiencia de conversión de este enzima es mayor sobre la taxifolina que sobre la aromadendrina.
16. La dificultad asociada a la detección de la biosíntesis de auronoles en *S. albidoflavus* J1074 se debe a su alta inestabilidad en las condiciones de cultivo ensayadas y al enmascaramiento de su producción por los productos derivados de la actividad F2H del enzima F3H.
17. Las estrategias de selección enzimática y de co-cultivo, en conjunto, han hecho posible la detección de la biosíntesis *de novo* del auronol alfitonina en *S. albidoflavus* J1074.
18. Se ha demostrado la efectividad de la administración intraperitoneal de luteolina en un modelo murino de colitis ulcerosa en la reducción significativa de parámetros inflamatorios como la ulceración del colon, el DAI y las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β .
19. La administración intraperitoneal de xanthohumol muestra efectos similares a la luteolina en la evolución del DAI durante los últimos 5 días de la inducción de colitis ulcerosa. Sin embargo, solo es efectiva en la reducción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6.
20. Tanto la luteolina como el xanthohumol se muestran efectivos en la modulación de la microbiota intestinal hacia una reducción en los microorganismos con características pro-inflamatorias y un incremento en los microorganismos con características antiinflamatorias.
21. La administración intraperitoneal de apigenina resulta significativamente efectiva en la reducción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β , sin embargo, no se observan diferencias a ningún otro nivel dada su reducida biodisponibilidad tisular por esta vía de administración.

REFERENCIAS

- Aa, L., Fei, F., Qi, Q., Sun, R., Gu, S., Di, Z., Aa, J., Wang, G., Liu, C., 2020. Rebalancing of the gut flora and microbial metabolism is responsible for the anti-arthritis effect of kaempferol. *Acta Pharmacol Sin* 41, 73–81. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0279-8>
- Abuohashish, H.M., Al-Rejaie, S.S., Al-Hosaini, K.A., Parmar, M.Y., Ahmed, M.M., 2013. Alleviating effects of morin against experimentally-induced diabetic osteopenia. *Diabetol Metab Syndr* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-5/FIGURES/5>
- Açar, Y., Ağagündüz, D., De Cicco, P., Capasso, R., 2023. Flavonoids: Their putative neurologic roles, epigenetic changes, and gut microbiota alterations in Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 168, 115788. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115788>
- Agrell, J., Oleszek, W., Stochmal, A., Olsen, M., Anderson, P., 2003. Herbivore-induced responses in alfalfa (*Medicago sativa*). *J Chem Ecol* 29, 303–320. <https://doi.org/10.1023/A:1022625810395/METRICS>
- Ai, X.Y., Qin, Y., Liu, H.J., Cui, Z.H., Li, M., Yang, J.H., Zhong, W.L., Liu, Y.R., Chen, S., Sun, T., Zhou, H.G., Yang, C., 2017. Apigenin inhibits colonic inflammation and tumorigenesis by suppressing STAT3-NF- κ B signaling. *Oncotarget* 8, 100216. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.22145>
- Al Aboody, M.S., Mickymaray, S., 2020. Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics* 9, 45. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045>
- Al-Shoyaib, A., Archie, S.R., Karamyan, V.T., 2020. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res* 37, 12. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
- Anné, J., Van Mellaert, L., 1993. *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol Lett* 114, 121–128. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1993.TB06561.X>
- Aron, P.M., Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res* 52, 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Arul-Jose, P., Sivakala, K.K., Jebakumar, S.R.D., 2013. Formulation and Statistical Optimization of Culture Medium for Improved Production of Antimicrobial Compound by *Streptomyces* sp. *JAJ06. Int J Microbiol* 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/526260>
- Bai, C., Zhang, Y., Zhao, X., Hu, Y., Xiang, S., Miao, J., Lou, C., Zhang, L., 2015. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 12181–12186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511027112>
- Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R.A., Church, G., Corn, J.E., Daley, G.Q., Doudna, J.A., Fenner, M., Greely, H.T., Jinek, M., Martin, G.S., Penhoet, E., Puck, J., Sternberg,

Referencias

- S.H., Weissman, J.S., Yamamoto, K.R., 2015. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 348, 36. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAB1028>
- Barbuto Ferraiuolo, S., Cammarota, M., Schiraldi, C., Restaino, O.F., 2021. *Streptomyces* as platform for biotechnological production processes of drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 551–568. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11064-2>
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15/ASSET/408FB6C5-97FF-4452-9C36-736B06EB1413/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0041524040006.JPEG>
- Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* 2005 58:1 58, 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Berini, F., Marinelli, F., Binda, E., 2020. Streptomyces: Attractive Hosts for Recombinant Protein Production. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01958>
- Bhavana, M., Talluri, P., Kumar, K.S., Rajagopal, S. V., 2014. Optimization of culture conditions of *Streptomyces carpaticus* (MTCC-11062) for the production of antimicrobial compound. *IJPPS*.
- Bibb, M.J., Janssen, G.R., Ward, J.M., 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 38, 215–226. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90220-3)
- Bibb, M.J., White, J., Ward, J.M., Janssen, G.R., 1994. The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the ermE gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol Microbiol* 14, 533–545. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1994.TB02187.X>
- Blázquez, B., León, D.S., Torres-Bacete, J., Gómez-Luengo, Á., Kniewel, R., Martínez, I., Sordon, S., Wilczak, A., Salgado, S., Huszcza, E., Popłoński, J., Prieto, A., Nogales, J., 2023. Golden Standard: a complete standard, portable, and interoperative MoClo tool for model and non-model proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 51, e98–e98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad758>
- Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M.G., Lu, X., Schwalen, C.J., Kautsar, S.A., Suarez Duran, H.G., De Los Santos, E.L.C., Kim, H.U., Nave, M., Dickschat, J.S., Mitchell, D.A., Shelest, E., Breitling, R., Takano, E., Lee, S.Y., Weber, T., Medema, M.H., 2017. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* 45, W36. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX319>

- Boucherle, B., Peuchmaur, M., Boumendjel, A., Haudecoeur, R., 2017. Occurrences, biosynthesis and properties of aurones as high-end evolutionary products. *Phytochemistry* 142, 92–111. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.06.017>
- Braune, A., Engst, W., Elsinghorst, P.W., Furtmann, N., Bajorath, J., Gütschow, M., Blaut, M., 2016. Chalcone Isomerase from *Eubacterium ramulus* Catalyzes the Ring Contraction of Flavanonols. *J Bacteriol* 198, 2965–2974. <https://doi.org/10.1128/JB.00490-16>
- Braune, A., Gütschow, M., Engst, W., Blaut, M., 2001. Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol* 67, 5558–5567. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5558-5567.2001>
- Brawner, M., Poste, G., Rosenberg, M., Westpheling, J., 1991. *Streptomyces*: a host for heterologous gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 2, 674–681. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90033-2)
- Bu, Q.T., Yu, P., Wang, J., Li, Z.Y., Chen, X.A., Mao, X.M., Li, Y.Q., 2019. Rational construction of genome-reduced and high-efficient industrial *Streptomyces* chassis based on multiple comparative genomic approaches. *Microb Cell Fact* 18, 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12934-019-1055-7/FIGURES/10>
- Cao, W., Ma, W., Wang, X., Zhang, B., Cao, X., Chen, K., Li, Y., Ouyang, P., 2016. Enhanced pinocembrin production in *Escherichia coli* by regulating cinnamic acid metabolism. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep32640>
- Challis, G.L., 2014. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 219–232. <https://doi.org/10.1007/S10295-013-1383-2>
- Chan, S.-T., Lin, Y.-C., Chuang, C.-H., Shiau, R.-J., Liao, J.-W., Yeh, S.-L., 2014. Oral and Intraperitoneal Administration of Quercetin Decreased Lymphocyte DNA Damage and Plasma Lipid Peroxidation Induced by TSA *In Vivo*. *Biomed Res Int* 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/580626>
- Chater, K.F., Wilde, L.C., 1980. *Streptomyces albus* G mutants defective in the *SalGI* restriction-modification system. *J Gen Microbiol* 116, 323–334. <https://doi.org/10.1099/00221287-116-2-323>
- Chaves, N., Escudero, J.C., Gutierrez-Merino, C., 1997. Role of ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J Chem Ecol* 23, 579–603. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006398.79306.09/METRICS>
- Chen, Y., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B., 2008. Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *J Bacteriol* 190, 5587–5596. <https://doi.org/10.1128/JB.00592-08>

Referencias

- Cho, J.-M., Yun, S.-M., Choi, Y.-H., Heo, J., Kim, N.-J., Kim, S.-H., Kim, E.-H., 2018. Xanthohumol prevents dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibition of IKK β /NF- κ B signaling in mice. *Oncotarget* 9, 866–880. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23183>
- Chouhan, S., Sharma, K., Zha, J., Guleria, S., Koffas, M.A.G., 2017. Recent advances in the recombinant biosynthesis of polyphenols. *Front Microbiol* 8, 300654. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02259/BIBTEX>
- Chu, L.L., Pandey, R.P., Jung, N., Jung, H.J., Kim, E.-H., Sohng, J.K., 2016. Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities. *Microb Cell Fact* 15, 135. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0533-4>
- Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.B., 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* 14, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.05.008>
- Clifton, K.P., Jones, E.M., Paudel, S., Marken, J.P., Monette, C.E., Halleran, A.D., Epp, L., Saha, M.S., 2018. The genetic insulator RiboJ increases expression of insulated genes. *J Biol Eng* 12, 23. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0115-6>
- Cobb, R.E., Wang, Y., Zhao, H., 2015. High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synth Biol* 4, 723–728. <https://doi.org/10.1021/sb500351f>
- Combes, P., Till, R., Bee, S., Smith, M.C.M., 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the ϕ C31-encoded site-specific recombination system. *J Bacteriol* 184, 5746–5752. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5746-5752.2002>
- Cress, B.F., Linhardt, R.J., Koffas, M.A.G., 2013. Isoflavonoid Production by Genetically Engineered Microorganisms, in: *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1647–1681. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_53
- Crits-Christoph, A., Bhattacharya, N., Olm, M.R., Song, Y.S., Banfield, J.F., 2021. Transporter genes in biosynthetic gene clusters predict metabolite characteristics and siderophore activity. *Genome Res* 31, 239–250. <https://doi.org/10.1101/gr.268169.120>
- Cui, H., Song, M.C., Ban, Y.H., Jun, S.Y., Kwon, A.S., Lee, J.Y., Yoon, Y.J., 2019. High-yield production of multiple O-methylated phenylpropanoids by the engineered *Escherichia coli*–*Streptomyces* cocultivation system. *Microb Cell Fact* 18, 67. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1118-9>
- Currais, A., Prior, M., Dargusch, R., Armando, A., Ehren, J., Schubert, D., Quehenberger, O., Maher, P., 2014. Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. *Aging Cell* 13, 379–390. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12185>

- Darband, S.G., Kaviani, M., Yousefi, B., Sadighparvar, S., Pakdel, F.G., Attari, J.A., Mohebbi, I., Naderi, S., Majidinia, M., 2018. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. *J Cell Physiol* 233, 6544–6560. <https://doi.org/10.1002/JCP.26595>
- Das, A., Baidya, R., Chakraborty, T., Samanta, A.K., Roy, S., 2021. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 142, 112004. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112004>
- Davies, J., 2006. Where have All the Antibiotics Gone? *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 17, 287. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>
- de-Lima-Procópio, R.E., da-Silva, I.R., Martins, M.K., de-Azevedo, J.L., de-Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Dias, M.C., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2021. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* 26, 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Dicarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., Church, G.M., 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 41, 4336–4343. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT135>
- Di-Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., Tattini, M., 2014. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ Exp Bot* 103, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.012>
- Dolya, B., Hryhorieva, O., Soroehynska, K., Lopatniuk, M., Ostash, I., Tseduliak, V.M., Sterndorff, E.B., Jørgensen, T.S., Gren, T., Dacyuk, Y., Weber, T., Luzhetskyy, A., Fedorenko, V., Ostash, B., 2023. Properties of Multidrug-Resistant Mutants Derived from Heterologous Expression Chassis Strain *Streptomyces albidoflavus* J1074. *Microorganisms* 11, 1176. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11051176/S1>
- Donato, M.T., 2004. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? [WWW Document]. URL https://www.uv.es/~jcastell/Citocromo_P450.pdf (accessed 2.17.24).
- Du, Y., Yang, B., Yi, Z., Hu, L., Li, M., 2020. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* Coculture Platform for the Production of Flavonoids. *J Agric Food Chem* 68, 2146–2154. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B07916/SUPPL_FILE/JF9B07916_SI_001.PDF
- Dunstan, M.S., Robinson, C.J., Jarvis, A.J., Yan, C., Carbonell, P., Hollywood, K.A., Currin, A., Swainston, N., Le Feuvre, R., Mickelfield, J., Faulon, J.L., Breitling, R., Turner, N., Takano, E., Scrutton, N.S., 2020. Engineering *Escherichia coli* towards de novo production of gatekeeper (2S)-flavanones: naringenin, pinocembrin, eriodictyol and homoeriodictyol. *Synth Biol* 5. <https://doi.org/10.1093/SYNBIO/YSAA012>

Referencias

- Effat, H., Abosharaf, H.A., Radwan, A.M., 2024. Combined effects of naringin and doxorubicin on the JAK/STAT signaling pathway reduce the development and spread of breast cancer cells. *Sci Rep* 14, 2824. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53320-9>
- Elsinghorst, P.W., Cavlar, T., Müller, A., Braune, A., Blaut, M., Gütschow, M., 2011. The Thermal and Enzymatic Taxifolin–Alphitonin Rearrangement. *J Nat Prod* 74, 2243–2249. <https://doi.org/10.1021/np200639s>
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2008. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS One* 3, e3647. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0003647>
- Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T.M., Werner, S., Jones, J.D.G., Patron, N.J., Marillonnet, S., 2014. A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synth Biol* 3, 839–843. https://doi.org/10.1021/SB4001504/SUPPL_FILE/SB4001504_SI_010.PDF
- 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>
- Farrow, S.C., Facchini, P.J., 2014. Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00524>
- Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D., Thomas, M.G., 2008. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol Pharm* 5, 191–211. <https://doi.org/10.1021/MP700137G>
- Feng, X., Li, Y., Brobbey Oppong, M., Qiu, F., 2018. Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites. *Drug Metab Rev* 50, 343–356. <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1485691>
- Feng, Z., Wang, L., Rajsiki, S.R., Xu, Z., Coeffet-LeGal, M.F., Shen, B., 2009. Engineered production of iso-migrastatin in heterologous *Streptomyces* hosts. *Bioorg Med Chem* 17, 2147–2153. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.10.074>
- Fernández, E., Lombó, F., Méndez, C., Salas, J.A., 1996. An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. *Mol Gen Genet* 251, 692–698. <https://doi.org/10.1007/BF02174118>
- Fernández, M., Sánchez, J., 2002. Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology (N Y)* 148, 405–412. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-405>
- Flärdh, K., 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 6, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.011>

- Fowler, Z.L., Gikandi, W.W., Koffas, M.A.G., 2009. Increased malonyl coenzyme A biosynthesis by tuning the *Escherichia coli* metabolic network and its application to flavanone production. *Appl Environ Microbiol* 75, 5831–5839. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-09>
- Fowler, Z.L., Koffas, M.A.G., 2009. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 83, 799–808. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2039-z>
- Fraga, C.G., Croft, K.D., Kennedy, D.O., Tomás-Barberán, F.A., 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 10, 514–528. <https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>
- Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiácovo, M.P., Church, G.M., Calarco, J.A., 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10, 741–743. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2532>
- Fu, R., Wang, L., Meng, Y., Xue, W., Liang, J., Peng, Z., Meng, J., Zhang, M., 2022. Apigenin remodels the gut microbiota to ameliorate ulcerative colitis. *Front Nutr* 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1062961>
- Fürst, R., Zündorf, I., 2014. Plant-derived anti-inflammatory compounds: Hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. *Mediators Inflamm* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/146832>
- Gallet, C., Ibanez, S., Zinger, L., Taravel, F.R., Trierweiler, M., Jeacomine, I., Despres, L., 2007. Plant Chemical Defense Induced by a Seed-Eating Pollinator Mutualist. *J Chem Ecol* 33, 2078–2089. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9362-6>
- Gao, S., Xu, X., Zeng, W., Xu, S., Lyv, Y., Feng, Y., Kai, G., Zhou, J., Chen, J., 2020. Efficient Biosynthesis of (2S)-Eriodictyol from (2S)-Naringenin in *Saccharomyces cerevisiae* through a Combination of Promoter Adjustment and Directed Evolution. *ACS Synth Biol* 9, 3288–3297. https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.0C00346/SUPPL_FILE/SB0C00346_SI_001.PDF
- Gao S, Zhou J, Chen J, 2020. Identification of flavonoids 3-hydroxylase from [*Silybum marianum* (L.) Gaertn] and its application in enhanced production of taxifolin. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 36, 2838–2849.
- Gao, X., Cassidy, A., Schwarzschild, M.A., Rimm, E.B., Ascherio, A., 2012. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* 78, 1138. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E31824F7FC4>
- García-Gutiérrez, C., Aparicio, T., Torres-Sánchez, L., Martínez-García, E., Lorenzo, V., Villar, C.J., Lombó, F., 2020. Multifunctional SEVA shuttle vectors for actinomycetes and Gram-negative bacteria. *Microbiologyopen* 9, 1135–1149. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1024>

Referencias

- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1318>
- Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D.I., Jain, P., Khan, Z.K., 2019. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants* 8, 35. <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>
- Gomez-Escribano, J.P., Bibb, M.J., 2011. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol* 4, 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00219.x>
- González Mosquera, D.M., Hernández Ortega, Y., Fernández, P.L., González, Y., Doens, D., Vander Heyden, Y., Foubert, K., Pieters, L., 2018. Flavonoids from *Boldoa purpurascens* inhibit proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and the expression of COX-2. *Phytotherapy Research* 32, 1750–1754. <https://doi.org/10.1002/ptr.6104>
- González-Mendoza, D., 2009. Cytochrom P450 monooxygenase enzymatic complex in plants [WWW Document]. URL https://www.mendeley.com/import/?url=http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext%26pid=S0568-25172009000200010%26lng=es%26nrm=iso%26tlng= (accessed 2.17.24).
- Goris, T., Pérez-Valero, Á., Martínez, I., Yi, D., Fernández-Calleja, L., San León, D., Bornscheuer, U.T., Magadán-Corpas, P., Lombó, F., Nogales, J., 2021. Repositioning microbial biotechnology against COVID-19: the case of microbial production of flavonoids. *Microb Biotechnol* 14, 94–110. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13675>
- Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., O'connor-Giles, K.M., 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194, 1029–1035. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.113.152710/-/DC1/GENETICS.113.152710-4.PDF>
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grosset, J.H., Singer, T., 2013. Streptomycin, in: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 568–569. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01484-4>
- Gullón, S., Olano, C., Abdelfattah, M.S., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., Salas, J.A., 2006. Isolation, Characterization, and Heterologous Expression of the Biosynthesis Gene Cluster for the Antitumor Anthracycline Steffimycin. *Appl Environ Microbiol* 72, 4172. <https://doi.org/10.1128/AEM.00734-06>

- Hardisson, C., Manzanal, M.-B., Salas, J.-A., Suarez, J.-E., 1978. Fine Structure, Physiology and Biochemistry of Arthrospore Germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol* 105, 203–214. <https://doi.org/10.1099/00221287-105-2-203>
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas and Rebecca Pogni, Z., 2018. *Streptomyces* Secondary Metabolites, in: Basic Biology and Applications of Actinobacteria. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79890>
- He, X., Bai, Y., Zhou, H., Wu, K., 2022. *Akkermansia muciniphila* Alters Gut Microbiota and Immune System to Improve Cardiovascular Diseases in Murine Model. *Front Microbiol* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.906920>
- Hertweck, C., 2009. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 4688–4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>
- Hirano, A., Umeno, J., Okamoto, Y., Shibata, H., Ogura, Y., Moriyama, T., Torisu, T., Fujioka, S., Fuyuno, Y., Kawarabayasi, Y., Matsumoto, T., Kitazono, T., Esaki, M., 2018. Comparison of the microbial community structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 33, 1590–1597. <https://doi.org/10.1111/jgh.14129>
- Hirsch, C.F., Ensign, J.C., 1978. Some Properties of *Streptomyces viridochromogenes* Spores. *J Bacteriol* 134, 1056–1063. <https://doi.org/10.1128/jb.134.3.1056-1063.1978>
- Horbal, L., Siegl, T., Luzhetskyy, A., 2018. A set of synthetic versatile genetic control elements for the efficient expression of genes in Actinobacteria. *Sci Rep* 8, 491. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18846-1>
- Hostetler, G.L., Ralston, R.A., Schwartz, S.J., 2017. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition* 8, 423–435. <https://doi.org/10.3945/an.116.012948>
- Hou, D.X., Kumamoto, T., 2010. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid Redox Signal* 13, 691–719. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2816>
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.05.010>
- Huang, H., Zheng, G., Jiang, W., Hu, H., Lu, Y., 2015. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47, 231–243. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMV007>
- Huang, S., Zhao, Y., Qin, Z., Wang, X., Onega, M., Chen, L., He, J., Yu, Y., Deng, H., 2011. Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by

Referencias

- Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry* 46, 811–816.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.11.024>
- Hwang, E. Il, Kaneko, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2003. Production of Plant-Specific Flavanones by *Escherichia coli* Containing an Artificial Gene Cluster. *Appl Environ Microbiol* 69, 2699.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2699-2706.2003>
- Hwang, S., Lee, Y., Kim, J.H., Kim, G., Kim, H., Kim, W., Cho, S., Palsson, B.O., Cho, B.-K., 2021. *Streptomyces* as Microbial Chassis for Heterologous Protein Expression. *Front Bioeng Biotechnol* 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.804295>
- Ibdah, M., Martens, S., Gang, D.R., 2018. Biosynthetic Pathway and Metabolic Engineering of Plant Dihydrochalcones. *J Agric Food Chem* 66, 2273–2280.
https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B04445/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2017-044453_0003.GIF
- Isogai, S., Tominaga, M., Kondo, A., Ishii, J., 2022. Plant Flavonoid Production in Bacteria and Yeasts. *Frontiers in Chemical Engineering* 4. <https://doi.org/10.3389/fceng.2022.880694>
- Jadhav, R., Puchchakayala, G., 2012. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats.
- Jia, H., Zhang, Longmei, Wang, T., Han, J., Tang, H., Zhang, Liping, 2017. Development of a CRISPR/Cas9-mediated gene-editing tool in *Streptomyces rimosus*. *Microbiology (Reading)* 163, 1148–1155. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000501>
- Jiang, N., Doseff, A., Grotewold, E., 2016. Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits. *Plants* 5, 27.
<https://doi.org/10.3390/plants5020027>
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., Weeks, D.P., 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* 41. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT780>
- Jiao, T., Zhou, J., Xu, S., 2019. Quantitative effect of the expression level of key genes in naringenin synthesis on the accumulation level of target products. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 35, 1256–1265. <https://doi.org/10.13345/J.CJB.180525>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829>
- Jones, K.L., Kim, S.W., Keasling, J.D., 2000. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metab Eng* 2, 328–338.
<https://doi.org/10.1006/MBEN.2000.0161>

- Jönsson, M., Sigrist, R., Petrov, M.S., Marcussen, N., Gren, T., Pálsson, B.O., Yang, L., Özdemir, E., 2024. Machine Learning Uncovers the Transcriptional Regulatory Network for the Production Host *Streptomyces albidoflavus* J1074. bioRxiv 2024.01.09.574332. <https://doi.org/10.1101/2024.01.09.574332>
- Ju, Y., Son, K.-H., Jin, C., Hwang, B.S., Park, D.-J., Kim, C.-J., 2017. Statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces rimosus* AG-P1441. Food Sci Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0257-1>
- Jucá, M.M., Cysne Filho, F.M.S., de Almeida, J.C., Mesquita, D. da S., Barriga, J.R. de M., Dias, K.C.F., Barbosa, T.M., Vasconcelos, L.C., Leal, L.K.A.M., Ribeiro, J.E., Vasconcelos, S.M.M., 2020. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. Nat Prod Res 34, 692–705. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588>
- Kallifidas, D., Jiang, G., Ding, Y., Luesch, H., 2018. Rational engineering of *Streptomyces albus* J1074 for the overexpression of secondary metabolite gene clusters. Microb Cell Fact 17, 25. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0874-2>
- Kaneko, M., Hwang, E. Il, Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2003. Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. J Ind Microbiol Biotechnol 30, 456–461. <https://doi.org/10.1007/S10295-003-0061-1>
- Khalilvand, A.B., Aminzadeh, S., Sanati, M.H., Mahboudi, F., 2022. Media optimization for SHuffle T7 *Escherichia coli* expressing SUMO-Lispro proinsulin by response surface methodology. BMC Biotechnol 22, 1. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00732-4>
- Khan, S.T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozone, I., Mukai, A., Takagi, M., Shin-Ya, K., 2011. *Streptomyces* associated with a marine sponge Haliclona sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. Environ Microbiol 13, 391–403. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2010.02337.X>
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A., 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich.
- Kim, B.G., 2020. Biological synthesis of genistein in *Escherichia coli*. J. Microbiol. Biotechnol. 30, 770–776. <https://doi.org/10.4014/JMB.1911.11009>
- Kim, B.G., Lee, H., Ahn, J.H., 2014. Biosynthesis of pinocembrin from glucose using engineered *Escherichia coli*. J Microbiol Biotechnol 24, 1536–1541. <https://doi.org/10.4014/JMB.1406.06011>
- Kim, T.H., Lee, J., Kim, H.-J., Jo, C., 2017. Plasma-Induced Degradation of Quercetin Associated with the Enhancement of Biological Activities. J Agric Food Chem 65, 6929–6935. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00987>

Referencias

- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66, 1328–1333. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000>
- Komarova, A. V., Tchufistova, L.S., Supina, E. V., Boni, I. V., 2002. Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. *RNA* 8, 1137. <https://doi.org/10.1017/S1355838202029990>
- Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yamada, Y., Kozone, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Takagi, M., Omura, S., Shin-Ya, K., Cane, D.E., Ikeda, H., 2013. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol* 2, 384–396. <https://doi.org/10.1021/SB3001003>
- Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E., Ikeda, H., 2010. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2646–2651. https://doi.org/10.1073/PNAS.0914833107/SUPPL_FILE/PNAS.200914833SI.PDF
- Koopman, F., Beekwilder, J., Crimi, B., van Houwelingen, A., Hall, R.D., Bosch, D., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Daran, J.M., 2012. *De novo* production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-155/TABLES/3>
- Koshla, O., Vogt, L.-M., Rydkin, O., Sehin, Y., Ostash, I., Helm, M., Ostash, B., 2023. Landscape of Post-Transcriptional tRNA Modifications in *Streptomyces albidoflavus* J1074 as Portrayed by Mass Spectrometry and Genomic Data Mining. *J Bacteriol* 205. <https://doi.org/10.1128/jb.00294-22>
- Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., Kašparovský, T., 2019. Isoflavones. *Molecules* 24, 1076. <https://doi.org/10.3390/molecules24061076>
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Labes, G., Bibb, M., Wohlleben, W., 1997. Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (*aacC1*) of Tn 1696 as reporter. *Microbiology (Reading)* 143 (Pt 5), 1503–1512. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-5-1503>
- Lalani, S., Poh, C.L., 2020. Flavonoids as Antiviral Agents for Enterovirus A71 (EV-A71). *Viruses* 12, 184. <https://doi.org/10.3390/v12020184>
- Lanza, A.M., Curran, K.A., Rey, L.G., Alper, H.S., 2014. A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-33/FIGURES/4>

- Laoué, J., Fernandez, C., Ormeño, E., 2022. Plant Flavonoids in Mediterranean Species: A Focus on Flavonols as Protective Metabolites under Climate Stress. *Plants* 11, 172. <https://doi.org/10.3390/plants11020172>
- Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Kim, J.H., Cho, S., Kim, H.U., Yoon, Y.J., Oh, M.-K., Palsson, B.O., Cho, B.-K., 2021. Systems and synthetic biology to elucidate secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded in *Streptomyces* genomes. *Nat Prod Rep* 38, 1330–1361. <https://doi.org/10.1039/D0NP00071J>
- Lee, N., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., Cho, B.-K., 2019. Synthetic Biology Tools for Novel Secondary Metabolite Discovery in *Streptomyces*. *J Microbiol Biotechnol* 29, 667–686. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04015>
- Leonard, E., Lim, K.H., Saw, P.N., Koffas, M.A.G., 2007. Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73, 3877–3886. <https://doi.org/10.1128/AEM.00200-07>
- Leonard, E., Yan, Y., Fowler, Z.L., Li, Z., Lim, C.-G., Lim, K.-H., Koffas, M.A.G., 2008. Strain Improvement of Recombinant *Escherichia coli* for Efficient Production of Plant Flavonoids. *Mol Pharm* 5, 257–265. <https://doi.org/10.1021/mp7001472>
- Leonard, E., Yan, Y., Koffas, M., 2006. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 8, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.11.001>
- Li, B., Du, P., Du, Y., Zhao, D., Cai, Y., Yang, Q., Guo, Z., 2021. Luteolin alleviates inflammation and modulates gut microbiota in ulcerative colitis rats. *Life Sci* 269, 119008. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.119008>
- Li, G., Li, H., Lyu, Y., Zeng, W., Zhou, J., 2020. Enhanced Biosynthesis of Dihydromyricetin in *Saccharomyces cerevisiae* by Coexpression of Multiple Hydroxylases. *J Agric Food Chem* 68, 14221–14229. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.0C05261/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF0C05261_0008.GIF
- Li, H., Gao, S., Zhang, S., Zeng, W., Zhou, J., 2021. Effects of metabolic pathway gene copy numbers on the biosynthesis of (2S)-naringenin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 325, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.009>
- Li, J., Tian, C., Xia, Y., Mutanda, I., Wang, K., Wang, Y., 2019. Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered *E. coli* from available phenylalanine and tyrosine. *Metab Eng* 52, 124–133. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.11.008>

Referencias

- Li, J., Zhong, X., Zhao, Y., Shen, J., Xiao, Z., Pilapong, C., 2024. Acacetin inhibited non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell growth via upregulating miR-34a *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep* 14, 2348. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52896-6>
- Li, L., Somerset, S., 2018. Associations between Flavonoid Intakes and Gut Microbiota in a Group of Adults with Cystic Fibrosis. *Nutrients* 10, 1264. <https://doi.org/10.3390/nu10091264>
- Li, L., Wei, K., Liu, X., Wu, Y., Zheng, G., Chen, S., Jiang, W., Lu, Y., 2019. aMSGE: advanced multiplex site-specific genome engineering with orthogonal modular recombinases in actinomycetes. *Metab Eng* 52, 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.001>
- Liga, S., Paul, C., Péter, F., 2023. Flavonoids: Overview of Biosynthesis, Biological Activity, and Current Extraction Techniques. *Plants* 12, 2732. <https://doi.org/10.3390/plants12142732>
- Lin, I.C., Yamashita, S., Murata, M., Kumazoe, M., Tachibana, H., 2016. Equol suppresses inflammatory response and bone erosion due to rheumatoid arthritis in mice. *J Nutr Biochem* 32, 101–106. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2016.02.012>
- Liu, C., Zhang, J., Lu, C., Shen, Y., 2015. Heterologous expression of galbonolide biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 1359–1366. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0415-5>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., Yin, H., 2021. The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *Int J Mol Sci* 22, 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Liu, W., Zhang, B., Jiang, R., 2017. Improving acetyl-CoA biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via the overexpression of pantothenate kinase and PDH bypass. *Biotechnol Biofuels* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13068-017-0726-Z/FIGURES/6>
- Liu, Y., Xu, Y., Ding, D., Wen, J., Zhu, B., Zhang, D., 2018. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production. *BMC Biotechnol* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12896-018-0418-1/TABLES/2>
- Lobionda, S., Sittipo, P., Kwon, H.Y., Lee, Y.K., 2019. The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. *Microorganisms* 7, 271. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080271>
- Lombó, F., Pfeifer, B., Leaf, T., Ou, S., Kim, Y.S., Cane, D.E., Licari, P., Khosla, C., 2001. Enhancing the Atom Economy of Polyketide Biosynthetic Processes through Metabolic Engineering. *Biotechnol Prog* 17, 612–617. <https://doi.org/10.1021/bp010045j>
- Lombó, F., Velasco, A., Castro, A., de la Calle, F., Braña, A.F., Sánchez-Puelles, J.M., Méndez, C., Salas, J.A., 2006. Deciphering the Biosynthesis Pathway of the Antitumor Thiocoraline from a Marine Actinomycete and Its Expression in Two *Streptomyces* Species. *ChemBioChem* 7, 366–376. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500325>

- Luo, Y., Zhang, L., Barton, K.W., Zhao, H., 2015. Systematic Identification of a Panel of Strong Constitutive Promoters from *Streptomyces albus*. ACS Synth Biol 4, 1001–1010. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00016>
- Lv, Y., Gu, Y., Xu, J., Zhou, J., Xu, P., 2020. Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield. Metab Eng 61, 79–88. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2020.05.005>
- Lv, Y., Marsafari, M., Koffas, M., Zhou, J., Xu, P., 2019. Optimizing Oleaginous Yeast Cell Factories for Flavonoids and Hydroxylated Flavonoids Biosynthesis. ACS Synth Biol 8, 2514–2523. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00193>
- Lyu, X., Zhao, G., Ng, K.R., Mark, R., Chen, W.N., 2019. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *de Novo* Production of Kaempferol. J Agric Food Chem 67, 5596–5606. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B01329/SUPPL_FILE/JF9B01329_SI_001.PDF
- Maciel-Fiuza, M.F., Muller, G.C., Campos, D.M.S., do Socorro Silva Costa, P., Peruzzo, J., Bonamigo, R.R., Veit, T., Vianna, F.S.L., 2023. Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases. Front Microbiol 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1098386>
- Maharjan, S., Park, J.W., Yoon, Y.J., Lee, H.C., Sohng, J.K., 2010. Metabolic engineering of *Streptomyces venezuelae* for malonyl-CoA biosynthesis to enhance heterologous production of polyketides. Biotechnol Lett 32, 277–282. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0152-9>
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., Duda-Chodak, A., 2021. The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. Antioxidants 10, 188. <https://doi.org/10.3390/antiox10020188>
- Maleki, S.J., Crespo, J.F., Cabanillas, B., 2019. Anti-inflammatory effects of flavonoids. Food Chem 299. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125124>
- Manallack, D., Crosby, I., Khakham, Y., Capuano, B., 2008. Platensimycin: a promising antimicrobial targeting fatty acid synthesis. Curr Med Chem 15, 705–710. <https://doi.org/10.2174/092986708783885255>
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P., Sanchez, J., 2008. Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. Appl Environ Microbiol 74, 3877. <https://doi.org/10.1128/AEM.02715-07>
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C., Sanchez, J., 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. FEMS Microbiol Lett 274, 118–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00825.x>

Referencias

- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Entrialgo-Cadierno, R., Villar, C.J., Lombó, F., 2018. *De novo* biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor*. PLoS One 13, e0207278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207278>
- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Villar, C.J., Lombó, F., 2021. *De novo* biosynthesis of garbanzol and fustin in *Streptomyces albus* based on a potential flavanone3-hydroxylase with 2-hydroxylase side activity. Microb Biotechnol 14, 2009–2024. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13874>
- Marín, L., Gutiérrez-del-Río, I., Yagüe, P., Manteca, Á., Villar, C.J., Lombó, F., 2017. *De Novo* Biosynthesis of Apigenin, Luteolin, and Eriodictyol in the Actinomycete *Streptomyces albus* and Production Improvement by Feeding and Spore Conditioning. Front Microbiol 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00921>
- Mark, R., Lyu, X., Ng, K.R., Chen, W.N., 2019. Gene source screening as a tool for naringenin production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Omega 4, 12872–12879. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B00364/SUPPL_FILE/AO9B00364_SI_001.PDF
- Martens, E., Demain, A.L., 2011. Platensimycin and platencin: promising antibiotics for future application in human medicine. The Journal of Antibiotics 2011 64:11 64, 705–710. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.80>
- Martin, J.F., McDaniel, L.E., 1975. Specific inhibition of candididin biosynthesis by the lipogenic inhibitor cerulenin. Biochim Biophys Acta 411, 186–194. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(75\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(75)90298-6)
- Martinez, S., Hausinger, R.P., 2015. Catalytic Mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases. Journal of Biological Chemistry 290, 20702–20711. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.648691>
- Martínez-García, E., Fraile, S., Algar, E., Aparicio, T., Velázquez, E., Calles, B., Tas, H., Blázquez, B., Martín, B., Prieto, C., Sánchez-Sampedro, L., Nørholm, M.H.H., Volke, D.C., Wirth, N.T., Dvořák, P., Alejaldre, L., Grozinger, L., Crowther, M., Goñi-Moreno, A., Nikel, P.I., Nogales, J., De Lorenzo, V., 2023. SEVA 4.0: an update of the Standard European Vector Architecture database for advanced analysis and programming of bacterial phenotypes. Nucleic Acids Res 51, D1558–D1567. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1059>
- Mathesius, U., 2018. Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. Plants 7, 30. <https://doi.org/10.3390/plants7020030>
- Mazziotti, I., Petrarolo, G., La Motta, C., 2021. Aurones: A Golden Resource for Active Compounds. Molecules 27, 2. <https://doi.org/10.3390/molecules27010002>

- Miao, Z., Zhao, Y., Chen, M., He, C., 2022. Using flavonoids as a therapeutic intervention against rheumatoid arthritis: The known and unknown. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* 3, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2021.100014>
- Milke, L., Aschenbrenner, J., Marienhagen, J., Kallscheuer, N., 2018. Production of plant-derived polyphenols in microorganisms: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018 102:4 102, 1575–1585. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-8747-5>
- Miyahisa, I., Funa, N., Ohnishi, Y., Martens, S., Moriguchi, T., Horinouchi, S., 2006. Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 53–58. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0116-5/METRICS>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Almendros, C., 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading)* 155, 733–740. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.023960-0>
- Myronovskiy, M., Brötz, E., Rosenkränzer, B., Manderscheid, N., Tokovenko, B., Rebets, Y., Luzhetskyy, A., 2016. Generation of new compounds through unbalanced transcription of landomycin A cluster. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 9175–9186. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7721-3>
- Myronovskiy, M., Rosenkränzer, B., Nadmid, S., Pujic, P., Normand, P., Luzhetskyy, A., 2018. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters. *Metab Eng* 49, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.09.004>
- Navone, S.E., Guarnaccia, L., Rizzaro, M.D., Begani, L., Barilla, E., Alotta, G., Garzia, E., Caroli, M., Ampollini, A., Violetti, A., Gervasi, N., Campanella, R., Riboni, L., Locatelli, M., Marfia, G., 2023. Role of Luteolin as Potential New Therapeutic Option for Patients with Glioblastoma through Regulation of Sphingolipid Rheostat. *Int J Mol Sci* 25, 130. <https://doi.org/10.3390/ijms25010130>
- Nawade, B., Yahyaa, M., Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E., Ibdah, M., 2020. Optimization of Culture Conditions for the Efficient Biosynthesis of Trilobatin from Phloretin by Engineered *Escherichia coli* Harboring the Apple Phloretin-4'-O-glycosyltransferase. *J Agric Food Chem* 68, 14212–14220. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04964>
- Nett, M., Ikeda, H., Moore, B.S., 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26, 1362–1384. <https://doi.org/10.1039/B817069J>
- Olano, C., Abdelfattah, M.S., Gullón, S., Braña, A.F., Rohr, J., Méndez, C., Salas, J.A., 2008. Glycosylated derivatives of steffimycin: insights into the role of the sugar moieties for the biological activity. *Chembiochem* 9, 624–633. <https://doi.org/10.1002/CBIC.200700610>

Referencias

- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12215–12220. <https://doi.org/10.1073/PNAS.211433198>
- Park, J.-S., Woo, M.-S., Kim, D.-H., Hyun, J.-W., Kim, W.-K., Lee, J.-C., Kim, H.-S., 2007. Anti-Inflammatory Mechanisms of Isoflavone Metabolites in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320, 1237–1245. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.114322>
- Park, S.R., 2010. Biosynthesis of Plant-Specific Flavones and Flavonols in *Streptomyces venezuelae*. *J Microbiol Biotechnol* 20, 1295–1299. <https://doi.org/10.4014/jmb.1005.05038>
- Park, S.R., Ahn, M.S., Han, A.R., Park, J.W., Yoon, Y.J., 2011. Enhanced flavonoid production in *Streptomyces venezuelae* via metabolic engineering. *J Microbiol Biotechnol* 21, 1143–1146. <https://doi.org/10.4014/JMB.1108.08012>
- Park, S.R., Yoon, J.A., Paik, J.H., Park, J.W., Jung, W.S., Ban, Y.-H., Kim, E.J., Yoo, Y.J., Han, A.R., Yoon, Y.J., 2009. Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *J Biotechnol* 141, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.013>
- Parker, B.J., Wearsch, P.A., Veloo, A.C.M., Rodriguez-Palacios, A., 2020. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
- Patron, N.J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., Raitskin, O., Leveau, A., Farré, G., Rogers, C., Smith, A., Hibberd, J., Webb, A.A.R., Locke, J., Schornack, S., Ajioka, J., Baulcombe, D.C., Zipfel, C., Kamoun, S., Jones, J.D.G., Kuhn, H., Robatzek, S., Van Esse, H.P., Sanders, D., Oldroyd, G., Martin, C., Field, R., O'Connor, S., Fox, S., Wulff, B., Miller, B., Breakspear, A., Radhakrishnan, G., Delaux, P.M., Loqué, D., Granell, A., Tissier, A., Shih, P., Brutnell, T.P., Quick, W.P., Rischer, H., Fraser, P.D., Aharoni, A., Raines, C., South, P.F., Ané, J.M., Hamberger, B.R., Langdale, J., Stougaard, J., Bouwmeester, H., Udvardi, M., Murray, J.A.H., Ntoukakis, V., Schäfer, P., Denby, K., Edwards, K.J., Osbourn, A., Haseloff, J., 2015. Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytol* 208, 13–19. <https://doi.org/10.1111/NPH.13532>
- Patzer, S.I., Braun, V., 2010. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *J Bacteriol* 192, 426–435. <https://doi.org/10.1128/JB.01250-09>
- Peng, H.-L., Huang, W.-C., Cheng, S.-C., Liou, C.-J., 2018. Fisetin inhibits the generation of inflammatory mediators in interleukin-1 β -induced human lung epithelial cells by suppressing the

- NF- κ B and ERK1/2 pathways. *Int Immunopharmacol* 60, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.004>
- Pereira, A.M., Cidade, H., Tiritan, M.E., 2023. Stereoselective Synthesis of Flavonoids: A Brief Overview. *Molecules* 28, 426. <https://doi.org/10.3390/molecules28010426>
- Pérez-Valero, Á., Ye, S., Magadán-Corpas, P., Villar, C.J., Lombó, F., 2023. Metabolic engineering in *Streptomyces albidoflavus* for the biosynthesis of the methylated flavonoids sakuranetin, acacetin, and genkwanin. *Microb Cell Fact* 22. <https://doi.org/10.1186/S12934-023-02247-3>
- Petzold, C.J., Chan, L.J.G., Nhan, M., Adams, P.D., 2015. Analytics for Metabolic Engineering. *Front Bioeng Biotechnol* 3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00135>
- Phelan, R.M., Sachs, D., Petkiewicz, S.J., Barajas, J.F., Blake-Hedges, J.M., Thompson, M.G., Reider Apel, A., Rasor, B.J., Katz, L., Keasling, J.D., 2017. Development of Next Generation Synthetic Biology Tools for Use in *Streptomyces venezuelae*. *ACS Synth Biol* 6, 159–166. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00202>
- Pollastri, S., Tattini, M., 2011. Flavonols: old compounds for old roles. *Ann Bot* 108, 1225–1233. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr234>
- Pozzesi, N., Pierangeli, S., Vacca, C., Falchi, L., Pettorossi, V., Martelli, M.P., Thuy, T.T., Ninh, P.T., Liberati, A.M., Riccardi, C., Sung, T.V., Delfino, D.V., 2011. Maesopsin 4-O- β -D-Glucoside, a Natural Compound Isolated from the Leaves of *Artocarpus tonkinensis*, Inhibits Proliferation and Up-Regulates HMOX1, SRXN1 and BCAS3 in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Chemotherapy* 23, 150–157. <https://doi.org/10.1179/joc.2011.23.3.150>
- Pulido, D., Jiménez, A., Salas, M., Mellado, R.P., 1987. A *Bacillus subtilis* phage phi 29 transcription terminator is efficiently recognized in *Streptomyces lividans*. *Gene* 56, 277–282. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90144-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90144-2)
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., Lim, W.A., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152, 1173. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.02.022>
- Quinn, G.A., Banat, A.M., Abdelhameed, A.M., Banat, I.M., 2020. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *J Med Microbiol* 69, 1040–1048. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
- Rafał, I.G., Króliczewski, B.J., Górnjak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, Á.J., 2018. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews* 2018 18:1 18, 241–272. <https://doi.org/10.1007/S11101-018-9591-Z>

Referencias

- Rees, A., Dodd, G., Spencer, J., 2018. The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients* 10, 1852. <https://doi.org/10.3390/nu10121852>
- Risdian, C., Mozef, T., Wink, J., 2019. Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7050124>
- Rodriguez, 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. *Bioresour Technol* 245, 1645–1654. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.043>
- Rodríguez, A.M., Olano, C., Vilches, C., Méndez, C., Salas, J.A., 1993. *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol Microbiol* 8, 571–582. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1993.TB01601.X>
- Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Gaforio, J.J., Gaforio, J.J., 2019. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants* 2019, Vol. 8, Page 137 8, 137. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8050137>
- Ryu, Y.G., Butler, M.J., Chater, K.F., Lee, K.J., 2006. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 72, 7132–7139. <https://doi.org/10.1128/AEM.01308-06/ASSET/467D66CA-FF61-4D1F-8B48-0E7AF398DAFA/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0110672460007.JPEG>
- Sajid, M., Channakesavula, C.N., Stone, S.R., Kaur, P., 2021. Synthetic Biology towards Improved Flavonoid Pharmacokinetics. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 754 11, 754. <https://doi.org/10.3390/BIOM11050754>
- Santos, C.N.S., Koffas, M., Stephanopoulos, G., 2011. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab Eng* 13, 392–400. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2011.02.002>
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A., 2005. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clin Orthop Relat Res* 437, 3–6. <https://doi.org/10.1097/01.BLO.0000175887.98112.FE>
- 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/METRICS>
- Shao, Z., Rao, G., Li, C., Abil, Z., Luo, Y., Zhao, H., 2013. Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold. *ACS Synth Biol* 2, 662–669. <https://doi.org/10.1021/SB400058N>

- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B., 2022. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem* 383, 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Shetty, R.P., Endy, D., Knight, T.F., 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J Biol Eng* 2, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-5/TABLES/4>
- Siegl, T., Tokovenko, B., Myronovskyi, M., Luzhetskyy, A., 2013. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. *Metab Eng* 19, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.07.006>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A.D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P.I., Platero, R., De Lorenzo, V., 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1119>
- Sirovina, D., Oršolić, N., Končić, M.Z., Kovačević, G., Benković, V., Gregorović, G., 2013. Quercetin vs chrysin: effect on liver histopathology in diabetic mice. *Hum Exp Toxicol* 32, 1058–1066. <https://doi.org/10.1177/0960327112472993>
- Siti, H.N., Kamisah, Y., Kamsiah, J., 2015. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 71, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Sohoni, S.V., Fazio, A., Workman, C.T., Mijakovic, I., Lantz, A.E., 2014. Synthetic Promoter Library for Modulation of Actinorhodin Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS One* 9, e99701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099701>
- Song, J., Li, M., Kang, N., Jin, W., Xiao, Y., Li, Z., Qi, Q., Zhang, J., Duan, Y., Feng, X., Lv, P., 2024. Baicalein ameliorates cognitive impairment of vascular dementia rats via suppressing neuroinflammation and regulating intestinal microbiota. *Brain Res Bull* 208, 110888. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.110888>
- Souagui, S., Djoudi, W., Boudries, H., Béchet, M., Leclère, V., Kecha, M., 2018. Modeling and Statistical Optimization of Culture Conditions for Improvement of Antifungal Compounds Production by *Streptomyces albidoflavus* S19 Strain of Wastewater Origin. *Antiinfect Agents* 17, 39–49. <https://doi.org/10.2174/2211352516666180813102424>
- Speedie, M.K., Park, M.O., 1980. Regulation of tyrosine biosynthesis by phenylalanine in anthramycin-producing *Streptomyces refuineus*. *J Antibiot (Tokyo)* 33, 579–584. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.579>

Referencias

- Suástegui, M., Shao, Z., 2016. Yeast factories for the production of aromatic compounds: from building blocks to plant secondary metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43, 1611–1624. <https://doi.org/10.1007/S10295-016-1824-9>
- Sun, C., Li, G., Li, H., Lyu, Y., Yu, S., Zhou, J., 2021. Enhancing Flavan-3-ol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 69, 12763–12772. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C04489/SUPPL_FILE/JF1C04489_SI_001.PDF
- Sun, J., Sun, W., Zhang, G., Lv, B., Li, C., 2022. High efficient production of plant flavonoids by microbial cell factories: Challenges and opportunities. *Metab Eng* 70, 143–154. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2022.01.011>
- Szybalski, W., Kim, S.C., Hasan, N., Podhajski, A.J., 1991. Class-II restriction enzymes--a review. *Gene* 100, 13–26. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90345-C](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90345-C)
- Tao, W., Yang, A., Deng, Z., Sun, Y., 2018. CRISPR/Cas9-based editing of *Streptomyces* for discovery, characterization, and production of natural products. *Front Microbiol* 9, 380454. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01660/BIBTEX>
- Tarhonskaya, H., Szöllösi, A., Leung, I.K.H., Bush, J.T., Henry, L., Chowdhury, R., Iqbal, A., Claridge, T.D.W., Schofield, C.J., Flashman, E., 2014. Studies on Deacetoxycephalosporin C Synthase Support a Consensus Mechanism for 2-Oxoglutarate Dependent Oxygenases. *Biochemistry* 53, 2483–2493. <https://doi.org/10.1021/bi500086p>
- 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>
- Tartik, M., Liu, J., Mohedano, M.T., Mao, J., Chen, Y., 2023. Optimizing yeast for high-level production of kaempferol and quercetin. *Microb Cell Fact* 22, 74. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02084-4>
- Tawani, A., Kumar, A., 2015. Structural Insight into the interaction of Flavonoids with Human Telomeric Sequence. *Sci Rep* 5, 17574. <https://doi.org/10.1038/srep17574>
- Thuan, N.H., Chaudhary, A.K., Van Cuong, D., Cuong, N.X., 2018. Engineering co-culture system for production of apigenin in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45, 175–185. <https://doi.org/10.1007/S10295-018-2012-X>
- Thuan, N.H., Tatipamula, V.B., Viet, T.T., Tien, N.Q.D., Loc, N.H., 2022. Bioproduction of eriodictyol by *Escherichia coli* engineered co-culture. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 112. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03294-5>
- Thuy, T.T., Thien, D.D., Quang Hung, T., Tam, N.T., Anh, N.T.H., Nga, N.T., Cuc, N.T., Mai, L.P., Van Sung, T., Delfino, D. V., Thao, D.T., 2016. *In vivo* anticancer activity of maesopsin 4-O- β -glucoside

- isolated from leaves of *Artocarpus tonkinensis* A. Chev. Ex Gagnep. Asian Pac J Trop Med 9, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.012>
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., Lee, S.Y., 2015. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. ACS Synth Biol 4, 1020–1029. https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.5B00038/SUPPL_FILE/SB5B00038_SI_001.PDF
- Torella, J.P., Lienert, F., Boehm, C.R., Chen, J.H., Way, J.C., Silver, P.A., 2014. Unique nucleotide sequence-guided assembly of repetitive DNA parts for synthetic biology applications. Nat Protoc 9, 2075–2089. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.145>
- Trantas, E., Panopoulos, N., Ververidis, F., 2009. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng 11, 355–366. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2009.07.004>
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S.L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B.G., Emwas, A.-H., Jaremko, M., 2020. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. Molecules 25, 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
- Vázquez, L., Flórez, A.B., Rodríguez, J., Mayo, B., 2021. Heterologous expression of equol biosynthesis genes from *Adlercreutzia equolifaciens*. FEMS Microbiol Lett 368. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab082>
- Verdan, A.M., Wang, H.C., García, C.R., Henry, W.P., Brumaghim, J.L., 2011. Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. J Inorg Biochem 105, 1314–1322. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2011.07.006>
- Visnagri, A., Kandhare, A.D., Chakravarty, S., Ghosh, P., Bodhankar, S.L., 2014. Hesperidin, a flavanoglycone attenuates experimental diabetic neuropathy via modulation of cellular and biochemical marker to improve nerve functions. Pharm Biol 52, 814–828. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.870584>
- Wainwright M, 1991. Streptomycin: discovery and resultant controversy. Hist Philos Life Sci 13, 97–124.
- Waksman, S.A., Schatz, A., 1946. Soil Enrichment and Development of Antagonistic Microorganisms. J Bacteriol 51, 305.
- Waksman, S.A., Schatz, A., Reynolds, D.M., 2010. Production of antibiotic substances by actinomycetes. Ann N Y Acad Sci 1213, 112–124. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2010.05861.X>
- Wang, J., Soisson, S.M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., Painter, R., Parthasarathy, G., Tang, Y.S., Cummings, R., Ha, S., Dorso, K., Motyl, M., Jayasuriya, H., Ondeyka, J., Herath, K., Zhang, C., Hernandez, L., Allocco, J., Basilio, Á., Tormo, J.R., Genilloud, O., Vicente, F., Pelaez,

Referencias

- F., Colwell, L., Lee, S.H., Michael, B., Felcetto, T., Gill, C., Silver, L.L., Hermes, J.D., Bartizal, K., Barrett, J., Schmatz, D., Becker, J.W., Cully, D., Singh, S.B., 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441, 358–361. <https://doi.org/10.1038/NATURE04784>
- Wang, L., Chen, M., Lam, P.-Y., Dini-Andreote, F., Dai, L., Wei, Z., 2022. Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome* 10, 233. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01420-x>
- Wang, L., Gao, M., Kang, G., Huang, H., 2021. The Potential Role of Phytonutrients Flavonoids Influencing Gut Microbiota in the Prophylaxis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Front Nutr* 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.798038>
- Wang, W., Li, X., Wang, J., Xiang, S., Feng, X., Yang, K., 2013. An Engineered Strong Promoter for *Streptomyces*. *Appl Environ Microbiol* 79, 4484. <https://doi.org/10.1128/AEM.00985-13>
- Wang, X., Li, Z., Policarpio, L., Koffas, M.A.G., Zhang, H., 2020. *De novo* biosynthesis of complex natural product sakuranetin using modular co-culture engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 4849–4861. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10576-1/METRICS>
- Wang, Y., Cobb, R.E., Zhao, H., 2016. High-Efficiency Genome Editing of *Streptomyces* Species by an Engineered CRISPR/Cas System. *Methods Enzymol* 575, 271–284. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2016.03.014>
- Wang, Y., Shi, Y., Li, K., Yang, D., Liu, N., Zhang, L., Zhao, L., Zhang, X., Liu, Y., Gao, L., Xia, T., Wang, P., 2021. Roles of the 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase Superfamily in the Flavonoid Pathway: A Review of the Functional Diversity of F3H, FNS I, FLS, and LDOX/ANS. *Molecules* 26, 6745. <https://doi.org/10.3390/molecules26216745>
- Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, Maureen J., Buttner, M.J., Bibb, Mervyn J., 1986. Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol Gen Genet* 203, 468–478. <https://doi.org/10.1007/BF00422072>
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., Marillonnet, S., 2011. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLoS One* 6, e16765. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016765>
- Wendt-Pienkowski, E., Huang, Y., Zhang, J., Li, B., Jiang, H., Kwon, H., Hutchinson, C.R., Shen, B., 2005. Cloning, sequencing, analysis, and heterologous expression of the fredericamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces griseus*. *J Am Chem Soc* 127, 16442–16452. <https://doi.org/10.1021/JA054376U>

- Wrolstad, R.E., 2004. Anthocyanin Pigments—Bioactivity and Coloring Properties. *J Food Sci* 69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x>
- Wu, G., Yan, Q., Jones, J.A., Tang, Y.J., Fong, S.S., Koffas, M.A.G., 2016. Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. *Trends Biotechnol* 34, 652–664. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2016.02.010>
- Wu, J., Du, G., Chen, J., Zhou, J., 2015. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 2015 5:1 5, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep13477>
- Wu, J., Zhang, X., Zhou, J., Dong, M., 2016. Efficient biosynthesis of (2S)-pinocembrin from d-glucose by integrating engineering central metabolic pathways with a pH-shift control strategy. *Bioresour Technol* 218, 999–1007. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.07.066>
- Wu, J., Zhou, L., Duan, X., Peng, H., Liu, S., Zhuang, Q., Pablo, C.M., Fan, X., Ding, S., Dong, M., Zhou, J., 2021. Applied evolution: Dual dynamic regulations-based approaches in engineering intracellular malonyl-CoA availability. *Metab Eng* 67, 403–416. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2021.08.004>
- Wu, J., Zhou, T., Du, G., Zhou, J., Chen, J., 2014. Modular Optimization of Heterologous Pathways for *De Novo* Synthesis of (2S)-Naringenin in *Escherichia coli*. *PLoS One* 9, e101492. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0101492>
- Wu, X., Liu, J., Liu, D., Yuwen, M., Koffas, M.A.G., Zha, J., 2022. Biosynthesis of eriodictyol from tyrosine by *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* 21, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01815-3/TABLES/2>
- Xu, M., Wang, Y., Zhao, Z., Gao, G., Huang, S.X., Kang, Q., He, X., Lin, S., Pang, X., Deng, Z., Tao, M., 2016. Functional Genome Mining for Metabolites Encoded by Large Gene Clusters through Heterologous Expression of a Whole-Genome Bacterial Artificial Chromosome Library in *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol* 82, 5795–5805. <https://doi.org/10.1128/AEM.01383-16>
- Xu, M., Wright, G.D., 2019. Heterologous expression-facilitated natural products' discovery in actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46, 415–431. <https://doi.org/10.1007/S10295-018-2097-2>
- Xu, P., Ranganathan, S., Fowler, Z.L., Maranas, C.D., Koffas, M.A.G., 2011. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA. *Metab Eng* 13, 578–587. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2011.06.008>
- Xu, T., Li, Yongchao, Shi, Z., Hemme, C.L., Li, Yuan, Zhu, Y., Van Nostrand, J.D., He, Z., Zhou, J., 2015. Efficient Genome Editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Appl Environ Microbiol* 81, 4423–4431. <https://doi.org/10.1128/AEM.00873-15>

Referencias

- Xue, L., Jin, X., Ji, T., Li, R., Zhuge, X., Xu, F., Quan, Z., Tong, H., Yu, W., 2023. Luteolin ameliorates DSS-induced colitis in mice via suppressing macrophage activation and chemotaxis. *Int Immunopharmacol* 124, 110996. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110996>
- Yagüe, P., López-García, M.T., Rioseras, B., Sánchez, J., Manteca, Á., 2013. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett* 342, 79–88. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12128>
- Yagüe, P., Willemse, J., Koning, R.I., Rioseras, B., López-García, M.T., Gonzalez-Quiñonez, N., Lopez-Iglesias, C., Shliaha, P. V., Rogowska-Wrzesinska, A., Koster, A.J., Jensen, O.N., van Wezel, G.P., Manteca, Á., 2016. Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces* hyphae. *Nat Commun* 7, 12467. <https://doi.org/10.1038/ncomms12467>
- Yahaya, Y.A., Don, M.M., 2014. Flavonoid production by *T. lactinea*: screening of culture conditions via OFAT and optimization using response surface methodology (RSM). *J Korean Soc Appl Biol Chem* 57, 749–757. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4246-2>
- Yan, Y., Kohli, A., Koffas, M.A.G., 2005. Biosynthesis of Natural Flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 71, 5610. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5610-5613.2005>
- Yang, C., Du, Y., Ren, D., Yang, X., Zhao, Y., 2021. Gut microbiota-dependent catabolites of tryptophan play a predominant role in the protective effects of turmeric polysaccharides against DSS-induced ulcerative colitis. *Food Funct* 12, 9793–9807. <https://doi.org/10.1039/D1FO01468D>
- Yee, L., Blanch, H.W., 1993. Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol Bioeng* 41, 221–230. <https://doi.org/10.1002/BIT.260410208>
- Yokosuka, K., Rutledge, C., Kamio, Y., Kuwabara, A., Sato, H., Rahmani, R., Purcell, J., Eguchi, S., Baranoski, J.F., Margaryan, T., Tovmasyan, A., Ai, J., Lawton, M.T., Hashimoto, T., 2021. Roles of Phytoestrogen in the Pathophysiology of Intracranial Aneurysm. *Stroke* 52, 2661–2670. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032042>
- Yu, S., Li, M., Gao, S., Zhou, J., 2022. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the production of dihydroquercetin from naringenin. *Microb Cell Fact* 21, 213. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01937-8>
- Zaburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., 2014. Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *BMC Genomics* 15, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-97/FIGURES/6>
- Zeng, H., Wen, S., Xu, W., He, Z., Zhai, G., Liu, Y., Deng, Z., Sun, Y., 2015. Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 10575–10585. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-6931-4>

- Zha, J., Koffas, M.A.G., 2017. Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: Current status and perspectives. *Synth Syst Biotechnol* 2, 259–266. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2017.10.005>
- Zha, J., Wu, X., Gong, G., Koffas, M.A.G., 2019. Pathway enzyme engineering for flavonoid production in recombinant microbes. *Metab Eng Commun* 9, e00104. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00104>
- Zha, J., Zang, Y., Mattozzi, M., Plassmeier, J., Gupta, M., Wu, X., Clarkson, S., Koffas, M.A.G., 2018. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anthocyanin production. *Microb Cell Fact* 17, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-0990-Z/FIGURES/7>
- Zhang, M.M., Wong, F.T., Wang, Y., Luo, S., Lim, Y.H., Heng, E., Yeo, W.L., Cobb, R.E., Enghiad, B., Ang, E.L., Zhao, H., 2017. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol* 13, 607–609. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.2341>
- Zhang, Q., Yu, S., Lyu, Y., Zeng, W., Zhou, J., 2021. Systematically Engineered Fatty Acid Catabolite Pathway for the Production of (2S)-Naringenin in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol* 10, 1166–1175. https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.1C00002/SUPPL_FILE/SB1C00002_SI_001.PDF
- Zhang, Q., Zheng, G., Wang, Q., Zhu, J., Zhou, Z., Zhou, W., Xu, J., Sun, H., Zhong, J., Gu, Y., Yin, Z., Du, Y., Du, J., 2022. Molecular mechanisms of flavonoid accumulation in germinating common bean (*Phaseolus vulgaris*) under salt stress. *Front Nutr* 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.928805>
- Zhang, X., Lu, C., Bai, L., 2017. Conversion of the high-yield salinomycin producer *Streptomyces albus* BK3-25 into a surrogate host for polyketide production. *Sci China Life Sci* 60, 1000–1009. <https://doi.org/10.1007/S11427-017-9122-8/METRICS>
- Zhao, Y., Li, L., Zheng, G., Jiang, W., Deng, Z., Wang, Z., Lu, Y., 2018. CRISPR/dCas9-Mediated Multiplex Gene Repression in *Streptomyces*. *Biotechnol J* 13. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201800121>
- Zhou, S., Hao, T., Zhou, J., 2020. Fermentation and Metabolic Pathway Optimization to *De Novo* Synthesize (2S)-Naringenin in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 30, 1574–1582. <https://doi.org/10.4014/jmb.2008.08005>
- Zhu, S., Wu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J., 2014. Efficient Synthesis of Eriodictyol from L-Tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 80, 3072–3080. <https://doi.org/10.1128/AEM.03986-13>
- Zuiter, A.S., 2014. Proanthocyanidin: Chemistry and Biology: From Phenolic Compounds to Proanthocyanidins, in: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11046-7>

ANEXOS

Supplementary Figures

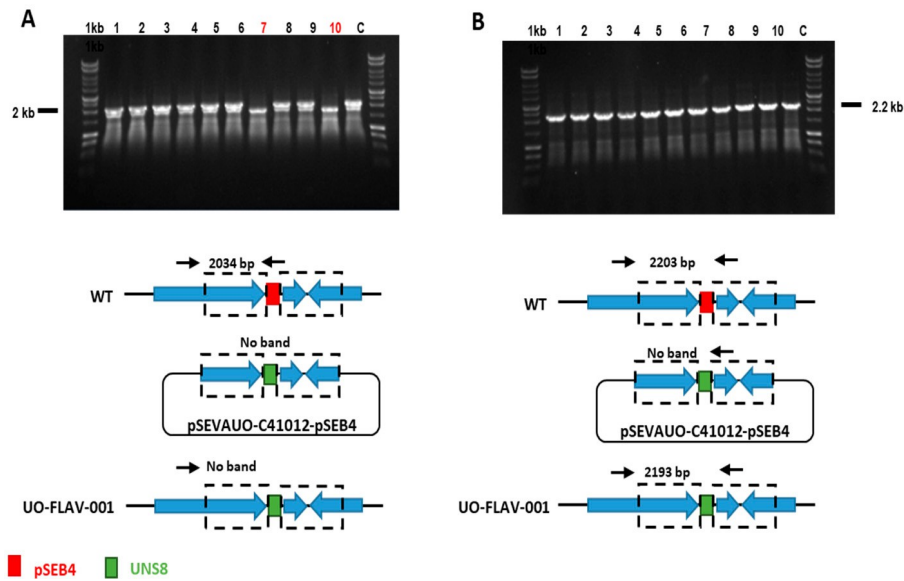


Figure S1: Generation of *S. albidoflavus* UO-FLAV-001 strain. **A)** Agarose gel and graphical representation of PCR verification of pSEB4 replacement by UNS8 with primers pSEB4 del check fw and pSEB4 prot fw. Positive colonies are shown in red. **B)** Agarose gel and graphical representation of PCR amplification of a genome region containing the desired modification. Primers used were pSEB4 del check fw and pSEB4 del check rev. 1kb: PCRBIO Ladder II, C: *S. albidoflavus* J1074, WT: wild-type.

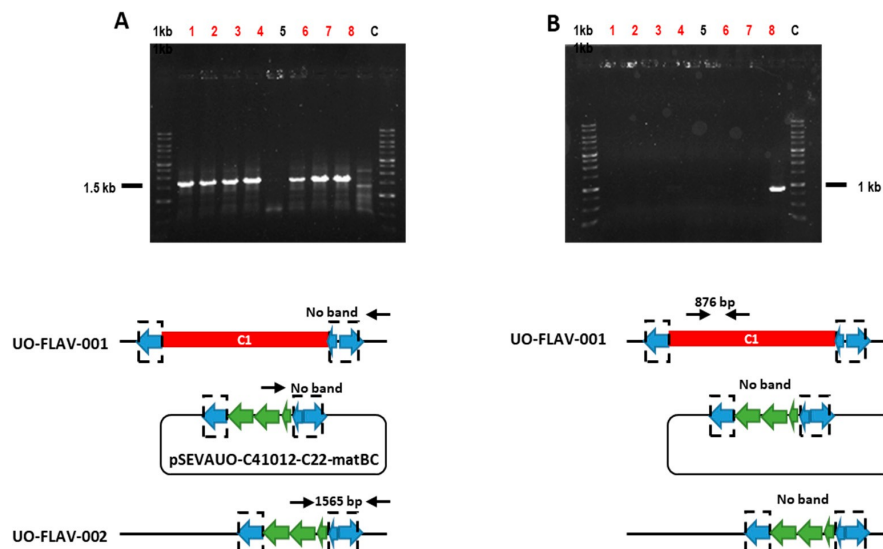


Figure S2: Generation of *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 strain. **A)** Agarose gel and graphical representation of PCR verification of C22 replacement by *Perme**-*matBC* with primers C1*matBC* check fw and C1*matBC* check rev. Positive colonies are shown in red. **B)** Agarose gel and graphical representation of PCR amplification of a genome region within C22 to check presence of non-edited DNA. Primers used were C1 check fw and C1 check rev. 1kb: PCRBIO Ladder II, C: *S. albidoflavus* UO-FLAV-001.

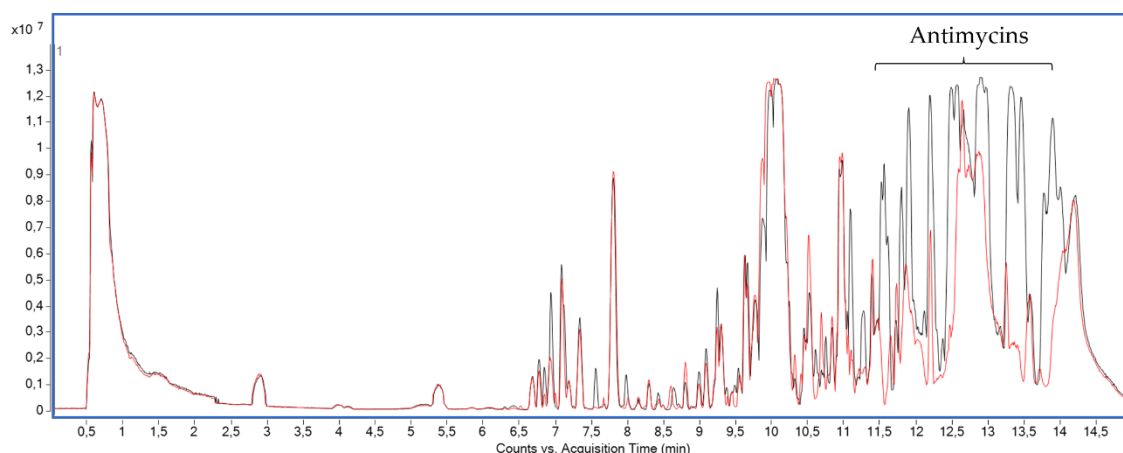


Figure S3. LC-HRESIMS base peak chromatogram (BPC) of *S. albidoflavus* WT (black) and *S. albidoflavus* UO-FLAV-002 (red) from cultures in R5A for 144 h. Antimycin peaks are shown.

Supplementary Tables

Table S1. Plasmids used in this work.

Plasmid	Use in this work	Reference or source
pCRISPomyces-2	Source of <i>pSG5</i> and <i>cas9-sgRNA</i>	[1]
pSG5c	Source of <i>pSG5c</i> with silent point mutations	This study
pCas9c	Source of <i>cas9c-sgRNA</i> with silent point mutations	This study
PCR TM -Blunt II-TOPO [®]	Fragments sub-cloning	Invitrogen
pSETEc	Source of <i>P_{ermE*}</i> and <i>oriT-traJ</i>	[2]
pCR-Blunt-cas9c	Sub-cloning of <i>cas9c</i>	This study
pCR-Blunt- <i>Perme*</i> -cas9c	Source of <i>P_{ermE*}-cas9c-sgRNA</i>	This study
pSEVA88c1	Source of AmR, pUC and cargo	[3]
pGM1190	Source of TsrR nucleotide sequence	[4]
pSEVA181Thio	Source of TsrR	EXPLORA
pCRBluntTsr	Sub-cloning of TsrR	This study
pSEVA182	Source of ApR	[5]
pCRBluntAp-Tsr	Source of ApR-TsrR	This study
pSEVA23a1	Source of KmR	[3]
pSEVA181Hyg	Source of HygR	EXPLORA
pSEVA181BT1int	Source of ϕ BT1 integrase	EXPLORA
pSEVAUO-21002	Receptor vector (<i>pUC-ϕBT1-Am</i>) for cargo cloning	This study
pSEVA23g19g1	Source of Cargo 1AI2	[6]
pSEVA23g19g2	Source of Cargo 2AI3	[6]
pSEVA23g19g3	Source of Cargo 3AI4	[6]
pSEVA23g19g4	Source of Cargo 4AI5	[6]
pSEVA63g19gA	Source of Cargo A13B	[6]
pSEVA63g19gB	Source of Cargo B14C	[6]
pSEVA63g19gC	Source of Cargo C15D and GmR	[6]
pSEVA28a1	Source of ϕ C31 integrase	[3]

pPhiC31c	Source of ϕ C31 integrase with silent point mutations	This study
pCRBluntAmR	Sub-cloning of AmR	This study
pCRBluntApR-AmR	Source of ApR-AmR	This study
pSEVAUO-21003	Receptor vector (<i>pUC-ϕBT1-Ap-Am</i>) for cargo cloning	This study
pCRBluntGm-Tsr	Source of GmR-TsrR	This study
pSEVAUO-11001	Receptor vector (<i>pUC-ϕC31-Ap-Am</i>) for cargo cloning	This study
pSEVA181pSAM2	Source of pSAM2 integrase	This study
pSEVA88c1- <i>PermE*</i> -Ind-HA	Source of HA for <i>P_{ermE*}</i> cloning upstream indigoidine BGC	This study
<i>pmatBC</i>	Source of <i>matBC</i>	EXPLORA
pSEVA28b- <i>P_{ermE*}</i> -APIGC	Source of <i>P_{ermE*}</i> -RBS, <i>TAL</i> and <i>4CL</i>	[3]
pSEVA181permE	Source of <i>P_{ermE*}</i> (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pSEVA181SF14	Source of <i>SF14</i> (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pSEVA181SP25	Source of <i>SP25</i> (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pSEVA181SP43	Source of <i>SP43</i> (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pSEVA181RiboJ-RBS	Source of RiboJ-RBS (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pSEVA181TAL	Source of <i>TAL</i> cured (Level 0 MoClo)	This study
pSEVA1814CL	Source of <i>4CL</i> cured (Level 0 MoClo)	This study
pSEVA181CHS	Source of <i>CHS</i> (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pSEVA181CHI	Source of <i>CHI</i> (Level 0 MoClo)	EXPLORA
pIDTSMARTttsbib	Source of <i>ttsbib</i> (Level 0 MoClo)	IDT
pSEVA181F3'H-CPR	Source of F3'H-CPR chimaera	EXPLORA
pCRBluntAm-Tsr	Source of AmR-TsrR	This study
pSEVAUO-M21202F3'H-CPR	Sub-cloning of F3'H-CPR transcription unit	This study

Table S2. Strains used in this work.

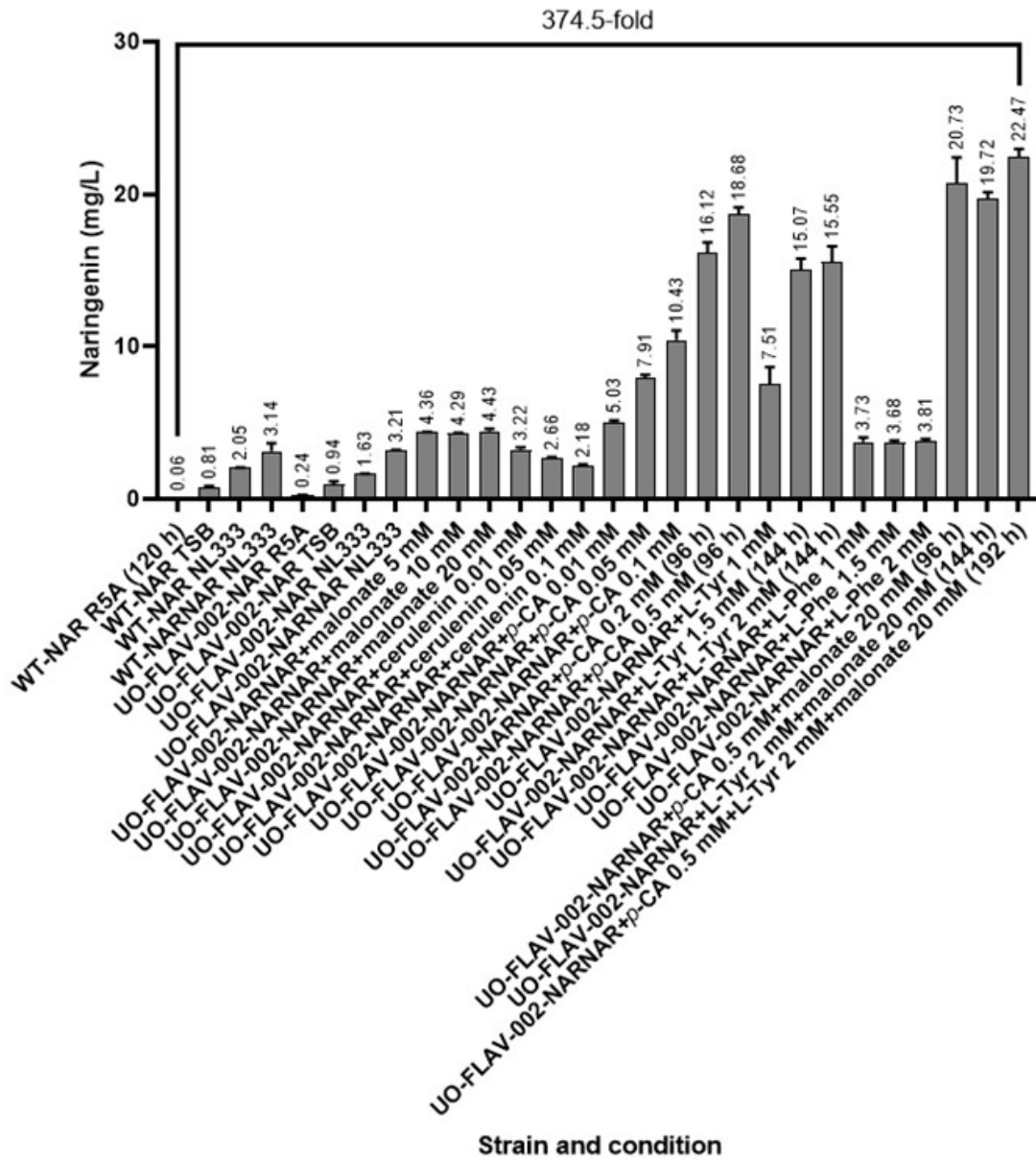
Strain	Use in this work	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> Top10	Routine sub-cloning and DNA propagation	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>oriT</i> -containing plasmids delivery to <i>S. albidoflavus</i> through conjugation	[7]
<i>Streptomyces albidoflavus</i> J1074	Source of DNA and parental strain for chassis generation and flavonoid production	[8]
<i>S. albidoflavus</i> M11701	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with plasmid pSEVAUO-M11701 integrated into ϕ C31 site	This study
<i>S. albidoflavus</i> M21703	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with plasmid pSEVAUO-M21703 integrated into ϕ BT1 site	This study
<i>S. albidoflavus</i> M31705	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with plasmid pSEVAUO-M31705 integrated into pSAM2 site	This study
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-001	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with <i>pseB4</i> replaced by UNS8	This study
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-001 with antimycin BGC-candicidin BGC-unknown NRPS/PKS BGC replaced by <i>PermE*-matBC</i>	This study
<i>S. albidoflavus</i> WT-NAR	<i>S. albidoflavus</i> J1074 with naringenin BGC integrated into ϕ C31 site	This study
<i>S. albidoflavus</i> WT-ERI	<i>S. albidoflavus</i> WT-NAR with F3'H-CPR integrated into ϕ BT1 site	This study
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002-NAR	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002 with naringenin BGC integrated into ϕ C31 site	This study
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002-ERI	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-002-NAR with F3'H-CPR integrated into ϕ BT1 site	This study

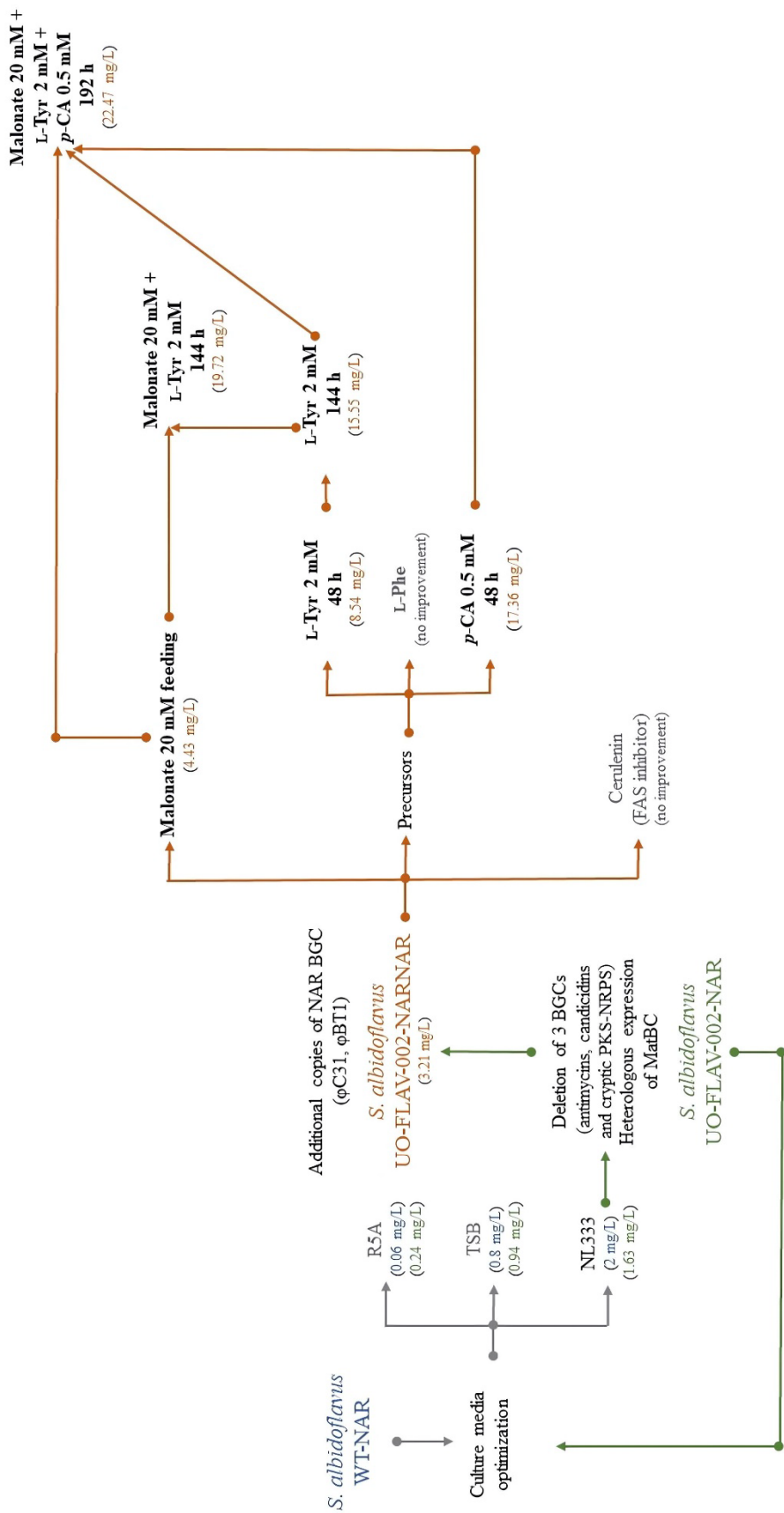
Table S3. Primers used in this study.

Primer	Sequence 5' – 3'
pSG5c F1 fw	ctgaaggtcctcaatcgactggaacatcaaggtcgctgTTTCATAGGCTCCGCCC
pSG5c F1 rev	CGCCGGAAGGCCAACGAG
pSG5c F2 fw	ggccagctcctccgtgcgggcctctggccttccggcggGCCTCGCGGAAAGCAGC TTC
pSG5c F2 rev	tgcagctcgcccgacggaCTCGCGGACGCCGGGTAC
pSG5c F3 fw	ccgtaccggcgtccgagctCCGTCCGGCGGCGAGCTGC
pSG5c F3 rev	gaggcgttaaggggtcgcgACCCGGCTCACTGCCGGG
pSG5c F4 fw	tcccggcagtgcggggtgCCGCAGCCCTTGAACGCC
pSG5c F4 rev	cgaccttgatgttccagtgcgattgaggaccttcagtgcgctagcATGCCAGGATCAAC AGGAC
cas9c F5 fw	tttctgctccttcggtcgcACGTGCGTCTACGGGCAC
cas9c F2 rev	atgcctcgggtcacgtacttACCTTGGTCAGCTCGTTG
cas9c F3 fw	acaacgagctgaccaaggtgAAGTACGTGACCGAGGGC
cas9c F3 rev	aagccgctacttcttgggaTCCCAGTCCTTCTCCGG
cas9c F4 fw bis	cccgaagaaggactgggaTccgaagaagtacggcggc
cas9c F4 rev	aggtgccgtagacgcacgtgCGACCGAAGGAGCAGCAAAAAAAG
cas9c F2 fw	ggtgggtaaccaggctaacctcccgtaggaggacgacaATGGACAAGAAGTACA GCATC
cas9c F5 rev	ctctaacggacttgagtgaggttgtaaaggagttggctcTAAAAACGCCCGGCGG C
CRISPR F1 UNS1 fw bis	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTCCTTTT CCGCTGCATAACCC
CRISPR F1 UNS2 rev	GCTTGGATTCTGCGTTTGTTCGCTACGAACTCCCAGCtcatggc tctgcctcgg
CRISPR F2 UNS2 fw	GCTGGGAGTTCGTAGACGGAACAAACGCAGAATCCAAGCGG CCGGCCctacgcgaccgtgtgtega
CRISPR F3 UNS3 fw	GCACTGAAGTCTCAATCGCACTGGAAACATCAAGGTCCGaggc caggaaccgtaaaa
CRISPR F3 UNS4 rev bis	GACTTTGCGTGTGTCTTACTATTGCTGGCAGGAGGTCAGgggac cctctgaacaaatccagatg
CRISPR F4 UNS4 fw	CTGACCTCCTGCCAGCAATAGTAAGACAACACGCAAAGTCCG AGTGTCCGTTGAGTGG
CRISPR F5Apra UNS5 fw	GAGCCAACTCCCTTTACAACCTCACTCAAGTCCGTTAGAGatttaa atCTCACGGTAACT
CRISPR F5Apra UNS1 rev	GAGACGAGACGAGACAGCCTGAGAATGGATGCGAGTAATGgac cgcCgtcTCAGCCAATCGACTG
UNS1 rev	GAGACGAGACGAGACAGCCTGAGAATG
UNS5 fw	GAGCCAACTCCCTTTACAACCTCACTC
cas9 D10A fw	gaagtacagcatcgctggCcatcggcaccaacagcgtg
cas9 D10A rev	cacgctgttggtgccgatgGccaggccgatgtgtacttc
UNS2 fw	GCTGGGAGTTCGTAGACG
UNS3 rev	CGACCTTGATGTTTCCAG
Cargo UNS5 rev	ctctaacggacttgagtgaggttgtaaaggagttggctcgggacctctgaacaaatccagatg
PhiC31 GA F2 fw	ccaccaggaaggcgtGttccgaccaggcaacgtg
PhiC31 GA F2 rev	ccgttccgggtgatctccttCgtctcggacaccagctcg
PhiC31 GA F3 fw	cgagctggtgtccgagacGaaggagatcacccggaacgg
PhiC31 GA F3 rev	cccaggcggagctggcggTtcttgccgatCgtctcggcggggtgg
PhiC31 GA F4 fw	ggcgagacGatcggcaagaaAaccgacgctccgctggg

PhiC31 GA F4 rev	ctcccagagcagggccagCgtctctctgctgccctcg
PhiC31 GA F5 fw	cgagggcgacgaggagacGctggcctgctctgggag
PhiC31 GA F5 rev	cacgaacaggcccacgaaCacccgctgtctccacg
PhiC31 GA F6 fw	cgtggacgacaagcgggtGttcgtgggctgtctgtg
PhiC31 GA F1 rev	cacgttgccctggcggaaCacgccttctgggtgg
PhiC31 GA F1 fw	CGACCTTGATGTTTTCCAGTGCGATTGAGGACCTTCAGTGCGCTA GCcttcagacgtggcagatg
PhiC31 GA F6 rev	GCTGGGAGTTCGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGCGG CCGGCCtcaagccgccagctctc
Ind Prot fw	ACGCatcgtgcgaggtgaactcat
Ind Prot rev	AAACatgagttcacctgcacgat
Vector fw	AAGCTTGCGGCCGCGTCG
Vector rev	CCTAGGCGGCCTCCTGTG
Ind CRISPR F1 fw	gtcgccagggttttcccagtcacgacgcggccgcaagcttttcatggtgcccgcatc
Ind CRISPR F1 rev	ATCCTCCCCGCACCTCTCGCCAGCCGTCAAGATCGACTCCgctg gtcgccctgttg
Ind CRISPR F2 fw	TGTGGGCACAATCGTGCCGTTGGTAGGATCTAGCGTACTccatg agttcacctcgac
Ind CRISPR F2 rev	attaaagcggataacaatttcacacaggaggccgctaggaactccagcacctcgacg
pSEB4 prot fw	ACGCGAGAGCCGTACGTCTCGCCC
pSEB4 prot rev	AAACGGGCGAGACGTACGGCTCTC
pSEB4 F1 UNS7 fw	CAAGACGCTGGCTCTGACATTTCCGCTACTGAACTACTCGCCT CGCAGTACGACGTGG
pSEB4 F1 UNS8 rev	CCAGGTGGTTGATGGGTTGATTGCTTTGGTTGAGACGAGGGTCT CCGTCTACCCCCGC
pSEB4 F2 UNS8 fw	CCTCGTCTCAACCAAAGCAATCAACCCATCAACCACCTGGTTG TCGGTCCCGTCCCCT
pSEB4 F2 UNS6 rev	TATGTGACCGTAGAGTATTCTTAGGTGGCAGCGAACGAGTGTC GGTATCCATCGGCG
pSEVA-CRISPR UNS7 rev	CGAGTAGTTCAGTAGCGGAAATGTCAGAGCCAGCGTCTTGAG GCATCAAATAAAACGA
CRISPR F1 UNS1 fw bis	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTCCTTTT CCGCTGCATAACCC
pSEVA-CRISPR UNS6 fw	CTCGTTGCTGCCACCTAAGAATACTCTACGGTCACATACCTTG GACTCCTGTTGATA
C1 F2 fw	CACTCGAACGGACACTCGTGGGCGGTCTCCTTGAGGTC
C1 F2 rev	GTCGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCGGCCGCAAGCTTCAG ACTCCGCCGGGAGAC
matBC rev	GGGACCTCAAGGAGACCGCCACGAGTGTCCGTTTCGAG
cas9c F1 rev	TGTCGTCTCCTACGGGAG
matBC BglII GA fw	ccggttgtaggaggacgaagatctcaggaggcagacaaatgtc
matBC fw	ACGCGCTGGTCTTGGCGTCCATATGTTTTTTACACCAGGCC
C1 F1 fw	attaaagcggataacaatttcacacaggaggccgctaggaactggtgacgagcg
C1 F1 rev	CCTGGTGTAaaaaCATATGgacggcaaggaccagcgc
TAL GA F1 fw	GCGGCCGCGGAATTTCGAGCTCGGTACCCggtctcaAATGATGAC CCTCCAGTCCCAGAC
TAL GA F1 rev	GTCCTGGGCGGGTGGTcTCGGGGCGGAGGTCCGGC
TAL GA F2 fw	GCCGACCTCCGCCCCGAgGACCACCCCGCCAGGAC
TAL GA F2 rev	GAAGCCGACTGGAGGCCcGCCTGGCCACCGTGGAGG
TAL GA F3 fw	CCTCCACGGTGGCCAGGCgGGCCTCCAGTCCGGCTTC
TAL GA F3 rev	GCTGAGGGACTGGACGGAGACgGGGGTGGCGTTCCGCGCG

TAL GA F4 fw	CGCGCGAACGCCACCCCcGTCTCCGTCCAGTCCCTCAGC
TAL GA F4 rev	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCggtctcaAAGCctagggcg gggggtcgg
pSEVA181 fw	GGGGATCCTCTAGAGTCG
pSEVA181 rev	GGGTACCGAGCTCGAATT
4CL GA F1 fw	GCGGCCGCGCGAATTTCGAGCTCGGTACCCggtctcaAATGatgttccgg tcggagtacg
4CL GA F1 rev	gtcgcccttgcgcagccCgtctccgccagtgcggc
4CL GA F2 fw	gccgcactggcggagacGggcgtgcgcaagggcgac
4CL GA F2 rev	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCggtctcaAAGCtcagcggg gctcgcggag
Prot seq rev	caaatccagatggagtaa
pSEB4 del check fw	AGCTGGACCAACGCCACC
pSEB4 del check rev	CGGCTCCACGTGACCAC
C1matBC check fw	catctcccagctcctcc
C1matBC check rev	tggtgtcgatgcggatgaac
C1 check fw	atgcgcctggacctgaac
C1 check rev	TCACAGCCTGACATGGGTG
PermE fw	TCGATCTTGACGGCTGGC
PermE Ind check rev	caggaccccgagcatgtg





*Supplementary Material***1 Supplementary Tables****Supplementary Table 1.** Primers used in this study.

Primer	Sequence 5'-3'
UNS5 fw	GAGCCA ACTCCCTTTACAACCTCACTC
UNS1 rev	GAGACGAGACGAGACAGCCTGAGAATG
Cargo UNS5 rev	CTCTAACGGACTTGAGTGAGGTTGTAAAGGGAGTTGG CTCGGGACCCTCTGAACAAATCCAGATG
pBBR1 UNS3 fw	GCACTGAAGGTCCTCAATCGCACTGGAAACATCAAG GTCGCTACCGGCGCGGCAGCGTT
UNS2 fw	GCTGGGAGTTCGTAGACG
UNS3 rev	CGACCTTGATGTTTCCAG
CRISPR F1 UNS1 fw bis	CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTC TCCTTTTCCGCTGCATAACCC
CRISPR F1 UNS2 rev	GCTTGGATTCTGCGTTTGTTCGCTCTACGAACTCCCA GTCATGGCTCTGCCCTCGG

Supplementary Table 2. Plasmids and strains used in this work (Ap^R: ampicillin-resistance; Tsr^R: thioestrepton-resistance; Am^R: apramycin-resistance).

Plasmid	Use in this work	Reference or source
pCRBluntAm-Tsr	Source of Am-Tsr ^R	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVA23g19g1	Source of pBBR1 and 1A12 gadget	(Blázquez et al., 2023)
pSEVAUO-21003	Source of ϕ BT1 integrase	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVAUO-C41012	Source of oriT-traJ	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVAUO-M22106	Golden Standard level 1 receptor vector (pBBR1- ϕ BT1-Am/Tsr ^R -1A12) for cargo cloning	This work (OR820616)
pSEVA181SP25	Source of SP25 (Level 0 Golden Standard)	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVA181SP43	Source of SP43 (Level 0 Golden Standard)	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVA181RiboJ-RBS	Source of RiboJ-RBS (Level 0 Golden Standard)	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pIDTSMARTttsbib	Source of ttsbib (Level 0 Golden Standard)	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVA181PcF3H	Source of PcF3H (Level 0 Golden Standard)	EXPLORA
pSEVA181MdF3H	Source of MdF3H (Level 0 Golden Standard)	EXPLORA
pSEVA181CsF3H	Source of CsF3H (Level 0 Golden Standard)	EXPLORA
pSEVAUO-M22106-PcF3H	pBBR1- ϕ BT1-Am-Tsr ^R . Level 1 Golden Standard plasmid containing [SP25]-PcF3H	This work
pSEVAUO-M22106-MdF3H	ϕ BT1, pBBR1, Am-Tsr ^R . Level 1 Golden Standard plasmid containing [SP25]-MdF3H	This work
pSEVAUO-M22106-CsF3H	ϕ BT1, pBBR1, Am-Tsr ^R . Level 1 Golden Standard plasmid containing [SP25]-CsF3H	This work
pSEVAUO-M21206-F3'H-CPR	ϕ BT1, pUC, Am-Tsr ^R . Level 1 Golden Standard plasmid containing [SF14]-F3'H/CPR	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVAUO-M21503	Golden Standard level 2 receptor vector (pUC- ϕ BT1-Ap-Tsr ^R -A13B) for cargo cloning	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVAUO-M21503-PcF3H-F3'H/CPR	pUC- ϕ BT1-Ap-Tsr ^R . Level 2 Golden Standard plasmid containing [SP25]-PcF3H-[SF14]-F3'H/CPR	This work
pSEVAUO-M21503-CsF3H-F3'H/CPR	pUC- ϕ BT1-Ap-Tsr ^R . Level 2 Golden Standard plasmid containing [SP25]-CsF3H-[SF14]-F3'H/CPR	This work
pSEVAUO-M21302	Golden Standard level 1 receptor vector (pUC- ϕ BT1-Am ^R -3A14) for cargo cloning	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVA181ErCHI	Source of ErCHI (Level 0 Golden Standard)	EXPLORA
pSEVAUO-M21302-ErCHI	pUC- ϕ BT1-Am ^R -3A14. Level 1 Golden Standard plasmid containing [SP43]-ErCHI	This work
pSEVAUO-M21603	Golden Standard level 2 receptor vector (pUC- ϕ BT1-Ap-Tsr ^R -B14C) for cargo cloning	(Magadán-Corpas et al., 2023)
pSEVAUO-M21603-PcF3H-F3'H/CPR-ErCHI	pUC- ϕ BT1-Ap-Tsr ^R -B14C. Level 2 Golden Standard plasmid containing [SP25]-PcF3H-[SF14]-F3'H/CPR-[SP43]-ErCHI	This work
Strain	Use in this work	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> Top10	Routine sub-cloning and DNA propagation	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	Routine conjugation	Life Science

<i>Escherichia coli</i> JM109 pTI2	<i>E. coli</i> strain carrying <i>Er</i> CHI for the co-cultures	(Braune et al., 2016)
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004	<i>S. albidoflavus</i> J1074 lacking the pseudo-attB site for the ϕ C31 recombination system and with 3 BGCs deleted by CRISPR/Cas9	(Pérez-Valero et al., 2023)
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-M21302	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004 with pSEVAUO-M21302 empty receptor vector integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004- <i>Er</i> CHI	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004 with <i>Er</i> CHI integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004 with naringenin BGC integrated into ϕ C31 site	(Pérez-Valero et al., 2023)
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR-M22106	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with pSEVAUO-M22106 empty receptor vector integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR-M21503	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with pSEVAUO-M21503 empty receptor vector integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-PcARO	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with <i>Pc</i> F3H integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-MdARO	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with <i>Md</i> F3H integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-CsARO	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with <i>Cs</i> F3H integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-PcTAX	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with <i>Pc</i> F3H-F3'H/CPR integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-CsTAX	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with <i>Cs</i> F3H-F3'H/CPR integrated into ϕ BT1 site	This work
<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-ALPH	<i>S. albidoflavus</i> UO-FLAV-004-NAR with <i>Pc</i> F3H-F3'H/CPR- <i>Er</i> CHI integrated into ϕ BT1 site	This work

2 Supplementary Data

Plasmid construction

Construction of Golden Standard level 1 pSEVAUO-M22106 receptor vector

This plasmid was assembled as part of the plasmid library developed in our group for its use in *Streptomyces* (Magadán-Corpas et al., 2023). The Am-Tsr antibiotic resistance marker cassette, conferring resistance to apramycin and thiostrepton, was amplified from pCRBluntAm-Tsr (Magadán-Corpas et al., 2023) with primers “UNS5 fw” and “UNS1 rev”. Gadget 1AI2 for Golden Standard assembly and *E. coli* pBBR1 origin of replication were amplified together from plasmid pSEVA23g19g1 (Magadán-Corpas et al., 2023) with primers “Cargo UNS5 rev” and “pBBR1 UNS3 fw”. Integrase ϕ BT1 was amplified from plasmid pSEVAUO-21003 (Magadán-Corpas et al., 2023) with primers “UNS2 fw” and “UNS3 rev”. oriT-traJ for conjugation was amplified from plasmid pSEVAUO-C41012 (Magadán-Corpas et al., 2023) with primers “CRISPR F1 UNS1 fw bis” and “CRISPR F1 UNS2 rev”. Finally, a 4 fragment Gibson assembly was performed to give rise to the level 1 receptor vector pSEVAUO-M22106. This sequence data has been submitted to the GenBank databases under accession number OR820616.

Construction of pSEVAUO-M22106-PcF3H, pSEVAUO-M22106-MdF3H and pSEVAUO-M22106-CsF3H

Enzymes PcF3H, MdF3H and CsF3H were codon optimized, prepared for Golden Standard assembly and ordered synthetic as level 0 plasmids. These genes were assembled as Golden Standard level 1 plasmids. Level 1 plasmids were generated from level 1 receptor plasmid pSEVAUO-M22106, level 0 plasmids pSEVA181SP25, pSEVA181RiboJ-RBS, pIDTSMARTtsbib (Magadán-Corpas et al., 2023) and the corresponding level 0 for each CDS (pSEVA181PcF3H, pSEVA181MdF3H or pSEVA181CsF3H).

Construction of pSEVAUO-M21503-PcF3H-F3'H/CPR and pSEVAUO-M21503-CsF3H-F3'H/CPR

Level 1 Golden Standard plasmids pSEVAUO-M22106-PcF3H and pSEVAUO-M22106-CsF3H were individually assembled together with the level 1 pSEVAUO-M21206-F3'H-CPR plasmid (Magadán-Corpas et al., 2023), into the pSEVAUO-M21503 level 2 receptor vector (Magadán-Corpas et al., 2023), yielding plasmids pSEVAUO-M21503-PcF3H-F3'H/CPR and pSEVAUO-M21503-CsF3H-F3'H/CPR.

Construction of pSEVAUO-M21603-PcF3H-F3'H/CPR-ErCHI

Enzyme ErCHI was codon optimized for Golden Standard assembly and ordered synthetic as a level 0 plasmid. This gene was assembled as a Golden Standard level 1 plasmid. Level 1 plasmid pSEVAUO-M21302-ErCHI was generated from level 1 receptor vector pSEVAUO-M21302 and level 0 plasmids pSEVA181SP43, pSEVA181RiboJ-RBS, pSEVA181ErCHI and pIDTSMARTtsbib. The level 2 pSEVAUO-M21603-PcF3H-F3'H/CPR-ErCHI plasmid was assembled in a single Golden Standard reaction from level 2 receptor plasmid pSEVAUO-M21603 (Magadán-Corpas et al., 2023) and level 1 plasmids pSEVAUO-M22106-PcF3H, pSEVAUO-M21206-F3'H-CPR and pSEVAUO-M21302-ErCHI.

Sequences of promoters, rbs-riboJ and terminator

Promoter SF14 (5'-3'):

CCTATCCAGGAGATATTATGAGTTACGTAGACCTACGCCTTGACCTTGATGAGGCGGC
GTGAGCTACAATCAATACTCGATT

Promoter SP25 (5'-3'):

TGTTACATTCGAACCGTCTCTGCTTTGACAGAGGTAGGCACGCTCATGTAAAGTCGT
GGCC

Promoter SP43 (5'-3'):

TGTTACATTCGAACCGTCTCTGCTTTGACACGGACAAGCGCTATGGTGTAAAGTCGT
GGCC

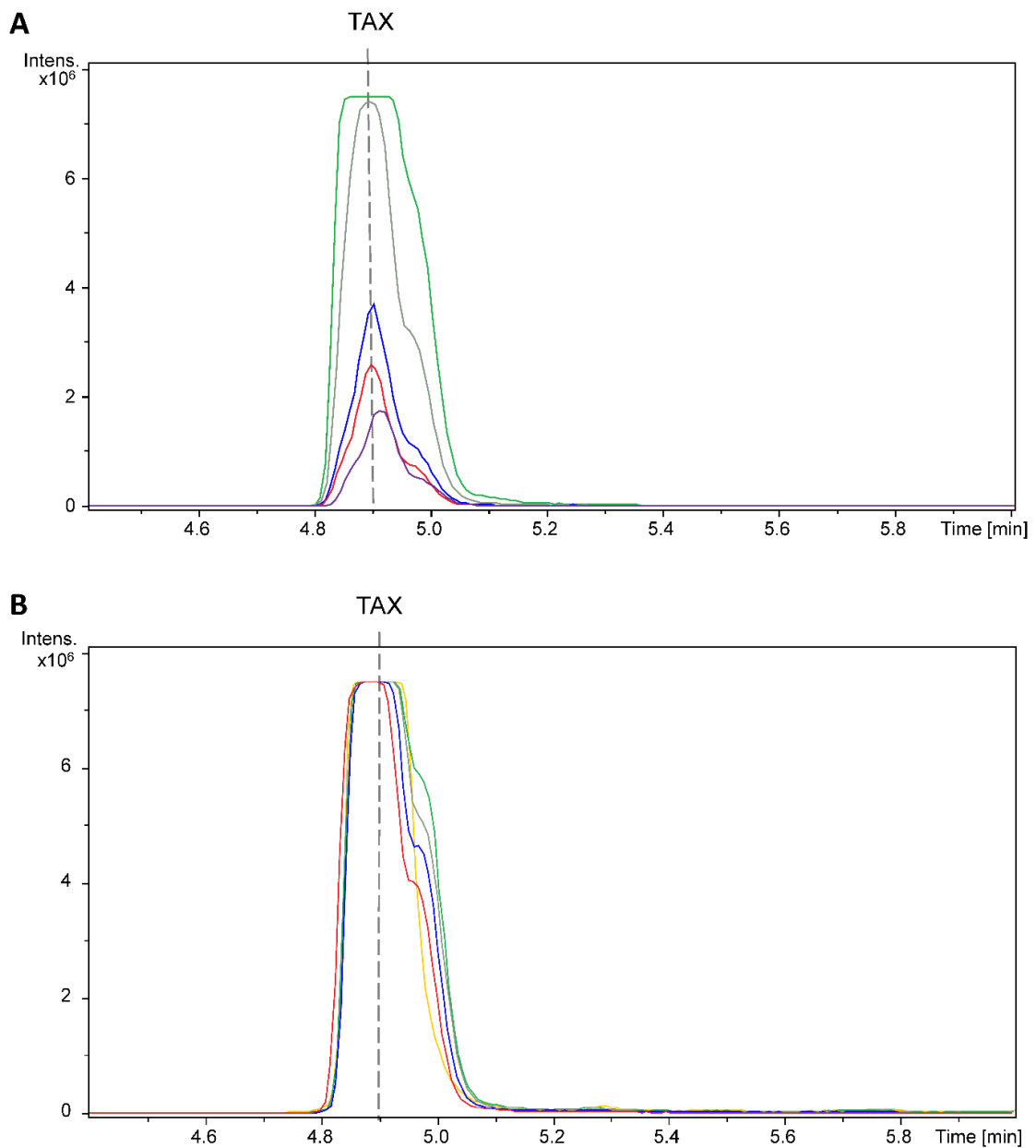
riboJ (capital letters)-rbs SR41 (lowercase letters) (5'-3'):

AGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTA
CAAATAATTTTGTTTAAAtctaagtaaggagtaggctg

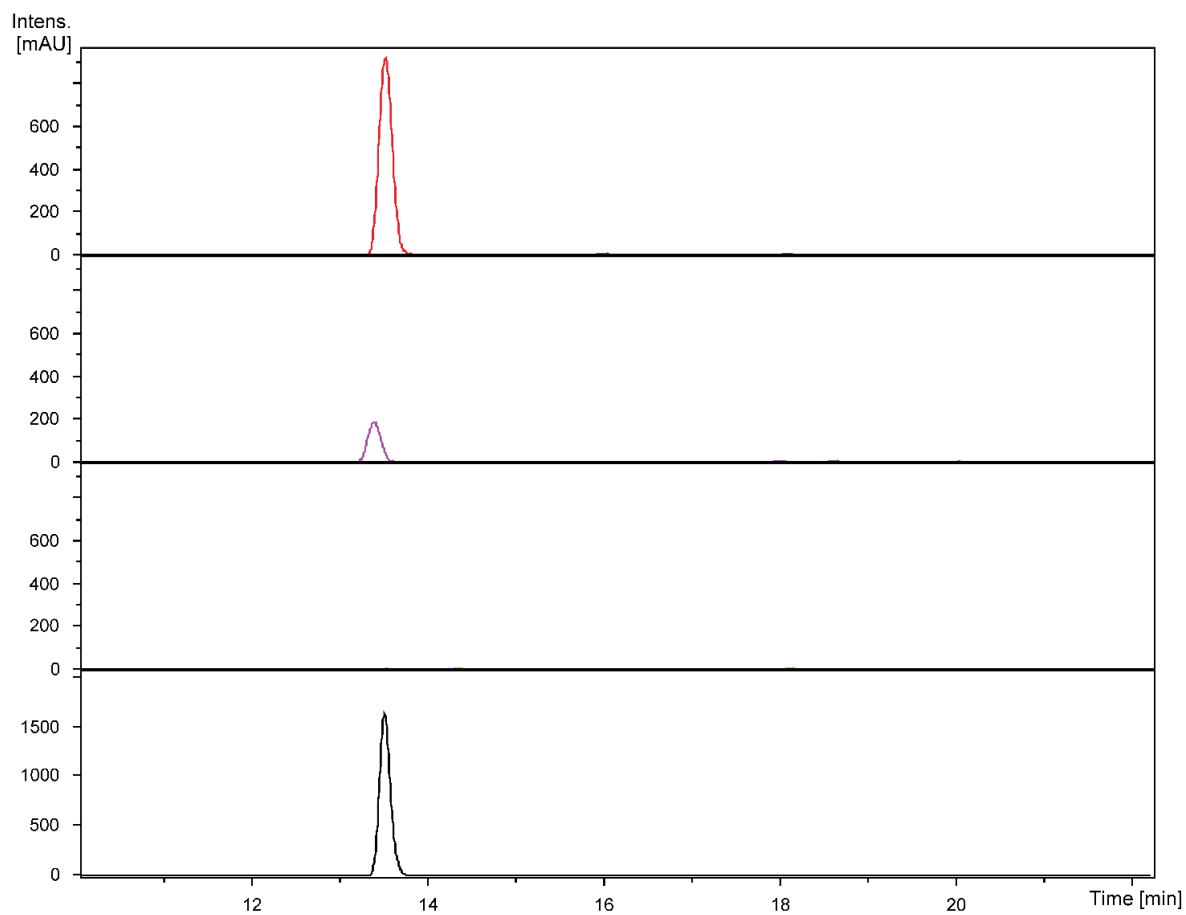
Terminator ttsbib (5'-3'):

AAAAAAAAAAGCGCCGCAACTGCGGCGCTTTTTTTTTT

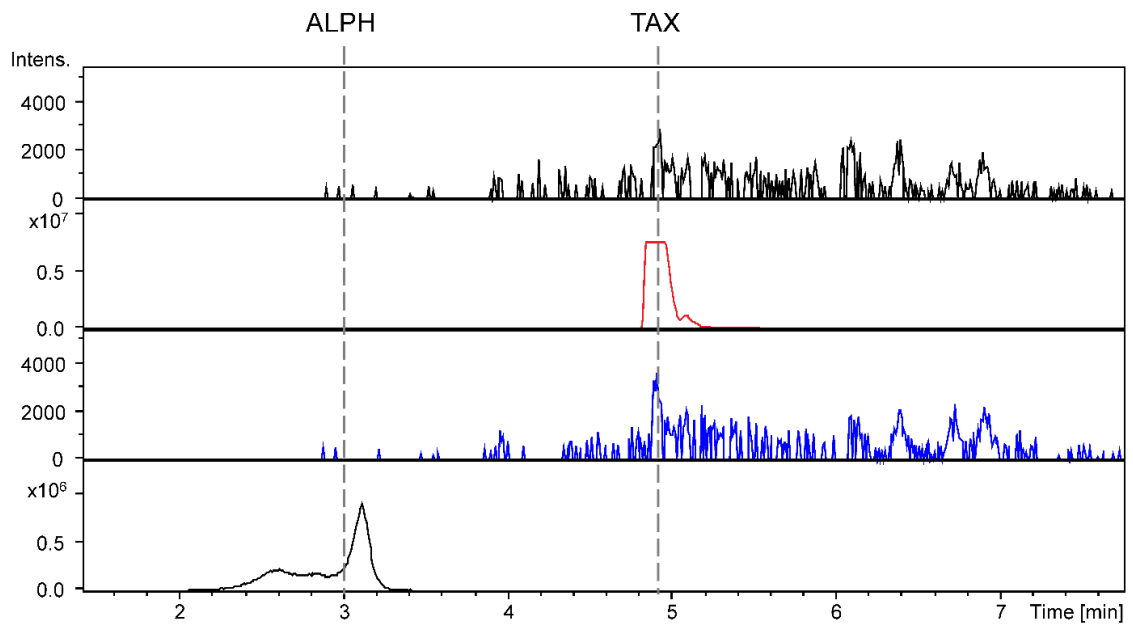
3 Supplementary Figures



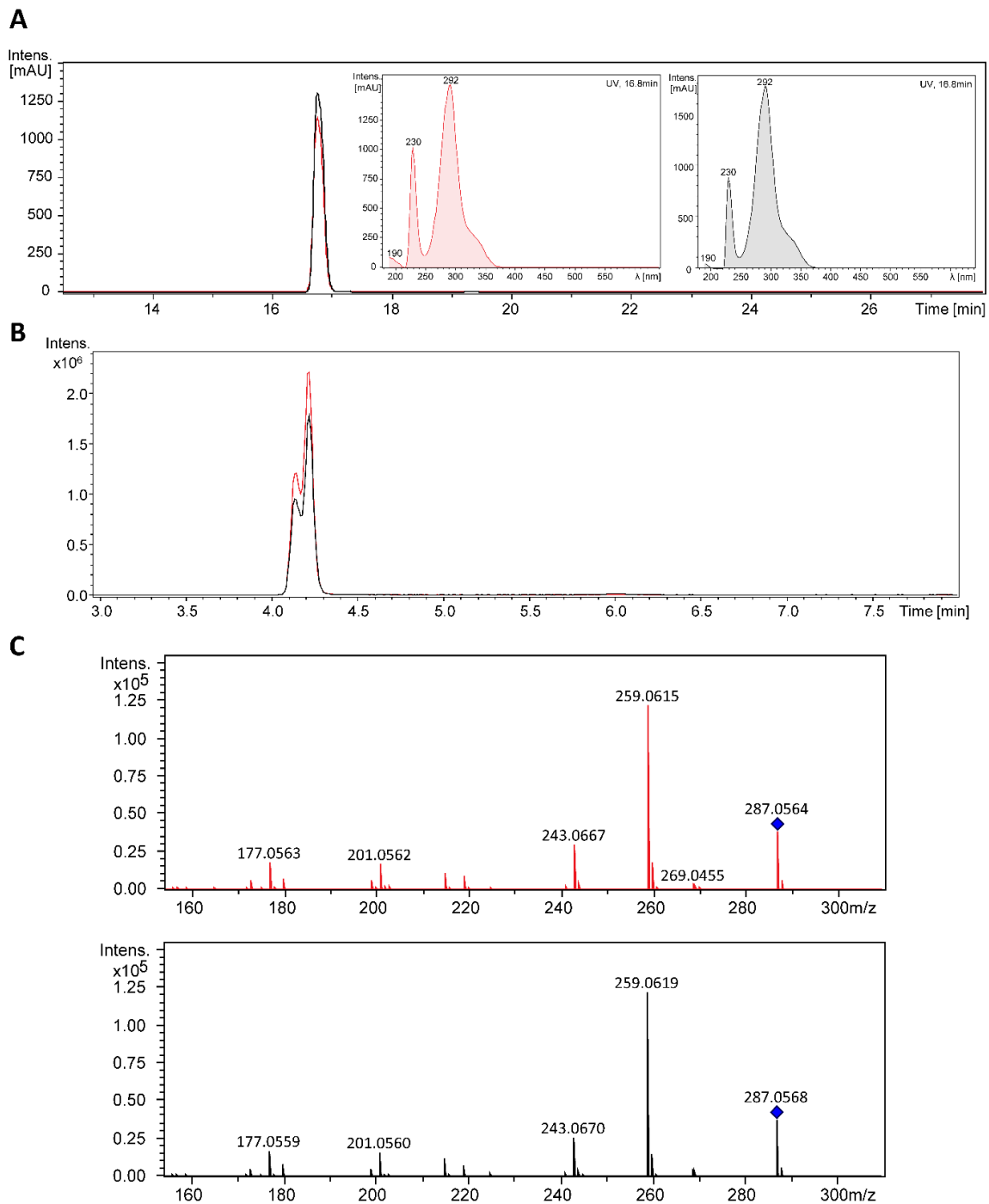
Supplementary Figure 1. HPLC-HRESIMS chromatograms extracted for taxifolin m/z , corresponding to taxifolin degradation experiments after $10 \mu\text{M}$ commercial taxifolin feeding to **(A)** NL333 pH 7.2 medium inoculated with 10^7 UFC/mL *S. albidoflavus* UO-FLAV-004 strain. Samples taken every 24h along 5 days: day 1 (green), day 2 (grey), day 3 (blue), day 4 (red) and day 5 (purple). **(B)** NL333 pH 7.2 medium devoid of cells. Samples taken every 24h along 4 days: day 0 (yellow), day 1 (green), day 2 (grey), day 3 (blue) and day 4 (red). TAX, taxifolin.



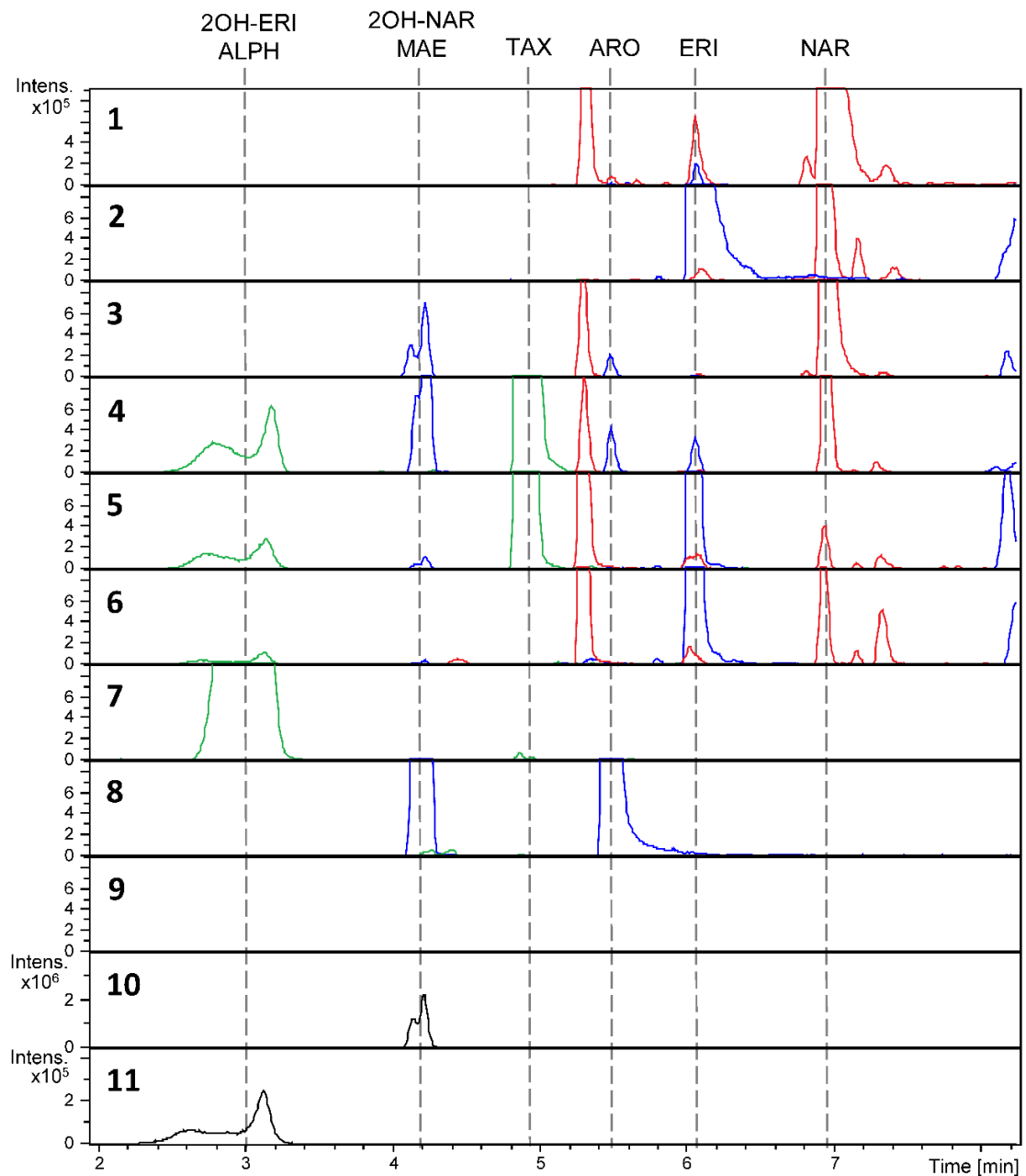
Supplementary Figure 2. HPLC-DAD chromatograms at 279-281 nm of a cell-free NL333 pH 7.2 culture medium spiked with 50 μ M commercial alphitonin. Samples collected at times 0 h (red), 4 h (purple) and 24 h (yellow) after compound addition. Below, commercial standard of alphitonin (black).



Supplementary Figure 3. Extracted ion chromatograms (EICs) for taxifolin/alphitonin m/z of control samples of *S. albidoflavus* UO-FLAV-004 strain cultures with DMSO (black) or with 100 μM taxifolin feeding (red), and strain UO-FLAV-004-ErCHI with DMSO (dark blue) at time 0 h. Alphitonin commercial standard (black) is shown. ALPH, alphitonin; TAX, taxifolin.



Supplementary Figure 4. Comparisons of pure commercial standards of maesopsin (black) and 2-hydroxynaringenin (red). **(A)** HPLC-DAD chromatograms at 279-281 nm and UV/Vis spectra. **(B)** EICs at m/z 287.0561 ± 0.005 $[M-H]^-$. **(C)** MS/MS spectra.



Supplementary Figure 5. EICs for naringenin m/z (red); eriodictyol, aromadendrin, 2OH-NAR and maesopsin m/z (blue); and taxifolin, 2OH-ERI and alphonin m/z (green) of *S. albidoflavus* strains (1) UO-FLAV-004-NAR, (2) UO-FLAV-004-ERI, (3) UO-FLAV-004-ARO, (4) UO-FLAV-004-ARO + 100 μ M ERI feeding, (5) UO-FLAV-004-TAX, (6) UO-FLAV-004-ALPH, (7) UO-FLAV-004-ErCHI + 100 μ M TAX feeding, (8) UO-FLAV-004-ErCHI + 100 μ M ARO feeding, (9) UO-FLAV-004-ErCHI + DMSO. (10) EIC for 2OH-NAR/maesopsin m/z of the corresponding pure commercial standards (black). (11) EIC for alphonin m/z of the pure commercial standard (black). NAR: naringenin; ERI: eriodictyol; ARO: aromadendrin; TAX: taxifolin; 2OH-NAR: 2-hydroxynaringenin; MAE: maesopsin; 2OH-ERI: 2-hydroxyeriodictyol; ALPH: alphonin.

Supplementary Figures

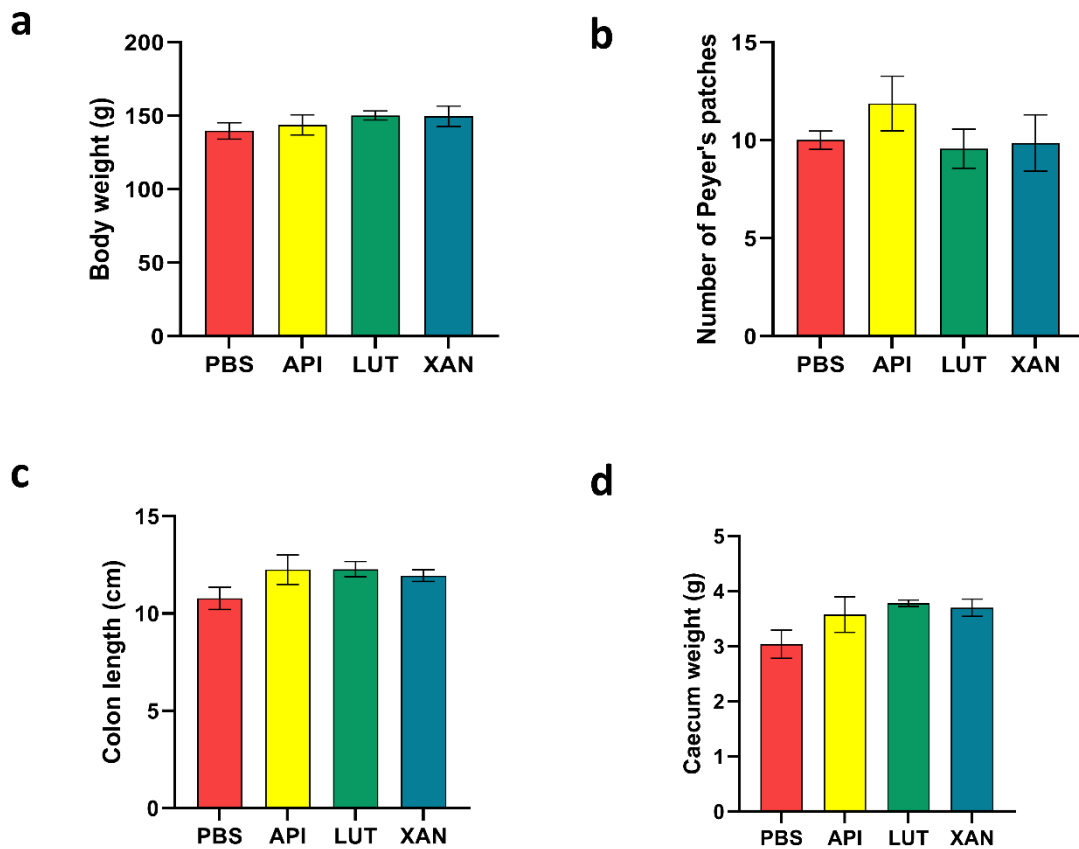


Figure S1. Measure of physical and inflammation parameters in UC-induced animals from the four studied cohorts: **(a)** mean body weight; **(b)** hyperplastic Peyer's patches; **(c)** colon length and **(d)** caecum weight. Comparisons performed between PBS control cohort and each flavonoid treatment cohort. No statistically significant differences were observed in these comparisons. PBS (red); apigenin (API, yellow); luteolin (LUT, green) and xanthohumol (XAN, blue).

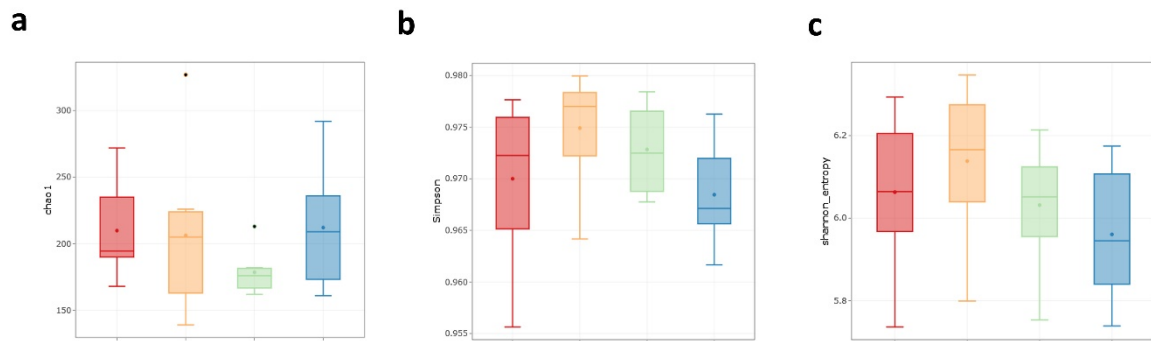


Figure S2. Boxplots of alpha diversity metrics **(a)** Chao1, **(b)** Simpson and **(c)** Shannon. The colored dot in each boxplot indicates the mean. Black dots indicate outliers. No statistically significant differences were found for any of these metrics among the UC-induced animals from the control PBS cohort and the flavonoid treatment cohorts, this indicating no changes in terms of microbial alpha diversity. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green); xanthohumol (blue).

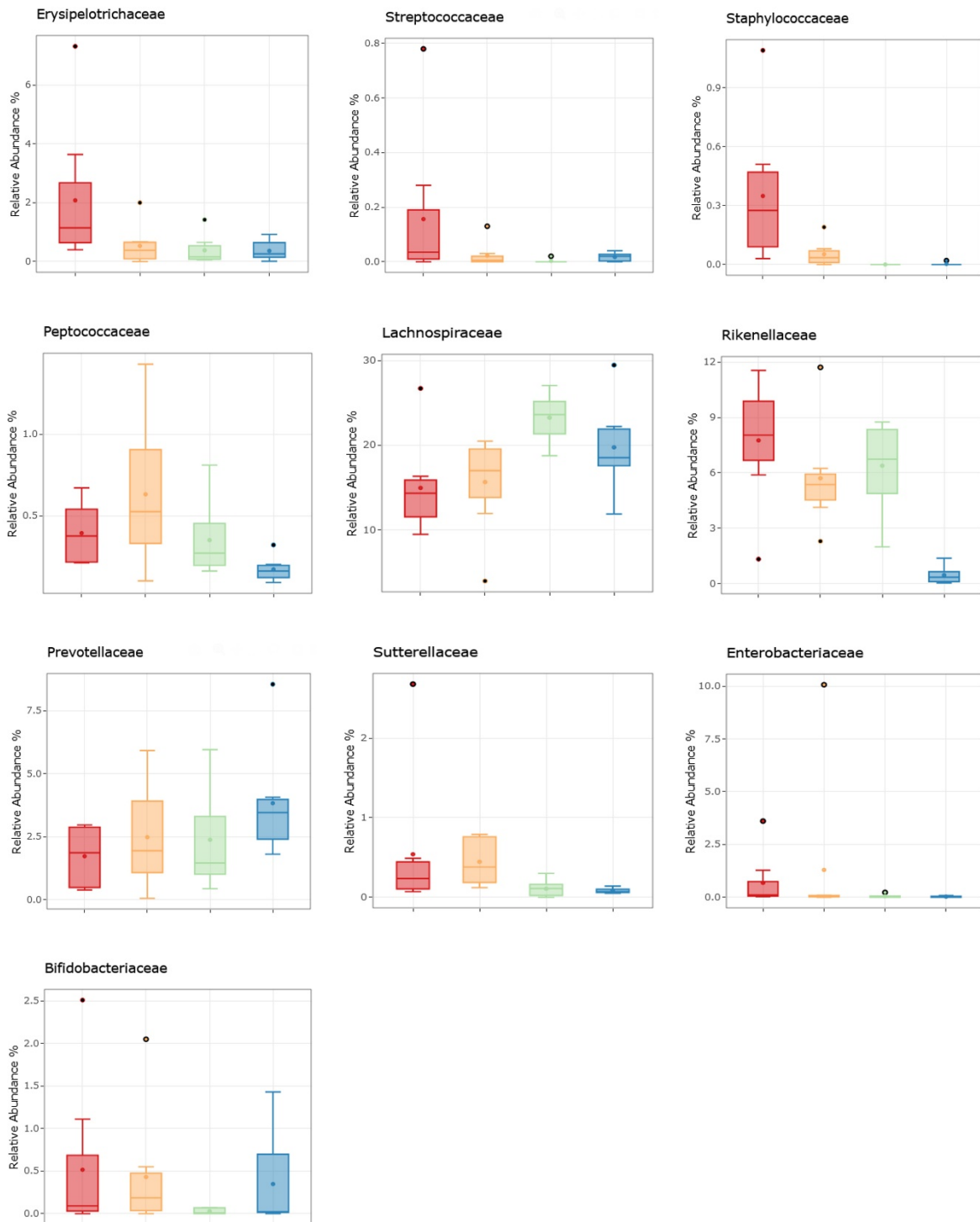


Figure S3. Boxplots of the relative abundance (%) of families with major significant differences regarding the comparison between UC-induced animals in the four studied cohorts. The colored dot in each boxplot indicates the mean. Black dots indicate outliers. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green) and xanthohumol (blue).

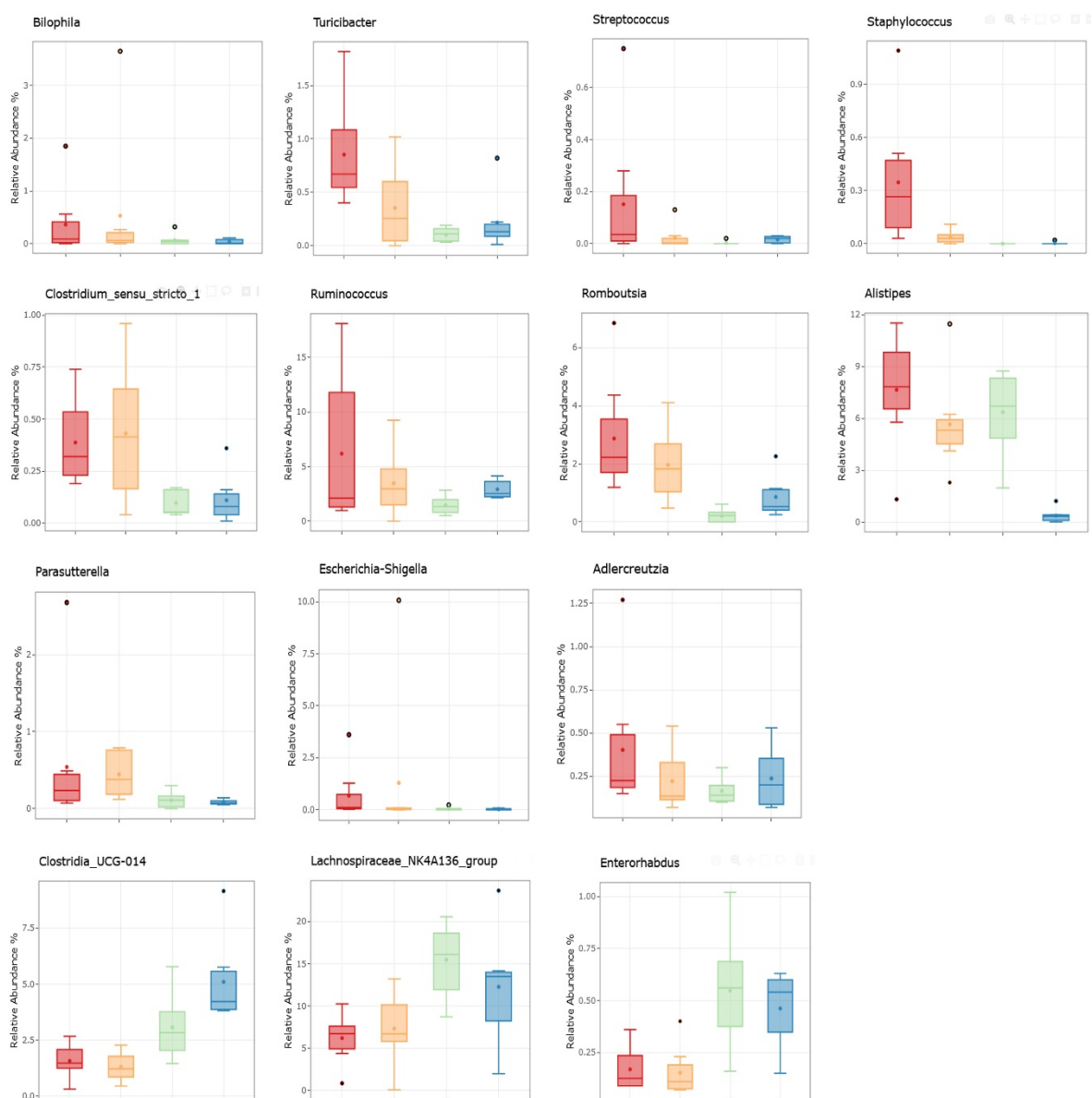


Figure S4. Boxplots of the relative abundance (%) of genera with major significant differences regarding the comparison between UC-induced animals in the four studied cohorts. The colored dot in each boxplot indicates the mean. Black dots indicate outliers. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green) and xanthohumol (blue).

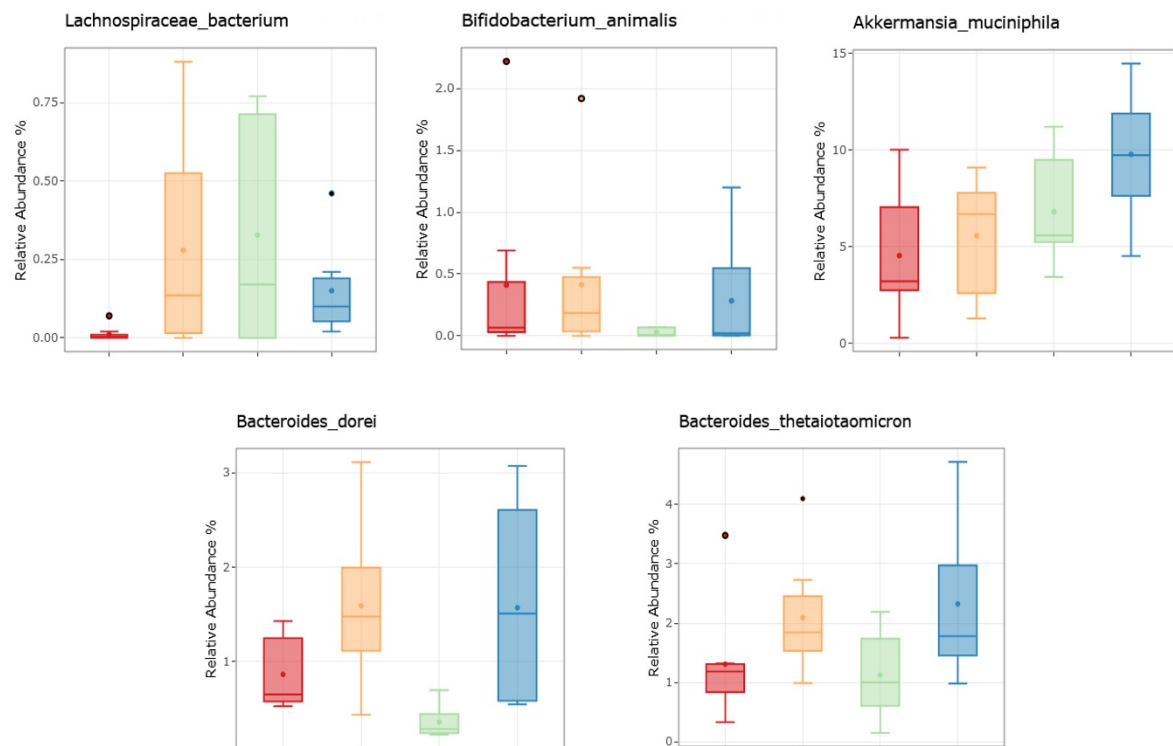


Figure S5. Boxplots of the relative abundance (%) of species with major significant differences regarding the comparison between UC-induced animals in the four studied cohorts. The colored dot in each boxplot indicates the mean. Black dots indicate outliers. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green) and xanthohumol (blue).

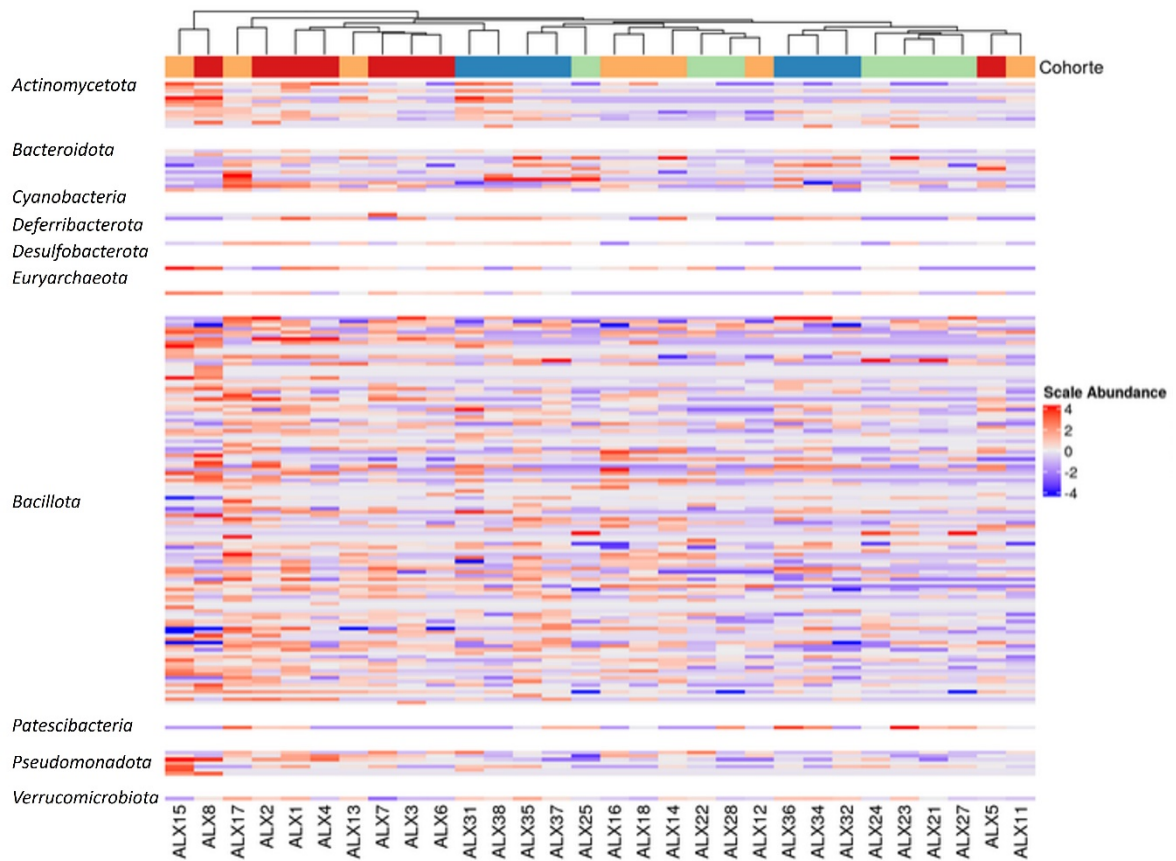


Figure S6. Heatmap representing the cohorts grouped based on the abundance of genera. Colors represent standardized abundances. Red means high abundance of the given genus, while blue means low abundance. Row labels add information of the phylum. PBS (red); apigenin (yellow); luteolin (green) and xanthohumol (blue).

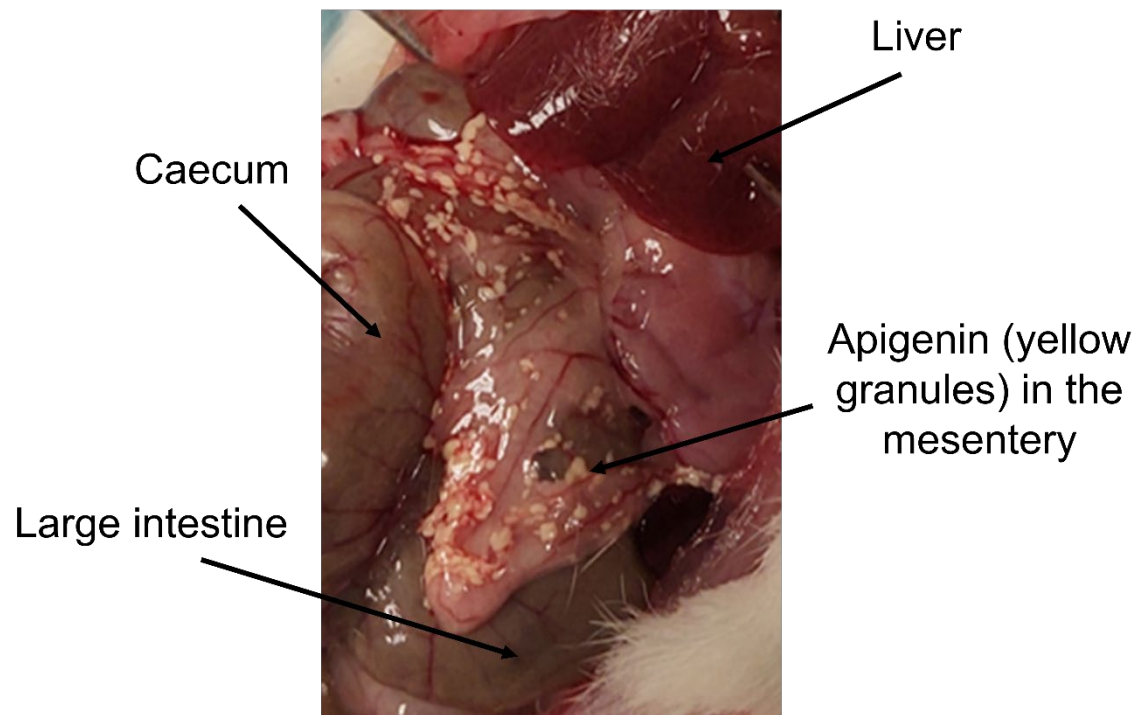


Figure S7. Apigenin precipitation granules in the mesentery of apigenin cohort rats.

**INFORME SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES
CIENTÍFICAS RECOGIDAS EN ESTA TESIS**

Esta tesis doctoral está formada por cuatro capítulos, cada uno de ellos correspondiente a un artículo científico diferente. Los artículos de esta tesis doctoral han sido publicados en revistas académicas con las características que se detallan en la tabla a continuación. La información sobre las revistas ha sido recopilada del “Journal Citation Reports” (<https://jcr-clarivate-com.uniovi.idm.oclc.org/jcr/home>). Se han recogido los siguientes parámetros: el área SCI a la que está asociada la revista; la editorial; el factor de impacto de cada revista, el cual, al ser artículos recientes, corresponde a los últimos datos publicados, y el cuartil.

	<i>Revista</i>	<i>Área SCI</i>	<i>Editorial</i>	<i>Factor de impacto</i>	<i>Cuartil</i>
<i>Capítulo 1</i>	International Journal of Molecular Sciences	Biochemistry & Molecular Biology	MDPI	5,6	Q1
<i>Capítulo 2</i>	Microbial Cell Factories	Biotechnology & Applied Microbiology	Springer (BMC)	6,4	Q1
<i>Capítulo 3</i>	Frontiers in Microbiology	Microbiology	Frontiers Media SA	5,2	Q2
<i>Capítulo 4</i>	International Journal of Molecular Sciences	Biochemistry & Molecular Biology	MDPI	5,6	Q1

